



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DO SOLO  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRONOMICA**

**MANOEL EMILIANO LOPES DE SOUZA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE SOLOS  
CONTAMINADOS POR MANGANÊS PARA A FORMAÇÃO DE UM BANCO DE  
ESTIRPES NATIVAS SELECIONADAS.**

**FORTALEZA**

**2016**

MANOEL EMILIANO LOPES DE SOUZA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE SOLOS CONTAMINADOS  
POR MANGANÊS PARA A FORMAÇÃO DE UM BANCO DE ESTIRPES NATIVAS  
SELECIONADAS.

Monografia apresentada ao curso de  
Graduação em Engenharia Agrônômica da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito  
parcial à obtenção do título de Engenheiro  
Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes  
Filho

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Vânia Felipe Freire  
Gomes

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S239i Souza, Manoel Emiliano Lopes de.  
Isolamento e caracterização de rizóbios de solos contaminados por manganês para a formação de um banco de estirpes nativas selecionadas / Manoel Emiliano Lopes de Souza. – 2016.  
40 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho.  
Coorientação: Profa. Dra. Vânia Felipe Freire Gomes.
1. Mineração. 2. Recuperação de áreas degradadas. 3. Fixação biológica de Nitrogênio. I. Título.  
CDD 630
-

MANOEL EMILIANO LOPES DE SOUZA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE SOLOS CONTAMINADOS  
POR MANGANÊS PARA A FORMAÇÃO DE UM BANCO DE ESTIRPES NATIVAS  
SELECIONADAS.

Monografia apresentada ao curso de  
Graduação em Engenharia Agrônoma da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito  
parcial à obtenção do título de engenheiro  
Agrônomo.

Aprovada em: 22/07/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Prof. Dra. Vânia Felipe Freire Gomes (Examinadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Eng. Agr. Msc. Kácio Cráculi Vieira Garcia (Examinador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Cezarina Maria Rodrigues de Sousa e Venceslau Lopes Araujo e ao meu filho Renato Ferreira Lopes e minha amada Mari.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Cezarina Maria Rodrigues de Souza e Venceslau Lopes Araujo, por todo amor, e apoio e incentivo;

Ao meu filho Renato Ferreira Lopes, por ser minha principal motivação na busca do título de Engenheiro Agrônomo.

A minha companheira e amada Maristela Caetano Gomes, por todo apoio, amor, motivação e dedicação oferecidos nas horas mais difíceis desta jornada.

Aos meus irmãos Emilio Lopes de Souza e Emanuela Rodrigues de Souza, por todo o incentivo.

A toda minha família (tios, tias, primos, primas, avôs, avós e sobrinhos).

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de conclusão do curso de graduação em agronomia.

Ao Prof. Dr. Paulo Furtado Mendes Filho, pela dedicação e excelente orientação;

Aos participantes da banca examinadora professora Dra. Vânia Felipe Freire Gomes e ao Eng. Agr. Me. Kaio Gráculu Vieira Garcia pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões;

À Pró-Reitora de Assuntos estudantis da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio oferecido através do Programa Residência Universitária.

A todos os colegas de graduação em agronomia, pelo companheirismo e as horas de alegria compartilhada ao longo do curso;

Ao Assentamento Palmares-Crateús-CE, símbolo de resistência e força da organização do homem do campo.

Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.



“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”.

Louis Pasteur.

## RESUMO

A atividade da Mineração de manganês apresenta elevada importância na economia mundial, gerando matéria prima para as mais diversas indústrias. No entanto possui elevado impacto ambiental com a geração de enorme massa de solo poluído por rejeito. Assim se faz necessário a utilização de tecnologias de baixo custo para reabilitação destes ambientes impactados. Neste sentido a revegetação com leguminosas inoculadas com bactérias fixadoras de N tem sido uma das principais estratégias utilizadas para reabilitação de áreas degradadas por mineração. O presente trabalho, fundamenta-se na hipótese de que os rizóbios nativos de áreas naturalmente contaminadas por Mn são mais tolerantes a esse elemento, objetivou o isolamento e caracterização morfológica das colônias destas bactérias adaptadas a altas concentrações de Mn no solo, utilizando-se como cultura armadilha o feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Observou-se que, existe uma elevada diversidade de rizóbio nos solos pesquisados, porém a capacidade de fixação do nitrogênio com o feijão caupi é aparentemente reduzida pela acidez e às elevadas quantidades de Mn nos solos. Foram obtidos 3 isolado, caracterizados em meio (YMA) quanto ao crescimento e morfologia das colônias. O material biológico obtido possui alto valor genético para futuros experimentos envolvendo a utilização de espécies leguminosas inoculadas. E, portanto, será agregado ao Banco de Estirpes Rizobianas do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciências do Solo do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, seguindo a codificação adotada pelo setor. Recomenda-se a realização de ensaios para uma certificação plena e testes de eficiência com outras espécies de leguminosas indicadas para o plantio em áreas degradadas pela mineração de manganês.

**Palavras chave:** Mineração. Recuperação de áreas degradadas. Fixação biológica de Nitrogênio .

## ABSTRACT

The activity of manganese ore has high importance in the world economy, generating raw materials for various industries. However it has high environmental impact with the generation of huge mass of soil polluted by waste. Thus the use of low cost technologies is necessary for rehabilitation of these impacted environments. In this sense revegetation with legumes inoculated with fixing bacteria N has been one of the main strategies used for the rehabilitation of degraded areas by mining. This work is based on the hypothesis that the native rhizobia areas naturally contaminated by Mn are more tolerant to this element and aimed at isolation and morphological characterization of colonies of these bacteria adapted to high Mn concentrations in the soil, using as culture trap the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). It was observed that there is a high diversity of soil rhizobia in researched area, but its nitrogen fixation capacity when associated with the cowpea is apparently reduced by acidity and higher amounts of Mn in the soil. Three isolated, characterized in Yeast Manitol Agar Broth, and the growth morphology of the colonies were observed. The obtained biological material has high genetic value for future experiments involving the use of inoculated legumes species and therefore it will be added to the Bank of rhizobial strains of the Department of Soil Science Soil Microbiology Laboratory of the Center of Agricultural Sciences of the Federal University of Ceará, following a proper coding adoption. It is highly recommended the conduction of further tests for a full certification and efficiency tests with other legume species suitable for planting in areas degraded by mining manganese.

Key words: Rhizobium characterization 1. restoration areas 2. biological fixation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Localização da área de coleta das amostras de solo..... 24
- Figura 2 – Rizóbios isolados do solo contaminado por rejeito do minério de Mn, em aumento de 400 X sob microscopia ótica de campo claro, em lamina a fresco..... 26
- Figura 3 – Plântulas de feijão caupi, cultivadas em solo de mata preservada com elevada concentração de manganês e em solo degradado pelo rejeito da mineração de manganês. Com sintoma de toxidez por Mn aos 20 dias após a germinação..... 27
- Figura 4 – Sintoma de toxidez por Mn em folha de feijão caupi cultivado em solos com elevada concentração de Manganês. (Clorose marginal das folhas, formação de manchas necróticas de coloração marrom)..... 27
- Figura 5 – Colônia do isolado rizobiano 1-MP (A), Colônia do isolado rizóbiano 2-DR (B) e Colônia do isolado rizóbiano 3-DR (C), crescidos em meio YMA com azul de bromotimol a 28° C no décimo dia após estriamento. 31

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1 – Utilização do Manganês na indústria brasileira-2008..... | 17 |
|--|----|

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Características químicas e físicas dos solos da mata preservada (SMP) e da área degradada pelo rejeito (SDR) utilizados para o isolamento de rizóbios..... 24
- Tabela 2- Caracterização morfológica dos isolados: isolado 1 proveniente do solo de mata preservada (1-MP); isolado 2 proveniente do solo degradado por rejeito (2-DR); isolado 3 proveniente de solo degradado por rejeito (3-DR)..... 29

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

DNPM Departamento Nacional de Produção Mineral

RNA Ácido Ribonucleico

DNA Ácido Desoxirribonucleico

MO Matéria Orgânica

MME Ministério de Minas e Energias

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

NBR Norma Brasileira Regulamentar

PUCPR Pontifícia Universidade Católica do Paraná

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>   | <b>16</b> |
| 2.1      | Aspectos gerais da mineração de manganês.....   | 16        |
| 2.2      | O nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera.....  | 17        |
| 2.2      | A fixação biológica do nitrogênio.....  | 18        |
| 2.3      | A importância do feijão caupi como cultura armadilha na captura de rizóbio ....                                   | 20        |
| 2.4      | Fitoremediação com leguminosas como estratégia de recuperação de áreas degradadas por mineração.....              | 21        |
| 2.5      | A importância da formação de um banco de estirpes de rizóbio nativos de áreas degradadas por mineração de Mn..... | 22        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>23</b> |
| 3.1      | Localização das áreas e coleta do solo.....   | 23        |
| 3.2      | Caracterização Química e Física do Solo.....  | 24        |
| 3.3      | Instalação e Condução do Ensaio para o Isolamento de Rizóbios.....  | 24        |
| 3.4      | Isolamento das estirpes rizobianas dos nódulos.....   | 25        |
| 3.5      | Caracterização morfológica das colônias rizobianas.....   | 26        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>5</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>6</b> | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>33</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade de mineração apresenta elevada importância na economia mundial, com impactos no modo de vida do homem moderno, gerando matéria prima para as mais diversas indústrias. No Brasil a atividade de mineração é presente na história desde o período colonial, tendo início com a corrida por ouro e pedras preciosas e chegando ao cenário atual, em que a exploração mineral é um dos setores de maior investimento tecnológico e de grande importância para a economia do País. O Brasil em 2014 ocupou a quinta posição em termos de reservas de manganês (Mn) com uma produção de 2,7 milhões de toneladas (Mt), figurando entre os maiores produtores mundiais deste minério BRASIL (2015).

O Mn é matéria prima para diversas indústrias, da farmacêutica a siderúrgica, sendo esta última a principal consumidora utilizando quase 90% da produção mundial. A exploração de minério possui elevado impacto ambiental. Desde o desmatamento das áreas a serem exploradas a geração de enorme massa de solo poluído por rejeito. O conteúdo elevado de Mn no rejeito gerado da mineração pode ser fonte de contaminação de solos, rios, lençol freático e atmosfera, gerando impactos negativos na saúde ambiental e humana.

Dessa forma, se faz necessário a busca por estratégias e tecnologias que visem a reabilitação destas áreas degradadas, tornando-as ambientes funcionais do ponto de vista ambiental e social. Todavia, a reabilitação das áreas degradadas por exploração mineral representa elevado custo financeiro que muitas vezes inviabiliza o processo com as atuais tecnologias disponíveis.

A Fitorremediação, segundo Garcia (2015), tem sido uma das principais estratégias utilizadas para reabilitação de áreas degradadas por mineração. Vieira *et al.* (2011) e Lima *et al.* (2014) citam que a fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas e micro-organismos para modificar a dinâmica de poluentes no solo e na água, reduzindo suas concentrações no ecossistema por meio de processos de degradação, volatilização, estimulação, extração e imobilização.

Na reabilitação de áreas degradadas por mineração, a inoculação de micro-organismos promotores do crescimento de plantas (MPCP) é necessária devido à baixa disponibilidade de nutrientes e pelas condições físicas do solo serem desfavoráveis ao desenvolvimento de uma cobertura vegetal (HERNANDÉS. 2015).

As plantas da família *Leguminosae* são amplamente utilizadas nas etapas iniciais do processo de reabilitação de áreas degradadas, tendo no grupo muitas espécies pioneiras na revegetação. São espécies de ampla ocorrência e adaptação, que apresentam elevada produção

de sementes, além de realizar simbiose com rizóbios, fixadoras de nitrogênio (N) NOGUEIRA *et al.* (2007). Dessa forma, a habilidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico caracterizada na simbiose entre bactérias dos gêneros *Rhizobium/Bradyrhizobium* e espécies vegetais da família Leguminosae contribui significativamente para o fornecimento de N para as plantas, as quais funcionarão como espécies condicionantes do solo nos processos iniciais da fitoremediação de áreas contaminadas por mineração de Manganês.

O presente trabalho, fundamentado na hipótese de que os rizóbios nativos de áreas naturalmente contaminadas por Mn são mais tolerantes a esse elemento, tem como objetivo o isolamento de estirpes rizobianas adaptadas a altas concentrações de Mn no solo, utilizando-se como cultura armadilha o feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), para a formação de um banco inicial de estirpes. Referidas estirpes serão agregadas ao banco de estirpes de rizóbios do Setor de Microbiologia do Solo Departamento de Ciências do Solo/CCA/UFC e poderão ser utilizadas em trabalhos de pesquisa futuros.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

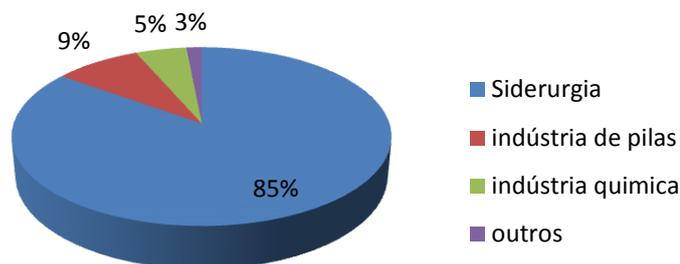
### 2.1 Aspectos gerais da mineração de Manganês

O manganês se destacou como produto de exportação mineral do Brasil já no século XIX, se tornando o principal *commodity* mineral do país no século XX. Somente em 1942, com a criação da estatal Vale do Rio Doce, é que a exportação de minério de ferro veio a superar a exportação de manganês no Brasil (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME, 2010).

Segundo o relatório do DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL (2015), em 2014 a reserva mundial estimada de manganês era de 625 mil toneladas Mt, concentrando-se 98,3% nos seguintes países em ordem decrescente: África do Sul, com 150 Mt; Ucrânia, com 140 Mt; Brasil, com 116 Mt; Austrália, com 97 Mt; Índia com 52 Mt; China com 44 Mt e Gabão com 24 Mt. A produção mundial em 2014 foi de 17,7 milhões de toneladas, com o Brasil ocupando o quinto lugar e contribuindo com 6,25% da produção mundial correspondendo a 2,7 Mt de concentrado de manganês.

Os estados brasileiros que se destacam na produção nacional são Minas Gerais, Pará, Mato Grosso do Sul (Departamento Nacional de Produção Mineral – DNPM, 2016). No estado do Ceará a extração se dá em jazidas de baixo volume que não ultrapassa 10 milhões de toneladas, estando as minas concentradas na região metropolitana de Fortaleza (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME - 2010).

O setor industrial demanda o minério de Mn para a fabricação de pilhas, tintas, medicamentos, ração animal e adubos agrícolas, porém possui maior destaque a indústria siderúrgica, pelo volume consumido de 85% da produção. O Mn é um agente dessulfurante (retirada do enxofre) e desoxidante empregado na produção de ferroligas utilizadas na produção de todos os tipos de aço e ferros fundidos (DNPM, 2016).

**Gráfico 1 - Utilização do Manganês na indústria brasileira-2008**

Fonte: DNPM 2008.

A extração de manganês, apesar de ser essencial na economia brasileira desde o século XIX, tem gerado fortes impactos ambientais. Mechi e Sanches (2010) citam diversos impactos negativos da mineração ao ambiente, sendo os principais a destruição de paisagens, o desmatamento, o revolvimento e a extração da camada fértil do solo na abertura de cavas, a poluição atmosférica por partículas em suspensão e a contaminação de reservatórios hídricos, sejam espelhos de água ou lençóis freáticos, por metais pesados, além do assoreamento dos mananciais.

Em solos de áreas de mineração a gravidade das alterações causadas ao ambiente, pode ocasionar a perda da capacidade de resiliência do meio. Desta forma a intervenção humana é fundamental para reverter o processo de degradação (PARROTA & KNOWLES, 2008;).

## 2.2 Nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera

O nitrogênio é considerado um dos elementos químicos mais importantes para as plantas por atuarem principalmente no metabolismo vegetal e na síntese de proteínas, além de fazerem parte dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e participarem no processo de fotossíntese (PEREIRA *et al.*, 1981). O N é considerado um elemento essencial às plantas e sua ausência pode limitar o desenvolvimento e crescimento vegetal.

Na carência de N assimilável na solução do solo, os principais sintomas de deficiência nas plantas geralmente estão associados à clorose gradual nas folhas mais velhas, em função de quantidades reduzidas de clorofila, e redução no crescimento da planta (SOUZA; FERNANDES, 2006).

A atmosfera terrestre possui cerca e 78% de N na forma não combinada (N<sub>2</sub>). No

entanto esta forma não é assimilável pelas plantas sendo necessária sua combinação em moléculas assimiláveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As principais formas do N assimilável pelos vegetais superiores são nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4$ ). O amônio é absorvido de forma passiva ou ativa quando em altas ou baixas concentrações respectivamente. Enquanto que o nitrato é absorvido apenas por processo passivo (KERBAUY, 2008).

As principais formas de aporte de N absorvíveis pelas plantas se dão através dos seguintes processos: fixação industrial, fixação atmosférica e fixação biológica, sendo esta última a principal forma de aporte de N nos ecossistemas.

A fixação industrial se dá com a quebra da molécula de nitrogênio na forma elementar ( $\text{N}_2$ ) para a produção de amônio (processo Haber-Bosch). Neste aspecto, em função da alta estabilidade da molécula de  $\text{N}_2$ , este processo necessita de um grande gasto energético para quebra da tripla ligação entre os átomos de  $\text{N}\equiv\text{N}$ , com temperaturas de  $500^\circ\text{C}$  e pressão de 200- 600 atm para a combinação de  $\text{N}_2$  com  $\text{H}_2$  na formação de  $\text{NH}_3$ .

A fixação atmosférica ocorre através de descargas elétricas que quebram a tripla ligação do  $\text{N}_2$  e produzem radicais  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}^+$  e  $\text{O}$  de elevada reatividade que se combinam formando óxidos de nitrogênio aportando de 2 a 20 Mt/ano de nitrogênio ao ambiente (NUNES *et al.* 2003; GARCIA *et al.*, 2013).

Na solução do solo o N nas formas de amônio, nitrato e ureia perdem-se rapidamente por serem moléculas de elevada solubilidade (GARCIA *et al.*, 2013). As perdas do N no solo segundo Kerbauy (2008) podem ocorrer por:

- a) Lixiviação: em que o N na forma de nitrato é percolado para as camadas mais profundas do solo antes de sua absorção pelas plantas.
- b) Erosão: em que as águas de enxurradas transportam sedimentos coloidais que contêm nutrientes.
- c) Volatilização: Ocorre da hidrólise enzimática da uréia no solo tendo como produto a amônia que é rapidamente volatilizada.
- d) Desnitrificação: processo que ocorre em condição de anaerobiose, onde o nitrato  $\text{NO}_3$  é convertido em óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ).

### **2.3 Fixação biológica de nitrogênio**

Os processos fundamentais para a manutenção da vida na terra são a fixação biológica de nitrogênio e a fotossíntese, reciclando respectivamente o nitrogênio e o carbono da

atmosfera (DÖBEREINER, 1984). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) atmosférico em compostos orgânicos é a principal fonte N nos ecossistemas (KERBAUY *et al.*, 2008). Uma prova da importância da FBN é a manutenção de numerosas plantas da família Leguminosae nos solos pobres em nitrogênio da Caatinga, fornecendo de 10,5 a 15,1 Kg de N/ha ao ambiente. Apesar do pequeno aporte, as quantidades acumuladas ao longo dos anos são cruciais para o balanço do N nesse sistema (SOUZA, 2010).

Os micro-organismos procariotos fixadores de N atmosférico apresentam elevada diversidade morfológica, fisiológica, bioquímica e filogenética (NÓBREGA *et al.*, 2004). Essa diversidade de fixadores é o que garante a resiliência e ocorrência da FBN nos distintos ecossistemas. A maioria dos organismos diazotróficos é de vida livre, ocorrendo em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera de plantas em águas doces e salgadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). São conhecidas diversas associações e simbioses entre micro-organismos e plantas, todavia a simbiose entre plantas da família Leguminosae e os rizóbios são as mais conhecidas (DÖBEREINER, 1984).

A FBN possui elevado custo energético para os fixadores com o complexo enzimático nitrogenase demandando até 16 moléculas de ATP por N fixado (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O exemplo disso é a energia exigida por *Azotobacter* na fixação, consumindo até 100 unidades de glicose por N fixado, fornecendo apenas algumas centenas de gramas de nitrogênio por hectare ao ano. Enquanto que na simbiose rizóbio-leguminosa essa proporção cai de 12 a 16 unidades de glicose por N fixado (PASCUAL, 2003), fornecendo de 150 a 200 kg de nitrogênio/ha/ano (BLACK, 1996).

A associação de rizóbio com leguminosas é reflexo de uma co-evolução entre ambos os organismos, havendo o reconhecimento de sinais bioquímicos e especificidade simbiótica. Por essa razão, a nodulação de leguminosas introduzidas na área depende da ocorrência de espécies rizobianas compatíveis no solo, sendo sua eficiência de fixação dependente do hospedeiro, da bactéria, do clima e do solo (SOUZA *et al.*, 2007).

A simbiose entre leguminosa e bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Phylorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* é caracterizada pela formação do nódulo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Sendo os nódulos um novo órgão formado da integração entre Rizóbio-leguminosa em que o bacteroide coloniza o tecido radicular e fixa N<sub>2</sub> da atmosfera (SANTOS; REIS, 2008). No entanto a nodulação não é comum a todas as espécies de leguminosas, sendo um fator limitante da plena utilização desse processo na reabilitação de áreas

Visando a produção de inoculantes rizobianos, a seleção e caracterização dos isolados

é a primeira etapa (BHATTACHARRJEE *et al.*, 2008). Na identificação dos diversos gêneros de bactérias da família Rhizobiaceae as caracterizações culturais e fisiológicas das colônias de rizóbio representam uma fonte de informações importantes para a identificação e agrupamento das estirpes obtidas (MARTINS *et al.*, 1997).

Dessa forma os dados referentes ao tempo de crescimento, alteração do pH do meio de cultivo (YMA), produção de muco, cor e forma das colônias são dados importantes na identificação e caracterização de estirpe de rizóbio. Por conseguinte, o estudo dessas características culturais e morfológicas das colônias de rizóbio, associado ao mapeamento de seu genoma, nos dará suporte para a identificação taxonômica do material isolado.

#### **2.4 A importância do feijão caupi como cultura armadilha na captura de rizóbio**

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é classificado botanicamente como Dicotyledonea, da ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, e subespécie *unguiculata* (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010). Assim como numerosas leguminosas tropicais, o feijão-caupi é comumente colonizado por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, os quais formam o grupo miscelânea do feijão-caupi ou rizóbios tropicais (NEVES *et al.*, 1998).

A cultura do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é extremamente rústica, tolerante a altas temperaturas, à seca e com boas condições para adaptação e expansão das áreas de cultivo no nordeste (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010). Em termos nutricionais o feijão Caupi possui de 23 a 25%, de proteína, 62% de carboidratos, e apenas 2% de óleos, além de ser rico em aminoácidos essenciais e possuir um elevado conteúdo de vitaminas e minerais. Por seu valor nutricional e a facilidade de produção o caupi é uma das principais culturas alimentares cultivadas e consumidas pelos pequenos produtores da zona rural da região nordeste do Brasil e Oeste da África (FREIRE FILHO, 2011).

A produção na região nordeste se dá em condições semiáridas, com elevada irregularidade de chuva em distribuição espacial e temporal além de elevadas temperaturas, utilizando técnicas tradicionais de cultivo, condições que limitam a produção de muitas culturas alimentares. Todavia essa cultura vem ganhando espaço sendo cultivada em grande escala na região Centro-Oeste desde 2006 (FREIRE FILHO, 2011).

A simbiose entre o feijão-caupi com rizóbio possui elevada importância econômica e ambiental, pois nessa associação o procarioto fixa N<sub>2</sub> atmosférico nos tecidos

radiculares da planta, garantindo um melhor desenvolvimento com elevação de produtividade e redução de custos com adubação nitrogenada (MASCENA, 2015). Esta associação, em caupi, pode fornecer de 35 a 70% do N exigido pela planta (BODDEY et al., 1990). O feijão-caupi é considerado uma planta de baixa seletividade associativa, ou seja, possui a capacidade de formar nódulos com uma gama muito grande de estirpes de rizóbio (FERNANDES JÚNIOR, 2009). A fácil colonização dos sítios de infecção por estirpes ineficientes ou até mesmo parasitas é, portanto, muito comum e ocasiona uma diminuição na eficiência da fixação do N atmosférico (COSTA *et al.*, 2011). Dessa maneira, a promiscuidade da planta tem desmotivado a seleção de estirpes mais eficientes na fixação de N para esta cultura (RUMJANEK *et al.*, 2005). Entretanto, essa baixa seletividade é uma característica muito útil e bastante utilizada por rizobiologistas para o isolamento de novas estirpes no solo, usando essas plantas como armadilhas.

## **2.5 Fitorremediação com leguminosas como estratégia de recuperação de áreas degradadas por mineração**

Os impactos ambientais causados pelas atividades mineradoras têm trazido inúmeros prejuízos à saúde humana e ao ambiente. A preocupação com a reabilitação desses ambientes tem crescido e, dessa forma, pressionado a comunidade científica a buscar tecnologias inovadoras de descontaminação de solo e água, sendo a biorremediação uma das técnicas utilizadas (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Grandes esforços estão sendo feitos na busca de integrar conhecimentos que possibilite a reabilitação e retorno de funcionalidade de solos contaminados e poluídos por metais pesados (ANDRADE *et al.*, 2009).

As técnicas convencionais (escavação e substituição do solo, aterro e tratamento físico-químico *ex situ*) possuem eficácia em pequenas áreas contaminadas com metais (MULLIGAN *et al.*, 2001). Porém, são mais agressivas podendo gerar alterações irreversíveis nas propriedades do solo e perturbação da microbiota nativa, além de exigirem elevados investimentos financeiros (GARCIA, 2015).

A técnica de fitorremediação, é a utilização de plantas e da microbiota a elas associadas somado a práticas agrícolas visando a remoção, imobilização ou degradação de contaminantes os tornando inofensivos para o ecossistema (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000)

Na implantação da técnica devem ser utilizadas plantas pioneiras, condicionadoras do ambiente. Portanto devem possuir rápido crescimento, elevada produção de biomassa, competitividade, vigor e tolerância ao poluente (LAMEGO; VIDAL, 2007).

A técnica possui elevada complexidade, e dependente de diversos fatores como

adaptação das plantas às condições edafoclimáticas e aos níveis de contaminação da área (MONTEIRO, 2005).

A fitorremediação na reabilitação de áreas contaminadas apresenta vantagens, como baixo custo de investimento e operação, aplicabilidade *in situ*, geração mínima de degradação e desestabilização da área a ser tratada (CHAVES *et al.*, 2010). Sua natureza permanente garante a proteção contra erosão, melhoria da estrutura do solo, aumento da fertilidade dos solos e beleza estética (ACCIOLY & SIQUEIRA, 2000).

Mendes Filho (2004), em experimento com fitorremediação, concluiu que na revegetação sustentável de áreas degradadas por mineração de cassiterita, é mais indicado o uso de leguminosas arbóreas nodulíferas de rápido crescimento. Por essa razão, a utilização de leguminosas inoculadas com bactérias fixadoras de N é uma alternativa potencial para a reabilitação de áreas impactadas (SILVA, 2015). Estas plantas, sejam arbóreas ou herbáceas, atuam também em simbiose múltipla com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias dos gêneros *Rhizobium/Bradyrhizobium*, fixadoras de N atmosférico (NOGUEIRA *et al.*, 2012), sendo recomendadas por vários pesquisadores (MENDES FILHO, 2004; SOUZA *et al.*, 2012; GARCIA, 2015), em função do aporte de nitrogênio ao ecossistema pela fixação biológica. Dessa forma, as Leguminosas pioneiras atuam na ciclagem de nutrientes, fertilidade, sombreamento, aumento na permeabilidade do solo e umidade do ar, atuando como espécie condicionadora do meio para o desenvolvimento de espécies mais exigentes com relação às condições ambientais (MARTINS, 2009). Deste modo as plantas pioneiras devem ser priorizadas na promoção da biodiversidade em ambiente sob condição de estresse (STEENBOCK; VEZZANI, 2013).

## **2.6 A importância da formação de um banco de estirpes de rizóbios nativos de áreas contaminadas por metais**

Em função da diversidade das estirpes rizobianas e das plantas hospedeiras, a relação existente entre rizóbio e leguminosa possui elevado grau de seletividade quanto ao estabelecimento da simbiose (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Deve ser considerado em relação a essa diversidade rizobiana a ocorrência de estirpes nativas ineficientes na fixação do N, ou até mesmo promovendo uma ação parasítica, que são competidoras eficientes na indução da nodulação. Estas podem competir com as estirpes mais eficientes pelo sítio de infecção da raiz, uma vez que a planta pode ser colonizada por mais de uma espécie ou estirpe de rizóbio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Por conseguinte, para

potencializar a fixação biológica de nitrogênio deve ser adotada a utilização de inoculantes formulados com estirpes eficientes selecionadas para os diversos ambientes.

A diversidade de rizóbio no solo é uma importante fonte de recursos genético para a seleção de estirpes eficientes e adaptadas às diversas condições edafoclimáticas. A seleção de novas estirpes vem se tornando alvo constante de pesquisas (FERREIRA *et al.*, 2013), o que resultou, por exemplo, na disponibilização de estirpes eficiente adaptadas aos cerrados e que são utilizadas como inoculantes comerciais para a soja principalmente, ambiente esses até bem pouco tempo considerados inadequados para essa cultura.

No entanto, não há registros de levantamentos sobre a ocorrência, diversidade e eficiência de populações de rizóbio em solos de mineração de bauxita e manganês no Brasil e no mundo (MELLONI *et al.*, 2006). É importante ressaltar que as populações de rizobios nativos de áreas degradadas pela mineração estão, provavelmente, mais adaptadas às condições edáficas e ambientais locais (MELLONI *et al.*, 2006) e que sucesso no reestabelecimento de ecossistemas degradados por mineração através da revegetação com sistemas biológicos mais tolerantes é extremamente dependente da criação de um programa de seleção de leguminosas com potencial na fitorremediação e formação de um banco de estirpes rizobianas eficientes na fixação biológica de N para formulação de inoculantes para essas áreas. Assim, essas espécies leguminosas nodulíferas podem ser menos dependentes da adubação nitrogenada (LASTE; GONÇALVES; FARIAS, 2008).

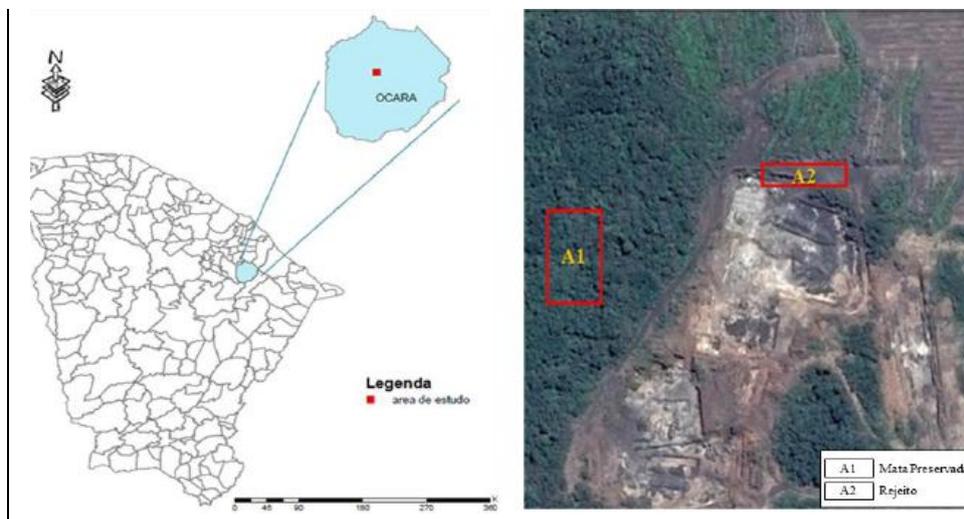
### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Localização das áreas e coleta do solo**

As amostras de solo utilizadas para isolamento dos rizóbios foram coletadas em área de mineração de manganês localizado no município de Ocara – CE, a 101 km de Fortaleza. Foram coletadas amostras da camada superficial do solo, na profundidade de 0 a 20 cm, de duas áreas distintas (Área - 1) e (Área - 2) (Figura 1).

A primeira (A1), considerado uma área de mata nativa preservada e adjacente à área de mineração, e a segunda (A2) uma área degradada pelo processo de mineração (presença de rejeito de mineração). Após coletado, os solos foram armazenados sob temperatura ambiente em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Ciências do Solo (DCS) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

**Figura - 1** Localização da área de coleta das amostras de solo. Fonte Google Earth. Garcia, 2015.



### 3.2 Caracterização Química e Física do Solo

Os solos utilizados no ensaio apresentaram seguintes características físicas e química (Tabela-1):

**Tabela 1** - Características químicas e físicas dos solos da mata preservada (SMP) e da área degradada pelo rejeito (SDR) utilizados para o isolamento de rizóbios.

| Amostra | pH                 | Al                   | Ca   | Mg   | Na     | S     | H+Al    | P                      | N    | M.O    |
|---------|--------------------|----------------------|------|------|--------|-------|---------|------------------------|------|--------|
|         | (H <sub>2</sub> O) | .....(cmolc/kg)..... |      |      |        |       | (mg/kg) |                        |      | (g/kg) |
| SMP     | 6,70               | 0,10                 | 3,70 | 1,10 | 0,04   | 5,19  | 2,20    | 6,80                   | 1,12 | 15,52  |
| SDR     | 4,95               | 0,20                 | 1,40 | 1,20 | 0,15   | 2,86  | 4,00    | 2,90                   | 0,28 | 3,93   |
| Amostra | Mn                 | Fe                   | Cu   | Zn   | Areia  | Silte | Argila  | Classificação Textural |      |        |
|         | .....(mg/kg).....  |                      |      |      | %      | %     | %       |                        |      |        |
| SMP     | 253,57             | 13,72                | 2,57 | 6,26 | 76,97  | 13,15 | 9,88    | Franco-arenosa         |      |        |
| SDM     | 425,80             | 82,81                | 2,39 | 2,91 | 72,81, | 16,62 | 9,88    | Francoarenosa          |      |        |

N (método micro – Kjeldahl); / P (Digestão nitroperclórica, colorimetria); / K, Na (Digestão nitroperclórica, espectrofotometria de cahama);/ Ca, Mg, Cu, Zn, e Fe ((Digestão nitroperclórica, espectrofotometria de absorção atômica);/ Análise granulométrica (método da pipeta – Embrapa, 1997).

### 3.3. Instalação e condução do ensaio para o isolamento de rizóbios

O ensaio para isolar os rizóbios nativos das áreas em estudo foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Ciências do solo/CCA/UFC, localizado no Campus do Pici, em Fortaleza/CE, Brasil (3°45'47' de latitude sul e 38°31'23' de longitude oeste, altitude média de 47m).

As sementes crioulas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) utilizadas no ensaio foram obtidas no Laboratório de Sementes do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

A temperatura média de região é de 27 °C, com precipitações entorno de 1600 mm/ano. O clima, segundo Köeppen, é do tipo Aw e classificado como tropical quente.

A semeadura foi realizada em vasos plásticos de 500 ml contendo os solos coletados nas formas naturais (sem tratamentos) nas áreas A1 e A2.

Os vasos foram semeados com quatro sementes crioulas de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L)Walp. desinfectadas pela imersão em uma solução aquosa de etanol (95% durante 50 segundos), seguida por uma imersão em uma solução aquosa de hipoclorito de sódio (5% durante 5 minutos). Após a desinfecção as sementes foram lavadas por seis vezes em água destilada estéril para remoção de resíduos de hipoclorito. Os vasos foram irrigados com água destilada e esterilizada por autoclavagem a 1,5 atm por 2 horas para evitar contaminação por outras estirpes rizobianas não nativas. Após a germinação das sementes foi realizado um desbaste deixando-se apenas duas plantas por vaso.

### 3.4. Isolamento das estirpes rizobianas dos nódulos

Após 40 dias da semeadura, os nódulos foram coletados, selecionando-se apenas o nódulo que mais se enquadrava fenotipicamente como eficiente por planta. Os nódulos selecionados foram desinfectados por imersão em etanol (95% por 10 segundos), seguida de imersão em solução de hipoclorito a 5%, e posteriormente lavada com água destilada estéril, (DIONÍSIO *et al.*, 2016).

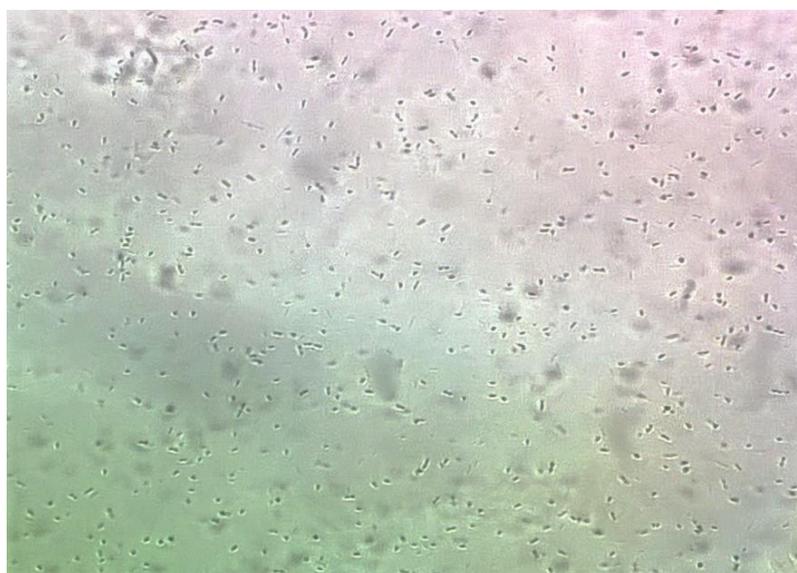
Os nódulos desinfectados foram então abertos sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um bisturi cirúrgico. Em seguida, com uma agulha estéril, foi extraída uma porção da massa de bacteroides do cerne nodular que apresentava uma coloração avermelhada pela presença de leghemoglobina, cor típica de nódulos efetivos na fixação do N<sub>2</sub> SILVEIRA, (2000).

O isolamento primário foi realizado em meio de cultura sólido de Vincent (1970) – YMB, com pH ajustado a 6,8 acrescido com o indicador vermelho congo para diferenciar, por contraste de cor, as colônias rizobianas no período de 10 dias, sob temperatura de 24 °C e na ausência de luz. Embora não seja uma forma conclusiva de diagnóstico quanto à pureza, essa diferenciação tem se mostrado útil nesse tipo de isolamento, diminuindo as probabilidades de contaminação cruzada durante o procedimento.

Após a formação das colônias foi feita uma seleção visual nas placas com vermelho congo e as colônias caracterizadas pela ausência de pigmentação vermelha foram repicadas para uma outra placa com mesmo meio alterando-se apenas o pigmento, que passou a ser o azul de bromotimol . O objetivo desse re-isolamento foi a obtenção de colônias mais puras em meio de cultura com azul de bromotimol como indicador de variações no pH do meio.

As colônias obtidas a partir dos isolados, foram avaliadas quanto a morfologia das células através da preparação de lâminas para microscopia sob luz transmitida de campo claro (FIGURA 2). Em seguida foi realizada uma repicagem das colônias selecionada para tubos de cultura contendo meio sólido para rizóbio.

**Figura 2** – Rizóbios isolados do solo contaminado por rejeito do minério de Mn, em aumento de 400 X sob microscopia ótica de campo claro, em lamina a fresco.



### 3.5. Caracterização morfológica das colônias rizobianas

A caracterização morfológica e fisiológica das colônias foi realizada em meio sólido de Vincent (1970) – YMB com azul de bromotimol e pH ajustado a 6,8, incubadas a uma temperatura de 28° C por um período que variou de 4 a 10 dias em placas de Petri, dependendo do isolado. Foram avaliadas as seguintes características: TC- tempo de crescimento (R: rápido, L: lento); CC- cor das colônias (B: branca, L: leitosa, T: transparente); TR- transparência (O: opaca, T: translúcida); EL- elevação (C: convexa, A: achatada); FM- formação de muco (A: ausente, P: presente); EM- elasticidade do muco (PF: presença de fio, AF: ausência de fio); FC- forma da colônia (R: redonda, C: cônica).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A coleta das plantas de feijão caupi utilizadas no experimento de captura de estirpes rizóbicas ocorreu aos 40 dias após o plantio. Foi observado a ocorrência de nodulação em todas as plantas colhidas. Porém, nem todos os nódulos apresentaram coloração avermelhada no seu cerne, característica típica esperada em nódulos colonizados por bactérias eficientes na fixação biológica de N, com leghemoglobina ativa SILVEIRA (2000). Por essa razão foram selecionados apenas três nódulos eficientes na fixação do nitrogênio das quatro plantas utilizadas no experimento e de cada um deles foi obtido um isolado bacteriano, sendo um isolado proveniente do solo de mata preservada adjacente à mina e os dois outros do solo contaminado por rejeito do minério de Mn.

Durante o crescimento das plantas utilizadas como isca na captura dos rizóbios nativos nos solos contaminados por manganês foi verificado que o excesso desse elemento pode ter afetado o desenvolvimento do feijão caupi, devido aos sintomas apresentados nas folhas das plantas que, segundo Malavolta (1984), são característicos de toxidez de Mn. Os sintomas apresentados caracterizavam uma clorose marginal e formação de manchas necróticas foliares, distorção das folhas mais novas (encrestamento), e redução da taxa de crescimento das plantas (Figuras - 2) e (Figura - 3) (TROEH; THOMPSON 2007).

**Figura 3** - Plântulas de feijão caupi, cultivadas em solo de mata preservada com elevada concentração de manganês e em solo degradado pelo rejeito da mineração de manganês. Com sintoma de toxidez por Mn aos 20 dias após a germinação.



Os sintomas apresentados são: clorose marginal e formação de manchas necróticas foliares e redução da taxa de crescimento das plantas.

**Figura 4** - Sintoma de toxidez por Mn em folha de feijão caupi cultivado em solos com elevada concentração de Manganês. (Clorose marginal das folhas, formação de manchas necróticas de coloração marrom)



O pH ácido dos solos em que foi realizada a captura das estirpes pode também ter tido efeito na manifestação dos sintomas de toxidez, resultados parcialmente semelhantes foram observados por Souza *et al.*, (2010), ao estudarem a absorção de Mn em plantas de soja cultivadas em solos arenosos e argilosos. Esses autores observaram que a medida que o pH da solução do solo se acidificava, maior era a absorção de Mn pelas plantas.

O número reduzido de estirpes rizobianas eficientes na fixação do nitrogênio atmosférico pode ter ocorrido por várias razões, dentre as quais a utilização de apenas uma espécie de leguminosa (feijão caupi) como cultura armadilha no isolamento, a acidez observada nos solos e a própria concentração de manganês nos solos. Entretanto sendo o feijão caupi uma leguminosa nodulífera de baixa seletividade em relação aos rizóbios que se associam, é de se esperar uma taxa de sucesso mais elevada em na obtenção de estirpes rizobianas nativas quando comparada a outras espécies de leguminosas (RUMJANEK *et al.*, 2005).

Com relação a caracterização morfológica e fisiológica das colônias formadas a partir isolados obtidos (Tabela - 2) observa-se que:

No que se refere a alteração do pH do meio de cultura, foi verificado que o isolado 2 de solo degradado pelo rejeito (2-DR) acidifica o meio de cultura e os isolados 1 do solo de mata preservada (1-MP) e 3 de solo degradado por rejeito (3-DR) apresentaram reação neutra. Todos os isolados obtidos apresentaram colônias de crescimento lento e coloração branco leitosa, opacas, com forma redonda. Os isolados (2-DR) e (3-DR) apresentaram colônias de elevação convexa, com presença de muco formador de fio. Já o isolado (1-MP) possui elevação plana, com ausência de muco e sem formação de fio.

Nas placas de petri (Figura - 5) é possível observar as formas das colônias dos três isolados rizóbios crescidos em meio YMA com azul de bromotimol em pH 6,8 em temperatura de 28° C, no décimo dias após estriamento.

Devi ser ressaltado que o crescimento lento observado pode estar relacionado à fonte de carbono utilizada (Manitol) e, em ensaios posteriores, a substituição dessa fonte de carbono por uma outra (Sacarose) deve ser testada para a confirmação do tempo de crescimento das colônias desses isolados.

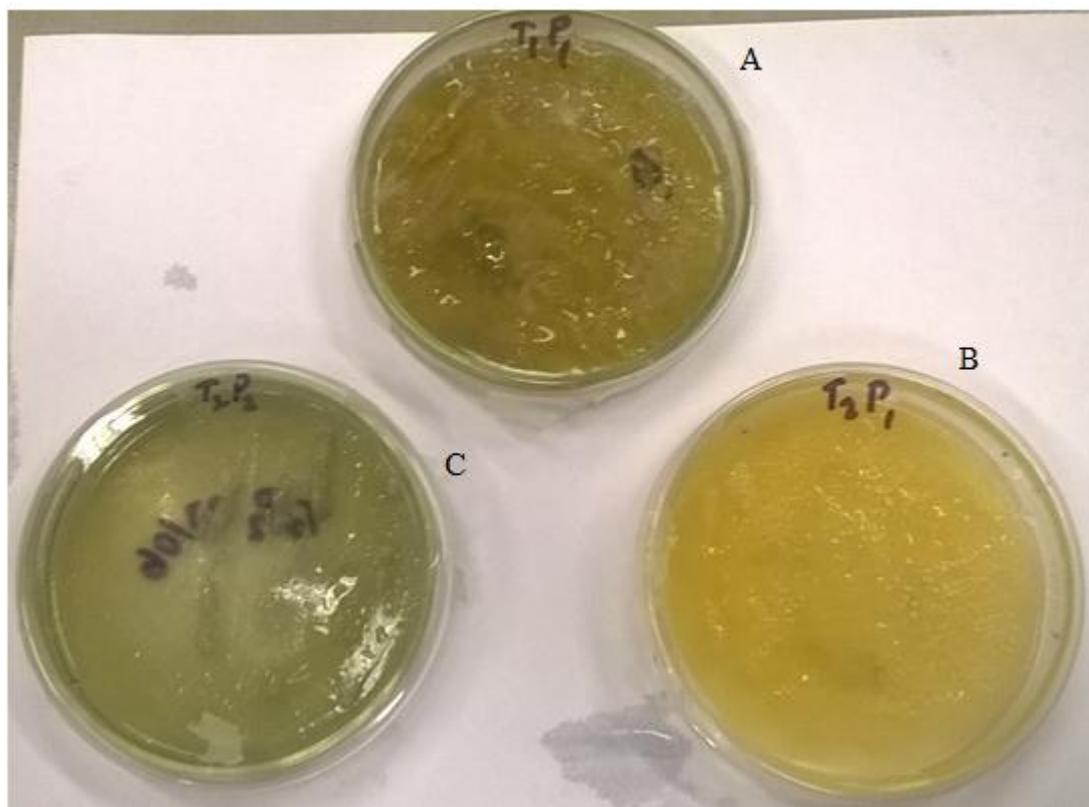
**Tabela 2** - Caracterização morfológica dos isolados: isolado 1 proveniente do solo de mata preservada (1-MP); isolado 2 proveniente do solo degradado por rejeito (2-DR); isolado 3 proveniente de solo degradado por rejeito (3-DR).

| Características das colônias        | Estirpes isoladas dos solos degradados |  |  |
|-------------------------------------|--|--|--|
|                                     | 1 - MP Isolada de mata preservada      | 2 - DR Isolada da área degradada por rejeito | 3 - DR Isolada da área degradada por rejeito |
| <b>Formação de ácido ou Álcalis</b> | Neutra                                 | Ácida  | Neutra                                       |
| <b>Tempo de crescimento</b>         | Lento                                  | Lento  | Lento  |
| <b>Corda colônia</b>                | Branco leitosa                         | Branco leitosa                               | Branco leitosa                               |
| <b>Transparência</b>                | Opaca                                  | Opaca  | Opaca  |
| <b>Elevação</b>                     | Plana                                  | Convexa                                      | Convexa                                      |
| <b>Forma da colônia</b>             | Redonda                                | Redonda                                      | Redonda                                      |
| <b>Formação de muco</b>             | Ausente                                | Presente                                     | Presente                                     |
| <b>Elasticidade do muco</b>         | Ausência de fio                        | Presença de fio                              | Presença de fio                              |

1-MP –estirpe 1 de mata preservada; 2-DR- estirpe 2 de solo degradado por rejeito; ; 3-DR- estirpe 3 de solo degradado por rejeito, Características morfológicas e fisiológicas das colônias: M FAA - formação de ácido e álcalis (ácida, alcalina, neutra); TC - tempo de crescimento (rápido, lento); CC - cor das colônias ( branca/leitosa, transparente); TR - transparência (opaca, translúcida); EL - elevação ( convexa, plana ); FC - forma das colônias ( redondas); FM- formação de muco ( ausente, presente); EM - elasticidade do muco ( presença de fio, ausência de fio).

Elevada diversidade morfológica e fisiológica também foi verificada em isolados rizobianos de feijão caupi e feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação Poços de Caldas, Minas Gerais (MELLONI *et al.*, 2006), e em isolados de solos da região semi-árida de Pernambuco (SILVA *et al.*, 2007).

**Figura 5** - Colônia do isolado rizobiano 1-MP (A), Colônia do isolado rizóbiano 2-DR (B) e Colônia do isolado rizóbiano 3-DR (C), crescidos em meio YMA com azul de bromotimol a 28° C no décimo dia após estriamento.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isoladas e caracterizadas 3 estirpes de rizóbio nos solos analisados, todos eles apresentando problemas com concentração de manganês. Tais isolados representam um material de potencial valor genético para futuros experimentos envolvendo a utilização de espécies leguminosas inoculadas com essas estirpes selecionadas em programas de reabilitação de áreas degradadas por mineração de Mn.

Existe uma elevada diversidade de estirpes rizobianas nos solos pesquisados, porém a capacidade dessas estirpes em fixar o nitrogênio atmosférico em simbiose com o feijão caupi é aparentemente bastante reduzida devido possivelmente ao pH ácido e às elevadas

quantidades de Mn nos solos.

As estirpes isoladas serão incorporadas ao banco de estirpes rizobianas do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciências do Solo do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, seguindo a codificação adotada pelo setor.

É necessária a realização de ensaios continuados com esses isolados no sentido de uma certificação plena e testes de eficiência com outras espécies de leguminosas indicadas para o plantio em áreas degradadas pela mineração de manganês.

### Referências

- ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V.; V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R., eds. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 299-352.
- ANDRADE, M. G.; MELO, V.F.; GABARDO, J. SOUZA, L.C.P.; REISSMANN, C.B, Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo: I - Fitoextração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.6, 2009. pp1879-1888
- BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOLPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 93, p.199 - 209, 2008.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; SUHET, A. R.; PERES, J.R. Qualification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to field - grown grain legume - a strategy for the practical application of the N<sup>15</sup> isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 649 - 1990.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; FIDELIS, W. R.; RIBEIRO, R.; SANTOS, G. R.; CHAGAS L. F. B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão caupi no cerrado, Gurupi-To. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 41, n. 4, p.709-714, dez. 2010.
- CHAVES, L. H. G., MESQUITA, E. F., ARAÚJO, D. L., FRANÇA, C. P. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso. **Revista Ciência Agrônômica**. v. 41, n. 2, p. 167–176, 2010.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL – DNPM. **Sumário mineral**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.dnmp.gov.br/dnmp/sumarios/sumario-mineral-2015/> acesso em 18 de julho de 2016.
- DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL – DNPM. **Sumário mineral**. Brasília, 2015. Disponível em: <[http://www.cbmina.org.br/media/palestra\\_6/T5.pdf](http://www.cbmina.org.br/media/palestra_6/T5.pdf)>. Acesso em: 22 maio 2016.
- DIONÍSIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D.; PAULA, A. M.; MACEDA, A.; MATTANA, A. L. **Guia prático de Biologia do solo**. Paraná: Sociedade brasileira de ciências do solo. Paraná, 2016. 152 p.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.44, n.9, p.1184 - 1190, 2009.
- FREIRE FILHO, F. R. **Feijão-Caupi no Brasil Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Embrapa Meio-norte. Teresina, 2011. 89 p.

GARCIA, G.; CARDOSO, A. A.; SANTOS, O. A. M. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. **Química Nova**. Sociedade Brasileira de Química, v. 36, n. 9, p. 1468-1476, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/110036>>.

GARCIA, K. G. V. **Desenvolvimento de Mimosa caesalpiniaefolia Benth colonizada com micorrizas arbusculares em solos degradados por mineração de Mn**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas. Departamento de Ciências do Solo. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 34, n. 8, p.36-43, jan. Brasília, 2005.

HERNÁNDEZ, A. G. **PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS HERBÁCEAS UTILIZANDO RIZÓBIOS ISOLADOS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO DE CARVÃO**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biotecnologia e Biociências. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma-Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2011. 21 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Pedidos de pesquisa crescem 374% no Ceará**. 2010. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/> Acesso em julho de 2016.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. 1 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2012. 470 p.

LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: Plantas como agentes de despoluição - **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**. v. 17. Curitiba, PR, 2007

LASTE, K. C. D.; GONÇALVES, F. S.; FARIA, S. M. F. **Estirpes de Rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas**. Seropédica: Embrapa, 2008. 8 p.

LIMA, A. L.; ROMAGNANO, L. F. T.; LEITE, D. C. Processos biológicos: fitorremediação. In: MORAES, S. L.; TEIXEIRA, C. E.; MAXIMIANO, A. M. S. **Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Cap. 9, p. 267. São Paulo, 2014.

MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de Azospirillum amazonense em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista Microbiologia.**, v. 15, p. 246-252, 1984.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, D. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. **G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. Seropédica: Embrapa, 1997. 14 p.

- MASCENA, A. M. **Diagnóstico da ocorrência de micro-organismos simbiotes em áreas sob processo de desertificação no município de irauçuba, ceará.** 2015. 66 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, Ciências do Solo, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- MECHI, Andréa; SANCHES, Djalma Luiz. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p.209-220, 2010.
- MELLONI, Rogério et al. 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 Ciências do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p.235-246, abr. 2006.
- MENDES FILHO, Paulo Furtado. **Potencial de reabilitação do solo de uma área degradada, através da revegetação e do manejo microbiano.** 2004. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004
- MENDES, Iêda de Carvalho; REIS JUNIOR, Fábio Bueno; CUNHA, Mariangela Hungria da. **20 Perguntas e Respostas sobre Fixação Biológica de Nitrogênio.** Embrapa, 19 p. Planaltina, 2010.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. Relatório Técnico 19 **Perfil da mineração de manganês.** Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/> Acesso em julho de 2016.
- MONTEIRO, M. T.; TAVARES, S. R. L.; BARBOSA, M.C. Caracterização de substratos a serem utilizados em um projeto de fitorremediação de sedimento de dragagem proveniente do Canal do Fundão-RJ. **XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 2005.
- MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2.ed. 729p. Ufla, Lavras: 2006.
- Neves, M.C.P; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. **Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil. I. Sertão.** Embrapa Agrobiologia. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 46). 10p, maio. Seropédica, 1998.
- NÓBREGA, Rafaela Simão Abrahão et al. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 28, n. 1, p.269-279, abr. Viçosa 2004.
- NOGUEIRA, N. O.; OLIVEIRA, O. M.; MARTINS, C. A. S; BERNARDES, C. O. Utilização de leguminosas para recuperação de áreas degradadas. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14; p. 21- 22. Goiânia, 2012.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C.; Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p.872-879, mar. Curitiba 2003.

NUNES, Y. R. F.; Mendonça A. V. R.; BOTEZELLI, L.; MACHADO, E; L. M.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Variações da fisionomia, diversidade e composição de guildas da comunidade arbórea em um fragmento de Floresta Semidecidual em Lavras, MG. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, n.2, p.213-229, 2003.

PARROTA J. A.; KNOWLES O. H. Restauração florestal em áreas de mineração de bauxita na Amazônia. In: Kageyama PY, Oliveira RE, Moraes LF, Engel VL, Gandara FB, organizadores. **Restauração ecológica de ecossistemas naturais**. FEPAF p. 307-330, Botucatu 2008.

PASCUAL, J.O. **Cuatro décadas em la simbiosis *Rhizobium-leguminosa***. Discurso leído em e lacto de su recepción como académico numerário. Academia de Ciencias Matematicas, Fisico-Quimica e Naturales de Granada, Granada 2003.

PEREIRA, P.A.; CAIRNS, J.I.; BLANA, R.A.G.; NEYRA, C.A. Assimilação e translocação de nitrogênio em relação a produção de grãos e proteína em milho (*zea mays* L.). **Revista Brasileira de Ciências de Solo**, v.5, p.28-31. Viçosa, 1981.

PINHEIRO, M. S.; SOUSA, J. B.; BERTINI, C. H. C. M.; MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M.. Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p.2071-2082, jul. Goiânia, 2014.

RUMJANEK, N. G. MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R. et al. **Feijão Caupi: avanços tecnológicos**.: Embrapa Informações Tecnológicas. p. 281-335. Brasília, 2005.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. **A formação do nódulo em leguminosas**: Embrapa. 14 p. Seropédica, 2008.

SILVA, J. S. **Simbiose de rizóbio com nove espécies florestais em viveiro do quadrilátero ferrífero**.2015. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SILVA, V. N; Silva, L. E. S. F.; Figueiredo, M. V. B.; Carvalho, F. G.; Silva, M. L. R. B.; Silva.; A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 1, p.16-21, mar. Goiânia 2007.

SOUZA, L. Q. **Fitosociologia em áreas com diferentes históricos de usos e fixação biológica de nitrogênio em Caatinga madura na Paraíba**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares,

Departamento de Energias Nucleares, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010. Cap. 2.

Neto, E. B.; Santos, C. E. S.; Stamford, N. P.

SOUZA, L. A. G.; Neto, E. B.; Santos, C. E. S.; Stamford, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p.. 207-217, Fev. Brasília, 2007.

Novais, R. F.; Alvarez, V. V.; Villan, E. M. A.

SOUZA, L. H.; , R. F.; Alvarez, V. V.; Villan, E. M. A. Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, n. 5, p.1641-1652, 10. Viçosa, 2010.

SOUZA, S. C. R.; ANDRADE, S. A. L. de; SOUZA, L. A. de; 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.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogen-acquisition by plants in a sustainable environment. In: SINGH, R.P.; JAIWAL, P.K. (Ed.). **Biotechnological Approaches to Improve Nitrogen Use Efficiency in Plants**. Houston, Studium Press. p.41-62, Texas, 2006

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3° ed. Artemed, 2004, p.719 Porto Alegre.

TROEH, FREDERICK R.; THOMPSON, LOUIS M. **Solos e fertilidade do solo**. Andrei, São Paulo 2007. 718

VIANA, F. M. P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. p. 281-335, 2005.

VIEIRA, Glaucia Eliza Gama et al. Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição no solo e água. **Engenharia Ambiental**, v. 8, n. 2, p.182-192, abr. Espírito Santo do Pinhal 2011.

SOUZA, S. C. R.; ANDRADE, S. A. L. de; SOUZA, L. A. de; 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.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogen-acquisition by plants in a sustainable environment. In: SINGH, R.P.; JAIWAL, P.K. (Ed.). **Biotechnological Approaches to Improve Nitrogen Use Efficiency in Plants**. Houston, Studium Press. p.41-62, Texas, 2006

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3° ed. Artemed, 2004, p.719 Porto Alegre.

TROEH, FREDERICK R.; THOMPSON, LOUIS M. **Solos e fertilidade do solo**. Andrei, São Paulo 2007. 718

VIANA, F. M. P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. p. 281-335, 2005.

VIEIRA, Gláucia Eliza Gama et al. Avaliação dos principais aspectos da fitorremediação aplicados na redução da poluição no solo e água. **Engenharia Ambiental**, v. 8, n. 2, p.182-192, abr. Espírito Santo do Pinhal 2011.



