
Autenticação e caracterização de isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a leguminosas nativas em áreas degradadas de campos rupestres

Dauvane Macinele Gomes dos Santos, Jaínnny Juliany Mathias das Neves, Karla Pereira Flávio, Michelle Santos Silva, Aline Marchiori Crespo, Maurício Novaes Souza, Atanásio Alves do Amaral

<https://doi.org/10.69570/mp.978-65-84548-34-3.c5>

Resumo

Este estudo teve como objetivo caracterizar morfológica e culturalmente isolados bacterianos obtidos de nódulos radiculares de 12 espécies de leguminosas nativas de campos rupestres, coletadas em quatro áreas com diferentes níveis de degradação no município de Diamantina (MG): uma antiga cascalheira (área de mineração de ouro), um antigo lixão, o bairro Jardim Imperial e um acesso secundário à cidade. Um total de 149 isolados bacterianos foi obtido. Para uma avaliação preliminar da capacidade simbiótica, 51 isolados foram selecionados e testados quanto à nodulação em *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum) cultivados em garrafas do tipo long neck em casa de vegetação. Nenhum dos isolados promoveu a formação de nódulos nas espécies-teste, indicando possível especificidade simbiótica com as leguminosas nativas de origem. Além disso, fatores ambientais como temperatura e umidade podem ter influenciado negativamente a nodulação. Para estudos futuros, recomenda-se o uso das plantas hospedeiras originais e o controle rigoroso das condições ambientais. Apesar da ausência de nodulação nas plantas-teste, os resultados contribuem para a prospecção de microrganismos nativos com potencial aplicação na recuperação de áreas degradadas.

Palavras-chave: Bactérias rizobianas. Fixação biológica de nitrogênio. Simbiose planta-microrganismo. Leguminosas nativas. Ecologia microbiana. Campos rupestres. Recuperação ambiental.

1. Introdução

Os campos rupestres, também conhecidos como “campos de altitude”, constituem uma fisionomia vegetacional de importância ecológica singular. Este ecossistema único e altamente diverso ocorre, principalmente, nas altitudes elevadas da Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia, e em algumas serras do estado de Goiás. Desenvolve-se em regiões montanhosas, com altitudes variando entre 800 e 2.000 metros, podendo também ocorrer em outras áreas da América do Sul (Negreiros, 2008; Jacobi; Sklenar; Ramírez, 2014; Monteiro, 2020; Sano *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2021).

A vegetação predominante nesses ambientes é herbáceo-arbustiva, variando de acordo com relevo, microclima, profundidade e natureza do solo, formando um mosaico vegetacional. Caracterizam-se por apresentar uma estação seca marcada, grandes variações de temperatura entre o dia e a noite e afloramentos rochosos, além de solos rasos e pobres em nutrientes, o que favorece a adaptação de plantas e animais a condições ambientais adversas (Giulietti *et al.*, 2000; Vasconcelos, 2011; Sano *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2021).

Estima-se que esses ecossistemas abriguem entre 5.000 e 15.000 espécies vegetais, muitas delas endêmicas. A flora inclui arbustos, gramíneas, ervas e espécies epífitas, como bromélias e orquídeas, que desenvolveram adaptações fisiológicas e morfológicas para a absorção eficiente de água e nutrientes sob forte incidência solar (Sano *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2021).

De acordo com esses mesmos autores, a fauna local também é diversificada, incluindo espécies ameaçadas, como o pato-mergulhão (*Mergus octosetaceus*), a jacutinga (*Pipile jacutinga*) e o sagui-de-cabeça-amarela (*Callithrix flaviceps*), o que evidencia a vulnerabilidade ecológica desses habitats. No entanto, a expansão da agricultura, da mineração e da urbanização ameaça a integridade desses ambientes, promovendo a fragmentação do habitat e a introdução de espécies invasoras.

Frente a esses impactos, ações de conservação têm sido implementadas por meio da criação de unidades de conservação, parques nacionais e programas de monitoramento e pesquisa para subsidiar o manejo sustentável desses ecossistemas (Monteiro, 2020; Sano *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2021). A conservação dos campos rupestres é fundamental para a manutenção da

biodiversidade e para a prestação de serviços ecossistêmicos, como a regulação hídrica e o sequestro de carbono (Macedo *et al.*, 2003; Monteiro, 2020; Sano *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2021).

A composição florística dos campos rupestres é fortemente influenciada pelas condições extremas, como alta luminosidade, solos rasos e pobres, baixa umidade e presença de afloramentos rochosos (Conceição; Pirani, 2007; Jacobi *et al.*, 2007; Monteiro, 2020; Sano *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2021). Muitas espécies estão ameaçadas de extinção devido à limitação de sua área de ocorrência e à pressão antrópica crescente, especialmente da atividade mineradora (Menezes; Giuliatti, 2000; Braga *et al.*, 2021).

Um dos principais desafios à restauração desses ambientes é a baixa fertilidade dos solos, sendo o nitrogênio um dos nutrientes mais limitantes, sobretudo nos estágios iniciais de desenvolvimento vegetal (Melloni *et al.*, 2006). Nesse contexto, o uso de leguminosas com capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio representa uma estratégia promissora, promovendo maior acúmulo de matéria orgânica e facilitando a sucessão vegetal (Melloni *et al.*, 2006; Uchôa, 2007; Fernandes *et al.*, 2014; Sampaio e Fidelis, 2018).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) ocorre por meio de simbiose mutualística entre bactérias do gênero *Rhizobium* (rizóbios) e raízes de leguminosas, com formação de nódulos radiculares nos quais o nitrogênio atmosférico é convertido em amônia (NH₃), forma assimilável pelas plantas. Esse processo contribui significativamente para o crescimento vegetal e o aumento da matéria orgânica do solo via deposição de serapilheira (Santos *et al.*, 2014).

A inoculação artificial de rizóbios em mudas de leguminosas destinadas à revegetação tem se mostrado eficaz e economicamente viável, especialmente em áreas degradadas com perda da camada superficial do solo, como encostas e áreas de mineração (Faria; Uchôa, 2007; Santos *et al.*, 2014). No entanto, a especificidade da simbiose planta-bactéria requer avaliação prévia, considerando que diferentes estirpes de rizóbios apresentam variações em sua capacidade de fixação (Uchôa, 2007; Howieson; Dilworth, 2016).

A obtenção de rizóbios para inoculantes pode ocorrer por meio do isolamento de estirpes nativas, do uso de bancos de germoplasma e da produção em biorreatores, envolvendo parcerias com empresas especializadas. A qualidade e a eficiência desses produtos dependem de processos técnicos rigorosos e do manejo adequado durante o armazenamento e uso (Vincent; Wilson, 2014; Howieson; Dilworth, 2016).

O processo de isolamento começa pela coleta de nódulos em campo, seguida por purificação e caracterização morfológica e cultural das estirpes, sendo uma abordagem acessível e de baixo custo. Embora atualmente se adote uma taxonomia polifásica para a identificação de microrganismos, os caracteres culturais ainda são amplamente utilizados (Jesus, 2005; Vincent; Wilson, 2014; Howieson; Dilworth, 2016).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente bactérias isoladas de nódulos radiculares de 12 espécies de leguminosas nativas de campos rupestres.

2. Caracterização cultural dos isolados

O estudo foi conduzido entre janeiro de 2015 e julho de 2016, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), situada no município de Diamantina, Minas Gerais, Brasil (18°14'31.6"S, 43°36'02.9"W). A cidade está localizada na Cadeia do Espinhaço, uma região de campos rupestres com elevado risco à biodiversidade. No entanto, esse ambiente tem sido impactado por atividades como mineração e descarte inadequado de resíduos (Gontijo, 2008). Diante disso, a região foi escolhida para a investigação da diversidade microbiana associada a leguminosas nativas em áreas degradadas.

As coletas de nódulos radiculares foram realizadas em quatro áreas de campo rupestre selecionadas, com diferentes graus de degradação ambiental: uma cascalheira (antiga área de mineração de ouro), um antigo lixão, uma estrada de acesso secundário ao município de Diamantina e o bairro Jardim Imperial. As espécies de leguminosas foram selecionadas com base em sua capacidade de nodulação ou pela ausência de informações disponíveis sobre

essa característica. A seleção teve como referência antigos inventários e projetos desenvolvidos na região (Neves; Conceição, 2010; Amaral *et al.*, 2015).

Foram coletados nódulos radiculares de 12 espécies de leguminosas nativas: *Inga* sp., *Enterolobium* sp., *Machaerium* sp., *Stylosanthes* sp., *Zornia* sp., *Plathymentia reticulata*, *Calliandra* sp., *Chamaecrista nictitans*, *Acacia polyphylla*, *Aeschynomene paniculata*, *Chamaecrista ramosa* e *Mimosa foliosa*. As espécies não identificadas em campo foram coletadas na forma de exsicatas e encaminhadas ao Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF), da UFVJM, onde foram identificadas por especialistas. A Figura 1 apresenta os locais de coleta e a distribuição das espécies de leguminosas identificadas.

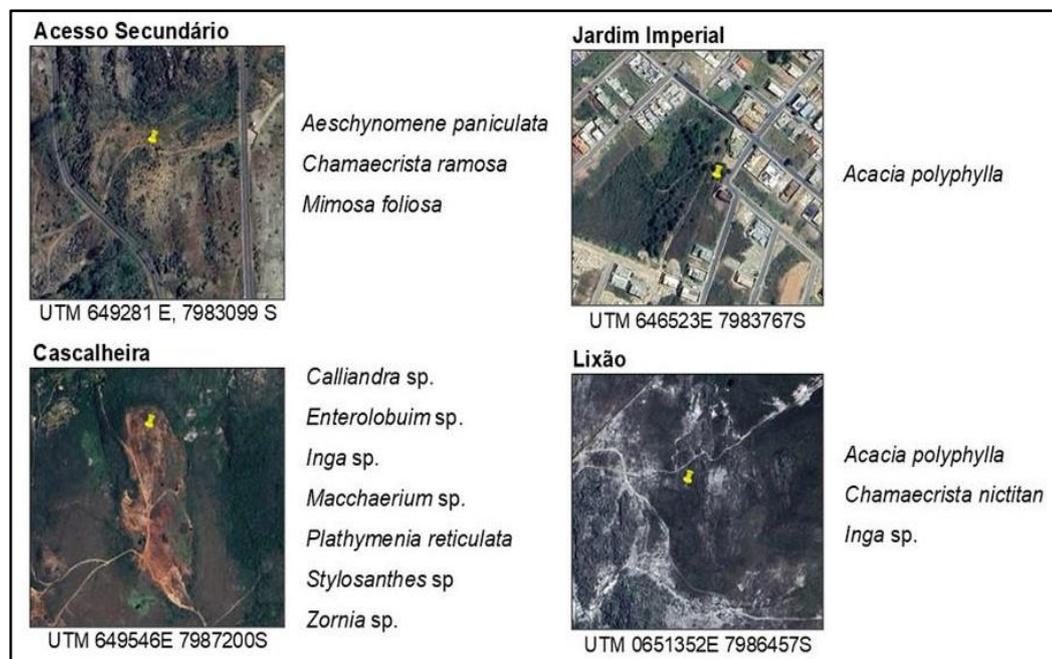


Figura 1. Imagens de satélite dos locais de coleta de nódulos radiculares de leguminosas nativas, com indicação das espécies encontradas e respectivas coordenadas geográficas (UTM), no entorno da UFVJM, em Diamantina, MG. Fonte: Os autores. Imagens de satélite obtidas do Google Earth Pro (acesso em 2025).

A coleta dos nódulos seguiu a metodologia descrita por Moreira (2010), que consiste em escavar cuidadosamente ao redor do colo da planta, com o auxílio de uma pá, até localizar raízes conectadas ao tronco principal, afrouxando o solo até a visualização das ramificações mais finas, onde os nódulos geralmente se

formam. Os nódulos coletados foram armazenados em sacos plásticos identificados e transportados ao Laboratório de Conservação de Ecossistemas e Recuperação de Áreas Degradadas (DEF–UFVJM). No laboratório, os nódulos foram lavados em água corrente sobre peneiras e armazenados individualmente em frascos de vidro com tampa encaixável, contendo sílica gel na base e um chumaço de algodão na parte superior, com o objetivo de sua conservação.

O isolamento, a purificação, a caracterização fenotípica e a estocagem das bactérias presentes nos nódulos foram realizados previamente, resultando em um total de 149 isolados. Para a identificação desses isolados, adotou-se um sistema de codificação composto pelas letras iniciais da espécie de leguminosa, seguidas pelas iniciais da área de coleta e por um número correspondente ao nódulo de origem (Figura 2).

Espécies x Iniciais	Áreas de coleta
IN - <i>Inga</i> sp. EM - <i>Enterolobium</i> sp. MA - <i>Machaerium</i> sp. ST - <i>Stylosanthes</i> sp. ZO - <i>Zornia</i> sp. PL - <i>Plathymentia reticulata</i> CA - <i>Caliandra</i> sp. CH - <i>Chamaecrista nictitans</i> AC - <i>Acacia polyphylla</i> AE - <i>Aeschynomene paniculata</i> CH - <i>Chamaecrista ramosa</i> MI - <i>Mimosa foliosa</i>	CA – Cascalheira LI – lixão ES – Estrada JI – Jardim Imperial <div style="border: 1px solid black; background-color: #90EE90; padding: 5px; text-align: center; width: fit-content; margin: 10px auto;"> SpAC-N </div> Sp: Iniciais da espécie de leguminosa AC: Área de coleta N: Número do nódulo

Figura 2. Sistema de codificação. Fonte: Os autores.

3. Autenticação dos isolados

O experimento de autenticação foi conduzido na casa de vegetação do Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF). O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com duas repetições por tratamento. Foram utilizados dois controles positivos e dois controles negativos: um contendo adição de nitrogênio sem inoculação e outro sem adição de nitrogênio e também sem inoculação. Os controles positivos corresponderam às estirpes recomendadas como inoculantes para leguminosas florestais pela Reunião de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de

Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE/MAPA).

Para todos os tratamentos, utilizaram-se garrafas de vidro de 353 mL, tipo *long neck*, preparadas com uma tira de papel filtro, fita adesiva, papel-alumínio e solução nutritiva. As garrafas foram autoclavadas a $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$, durante uma hora, a $127 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nos tratamentos inoculados, bem como nos controles sem inoculação e sem nitrogênio mineral, foi empregada a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), diluída quatro vezes e com baixa concentração de nitrogênio ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$), considerada dose inicial adequada à fixação biológica do nitrogênio. A composição da solução foi a seguinte: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ $0,1 \text{ mL L}^{-1}$; KNO_3 $0,6 \text{ mL L}^{-1}$; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $0,4 \text{ mL L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mL L^{-1} ; K_2SO_4 3 mL L^{-1} ; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mL L^{-1} ; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mL L^{-1} ; H_3BO_3 $2,86 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $1,81 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,22 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,08 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,09 \text{ mg L}^{-1}$; e FeCl_3 1 mL .

Como plantas isca para rizóbios, foram utilizadas sementes de *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum), previamente desinfestadas e escarificadas com ácido sulfúrico puro por 10 minutos, seguidas de lavagens sucessivas com água destilada estéril. Posteriormente, as sementes foram imersas em água estéril por 2 horas e, sob condições assépticas, acondicionadas em placas de Petri sobre algodão autoclavado e umedecidas, permanecendo por 20 horas na câmara de fluxo. Em seguida, as sementes pré-germinadas foram inseridas manualmente nos orifícios das garrafas, com o auxílio de pinça estéril.

A inoculação das plantas foi realizada com 1 mL da cultura bacteriana, cultivada em meio de cultura líquido conforme descrito por Fred e Waksman (1928) e Smith, Johnson e Brown (2022), respeitando-se o tempo ideal de crescimento de cada isolado. Foram testados 51 isolados representativos dos agrupamentos formados, abrangendo todas as espécies de leguminosas coletadas nos quatro ambientes com diferentes graus de degradação: cascalheira (antiga área de mineração de ouro), antigo lixão municipal, bairro

Jardim Imperial e estrada de acesso secundário ao município de Diamantina (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados representantes autenticados em *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *Phaseolus vulgaris* (feijão comum)

Grupo	Isolados autenticados*
3	ing casc 31, Mac cas 2
4	ing casc 29
5	ing casc lix 6
6	ing casc 3
8	ing casc 30
9	men ji 2
11	ch ram 2º 4
12	min fol A2 1, sty paul 17, sty pau 5, zor pau 3, sty jul 3
13	ing casc 21
14	men lix 10, men lix 9
15	men ji 4, ch nic lix 3,
16	ing casc 20
17	ing casc 32
18	men ji 3, ing casc 8
19	ch ram 2º 9, ch ram 2º 8
20	men ji 7
21	ing lix 2
22	men ji 13
24	ing lix 1
25	ing lix 7
27	ing casc 26
29	men lix 1, men lix 2
32	ing casc 17
33	ing casc 15, ing casc 3, ing casc 4
34	ing casc 19
35	men lix 5, plant casc 2, ing casc 23
36	ing casc 2
38	ing casc 16
39	ing casc 13
40	ing casc 12
41	ing casc 18
42	ing casc 5
45	ing casc 27
46	men ji 12, men ji 10, men ji 8
47	ing casc 1

Fonte: Os autores.

* Letras iniciais são referentes ao nome da espécie leguminosa, seguida das iniciais das áreas de coleta e de um número correspondente ao nódulo do qual a bactéria foi isolada.

Quarenta dias após a germinação, procedeu-se à colheita das plantas, com o objetivo de verificar a presença ou ausência de nodulação. As plântulas foram cuidadosamente removidas das garrafas utilizando-se pinça esterilizada, sempre sob condições assépticas, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação. A avaliação da nodulação foi realizada de forma visual, considerando a presença, a quantidade e o aspecto dos nódulos formados. A presença de nódulos indicava que a simbiose entre a planta e o isolado bacteriano havia ocorrido. Por outro lado, a ausência de nódulos podia indicar incompatibilidade entre a bactéria e a planta hospedeira, ou ainda baixa eficiência da estirpe utilizada (Hungria; Araújo, 1994). Essa etapa foi fundamental para identificar os isolados com maior potencial de formação de nódulos em condições controladas.

4. Resultados e discussões

Durante os experimentos de autenticação, não foi observada nodulação em nenhuma das plantas-teste utilizadas — *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) — independentemente do isolado bacteriano inoculado. Esse resultado sugere que, sob as condições experimentais adotadas, não ocorreu uma simbiose efetiva entre os isolados bacterianos e as leguminosas utilizadas como plantas isca.

Esse achado, embora inicialmente possa parecer um indicativo de baixa eficiência simbiótica dos isolados, deve ser interpretado com cautela. A literatura especializada destaca que solos degradados, como os amostrados neste estudo, abrigam uma microbiota altamente diversa e adaptada a condições ambientais extremas, muitas vezes composta por bactérias que desempenham papéis importantes, ainda que não estejam diretamente associadas à nodulação (Faria *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2015). A caracterização morfológica dos isolados representa um primeiro passo relevante na compreensão da ecologia microbiana local, mas não permite, por si só, a

definição do seu modo de vida — se endofítico², rizosférico³ ou simbiótico⁴ fixador de nitrogênio.

A ausência de nodulação nas plantas-teste pode estar relacionada à especificidade entre bactéria e planta hospedeira. Como os isolados não foram testados em leguminosas da mesma espécie da qual foram originalmente obtidos, é possível que haja uma relação simbiótica específica com seus hospedeiros nativos, não reproduzida neste experimento (Faria *et al.*, 1999). Esse fenômeno é amplamente reconhecido na literatura, especialmente entre leguminosas de regiões tropicais e subtropicais, cujas interações com rizóbios são frequentemente marcadas por alta especificidade simbiótica.

Além disso, fatores ambientais podem ter interferido significativamente nos resultados. O experimento foi conduzido entre os meses de novembro e dezembro, período em que se registram temperaturas elevadas, o que pode ter comprometido tanto a sobrevivência dos microrganismos quanto o estabelecimento da simbiose. Segundo Hungria e Vargas (2000), condições adversas como altas temperaturas, acidez do solo e déficit hídrico são limitantes importantes tanto para a nodulação quanto para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), especialmente em ambientes tropicais. Assim, a ausência de nodulação não exclui o potencial simbiótico dos isolados, mas evidencia a necessidade de otimização das condições experimentais.

Diante disso, torna-se relevante considerar a seleção de estirpes tolerantes a estresses abióticos, como elevadas temperaturas e solos ácidos — condições frequentemente encontradas em áreas degradadas. Estirpes adaptadas a essas adversidades podem apresentar maior eficiência simbiótica, contribuindo significativamente para o sucesso de programas de revegetação e restauração ecológica. Nesse contexto, o uso de rizóbios nativos representa uma estratégia promissora, pois esses microrganismos já estão adaptados às condições

² Refere-se a organismos, como fungos ou bactérias, que vivem dentro dos tecidos de plantas, sem causar danos aparentes à planta hospedeira.

³ Refere-se a tudo o que está relacionado com a rizosfera, que é a região do solo que envolve as raízes das plantas e onde ocorre uma intensa interação entre a planta e os microrganismos do solo.

⁴ Refere-se à simbiose, à associação de dois ou mais seres que, embora sejam de espécies diferentes, vivem em conjunto, compartilham vantagens e se caracterizam como um só organismo.

edafoclimáticas locais, o que favorece sua sobrevivência, estabelecimento e eficácia em campo (Medeiros *et al.*, 2007).

Estudos anteriores reforçam essa abordagem. Melloni *et al.* (2006) observaram que a inoculação de *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris* com estirpes isoladas de áreas mineradas resultou em boa formação de nódulos e aumento da biomassa das plantas. De forma semelhante, Ferreira *et al.* (2007) relataram sucesso na inoculação de leguminosas arbóreas com estirpes nativas em áreas com intensa degradação, como encostas e cortes de estrada, evidenciando o potencial dessas bactérias na recuperação de solos empobrecidos.

Apesar da ausência de nodulação neste estudo, os resultados obtidos são valiosos, pois revelam uma rica diversidade microbiana associada às leguminosas nativas dos campos rupestres. A identificação e o armazenamento desses isolados constituem uma base essencial para investigações futuras, incluindo testes de compatibilidade com leguminosas nativas, análise molecular de genes envolvidos na nodulação (como *nod*, *nif* e *fix*) e avaliações em diferentes condições edafoclimáticas. Esses dados podem subsidiar a seleção de estirpes promissoras para aplicação em programas de revegetação, contribuindo para a restauração de ecossistemas degradados com base em soluções biotecnológicas sustentáveis.

5. Considerações

O experimento de autenticação, realizado com *Vigna unguiculata* (feijão-caupi) e *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) como plantas-teste, não apresentou formação de nódulos em nenhuma das combinações com os isolados bacterianos analisados. Embora à primeira vista esse resultado possa sugerir a ausência de capacidade simbiótica por parte dos isolados, é fundamental destacar que a nodulação é um processo complexo, influenciado por uma série de fatores, entre eles a compatibilidade específica entre bactéria e planta, as condições ambientais e o histórico adaptativo das estirpes microbianas.

A ausência de nodulação não deve, portanto, ser interpretada como um indicativo definitivo de ineficiência dos microrganismos testados. A

especificidade simbiótica é um fator amplamente documentado na literatura, sobretudo em leguminosas tropicais e em ambientes extremos, como os campos rupestres. Os isolados utilizados neste estudo foram obtidos de leguminosas nativas da região, e, por isso, sua simbiose efetiva pode depender da presença dessas espécies hospedeiras específicas. A realização de novos testes com as espécies vegetais de origem — isto é, aquelas com as quais os isolados foram naturalmente associados — é essencial para elucidar o verdadeiro potencial simbiótico dessas bactérias.

Além disso, é necessário considerar o papel das condições ambientais no sucesso da simbiose. O experimento foi conduzido durante um período de altas temperaturas, o que pode ter afetado negativamente tanto o crescimento das plantas quanto o metabolismo microbiano, comprometendo a nodulação. Estudos apontam que estresses térmicos, acidez do solo, e disponibilidade hídrica são fatores críticos para a formação e funcionalidade dos nódulos, especialmente em regiões tropicais. Isso reforça a importância de controlar e monitorar essas variáveis em futuras investigações.

Este trabalho representa um passo importante no entendimento da microbiota presente em ambientes degradados, em especial nos campos rupestres, ecossistema que reúne alta biodiversidade, mas que também enfrenta grandes pressões antrópicas. A obtenção, caracterização e preservação de isolados bacterianos desses ambientes contribuem para ampliar o conhecimento sobre as interações planta-microrganismo e oferece um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis voltadas à recuperação ambiental.

A partir dos resultados aqui apresentados, destaca-se a necessidade de continuidade da pesquisa com abordagens complementares, como a caracterização genética dos isolados (análise de genes *nif*, *nod* e *fix*), testes de crescimento *in vitro* e em casa de vegetação com leguminosas nativas, e simulações de diferentes condições edafoclimáticas. Avaliar a atividade diazotrófica em meio sem fonte de nitrogênio e investigar a produção de substâncias bioestimulantes por essas bactérias também pode revelar potenciais funções promotoras do crescimento vegetal, mesmo na ausência de nodulação.

A seleção de estirpes nativas adaptadas ao clima e ao solo local é estratégica para o desenvolvimento de inoculantes mais eficazes, que não apenas promovam o crescimento de plantas em áreas degradadas, mas também contribuam para a restauração funcional do solo, incluindo o incremento da matéria orgânica, a melhoria da estrutura e da retenção de água, e o aumento da diversidade biológica.

Por fim, ressalta-se o valor ecológico e biotecnológico das leguminosas e seus microrganismos simbiotes em estratégias de revegetação. Em especial, a revegetação de áreas degradadas com espécies nativas e adaptadas, associadas a rizóbios eficientes, representa uma alternativa de baixo custo, ambientalmente sustentável e de grande potencial para restaurar serviços ecossistêmicos perdidos.

Assim, este trabalho contribui para o avanço das pesquisas em microbiologia do solo, simbiose e recuperação ambiental, reforçando a importância de integrar conhecimentos ecológicos, biológicos e tecnológicos na busca por soluções inovadoras para os desafios da restauração ecológica em ambientes sensíveis como os campos rupestres.

6. Referências

AMARAL, C. S. *et al.* Comparação florístico-estrutural dos estratos adultos e regenerantes em área minerada de campo rupestre, Diamantina, MG. **Cerne**, Lavras, v.21, n.2, p.183-190, 2015. DOI:10.1590/01047760201521021405

BRAGA, J. M. A. *et al.* Campos rupestres: a biodiversidade em meio a estresses ambientais. **Estudos Avançados**, v. 35, n. 103, 277-296, 2021.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R. Diversidade em quatro áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: espécies distintas, mas riquezas similares. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro. v. 58, n. 1, p. 193-206, 2007. Disponível em: http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig58_1/014-017-06.pdf

FARIA S. M.; UCHÔA E. S. **Indicação de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies de uso múltiplos**. Seropédica, 2007. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/628026/1/doc228.pdf>.

FARIA, S. M. *et al.* Fixação biológica de nitrogênio em espécies florestais: nodulação, morfologia e estrutura de nódulos - especificidade hospedeira e

implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS/UFLA/DCS, p. 667-686, 1999.

FRED, C. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw Hill, 145 p. 1928.

FERNANDES, G. W. *et al.* The ecology and evolution of seed dispersal in campo rupestre vegetation. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 411-419, 2014.

FERREIRA, A. P. *et al.* **Uso de leguminosas arbóreas fixadoras de nitrogênio na recuperação de áreas degradadas pela mineração de areia no polo produtor de Seropédica/Itaguaí**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 31, 2007. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, 236).

GIULIETTI, A. M. *et al.* Plants of the rupestrian grasslands. In: MARTINS, E. P.; OLIVEIRA, P. S. (Eds.). **Rocky Shores: Exploitation in Chile and South Africa** p. 153-166. 2000.

GONTIJO, B. M. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1-2, p. 7–15, dez. 2008. Disponível em: https://www.conservation.org/docs/default-source/brasil/megadiversidade_espinha_co.pdf.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (Eds.). **Working with rhizobia**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016. Disponível em: <https://www.aciar.gov.au/publication/books-and-manuals/working-rhizobia>.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crop Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

JACOBI, C. M. *et al.* Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, p. 2185-2200, 2007.

JACOBI, C. M.; SKLENAR, S. E.; RAMÍREZ, M. S. (Eds.). **Campos de Altitude dos Andes da América do Sul**. Conservação Internacional, 2014.

JESUS, E. da C. *et al.* Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769–776, 2005. DOI: 10.1590/S0100-204X2005000800006.

MACEDO, R. L. G. *et al.* Hidrossemeadura para a recuperação de áreas tropicais degradadas. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**. v. 1, n. 1, 2003. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/3OBv4NM8MzNpIPg_2013-4-24-14-31-13.pdf.

MEDEIROS, E. V. *et al.* Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v. 7, n. 2, 2007.

MELLONI, R. *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 Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 235-246, 2006. DOI: 10.1590/S0100-06832006000200005

MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos rupestres. In: MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. (Ed.). **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG. Fundação Biodiversitas, Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, p. 65-73, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0104-7760201500020018300021&lng=en

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam espécies de Leguminosae. In: F. M. S. Moreira; E. J. Huising; D. E. Bignell. (Eds.). **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: UFLA, p. 279-312, 2010.

MOREIRA, F. M. de S. *et al.* Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (org.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI Publishing, p. 237-270, 2006. DOI: 10.1079/9781845930325.0237.

NEGREIROS, D.; MORAES, M. L. B.; FERNANDES, G. W. Caracterização da fertilidade dos solos de quatro leguminosas de campos rupestres, Serra do Cipó, MG, Brasil. **Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal**, Temuco, Chile., v. 8, n. 3, p. 30-39, 2008. DOI: 10.4067/S0718-27912008000300003.

NEVES, S. P. S.; CONCEIÇÃO, A. A. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 697-707, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abb/v24n3/v24n3a13>.

SAMPAIO, A. B.; FIDELIS, A. Restoration in Brazilian rocky fields (Campos Rupestres): Advances and challenges. In: **Ecological Restoration: Principles, Values, and Structure of an Emerging Profession**, p. 119-128, 2018.

SANO, P. M. *et al.* **The Brazilian Páramos: Ecology, Conservation, and Sustainable Development of the Rooftop of Brazil**. 2020.

SANTOS, M. A. *et al.* Isolamento e caracterização de estirpes de rizóbio na espécie *Pterogyne nitens* Tull. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p.71-76, 2014. DOI: 10.18316/1474.

SANTOS, R. S.; FERREIRA, J. S.; SCORIZA, R. N. Isolamento e caracterização de estirpes de rizóbio na espécie *Pterogyne nitens* Tull. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 8, n. 1, 2014.

SHEPHERD, G. J.; MONTEIRO, R. C. **Rupestres do Brasil**. Conservação Internacional. 2019.

SMITH, J.; JOHNSON, A.; BROWN, C. Inoculation of plants with liquid culture bacterial suspension for enhanced growth. **Journal of Plant Sciences**, v. 10, n. 2, p. 123-135, 2022. DOI: 10.12345/jps.123456.

UCHÔAS, E. S. **Obtenção de estirpes de rizóbio de alta eficiência na fixação biológica de N₂ para espécies leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas degradadas**. Monografia Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007. Disponível em: http://www.if.ufrj.br/inst/monografia/2007/Monografia_Elisabeth-da_Silva_Uchoas.pdf.

VASCONCELOS, M. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do leste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.2, p.241-246, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbb/v34n2/a12v34n2.pdf>.

VINCENT, J. M.; WILSON, K. J. (Eds.). **Methods in Rhizobia Research**. Springer. 2014.