



ANDRESSA KALCK KISTER

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE ÁREA DE MINERAÇÃO
DE MANGANÊS**

Ji-Paraná
2020

ANDRESSA KALCK KISTER

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE ÁREA DE MINERAÇÃO
DE MANGANÊS**

Artigo apresentado à Banca Examinadora do Centro Universitário São Lucas de Ji-Paraná, como requisito de aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof^o. Msc. Marcos Giovane Pedroza de Abreu

Ji-Paraná
2020

K61i

Kister, Andressa Kalck

Isolamento e caracterização de rizóbios de área de mineração de manganês / Andressa Kalck Kister. Ji-Paraná: Centro Universitário São Lucas, 2020.

19 p. il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Centro Universitário São Lucas, Curso de Agronomia, Ji-Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Msc. Marcos Giovane Pedroza de Abreu

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Metais pesados. 3. *Vigna unguiculata*. I. Abreu, Marcos Giovane Pedroza de. II. Isolamento e caracterização de rizóbios de área de mineração de manganês. III. Centro Universitário São Lucas.

CDU 631.46

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário:
José Fernando S Magalhães CRB 11/1091

ANDRESSA KALCK KISTER

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE ÁREA DE MINERAÇÃO
DE MANGANÊS**

Artigo apresentado à Banca Examinadora do Centro
Universitário São Lucas de Ji-Paraná, como requisito de
aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof^o. Msc. Marcos Giovane Pedroza de Abreu

Ji-Paraná, _____ de 2020.

Avaliação/ Nota:

BANCA EXAMINADORA

: _____

Orientador

Prof^o. Msc. Marcos Giovane Pedroza de Abreu

Centro Universitário São Lucas

Membro da Banca

Prof^o. Msc. Celso Pereira de Oliveira

Centro Universitário São Lucas

Membro da Banca

Prof^o. Msc. Alisson Nunes da Silva

Centro Universitário São Lucas

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida e por estar sempre comigo, mesmo nas horas mais difíceis, por me dar sabedoria, discernimento, entendimento e a direção, por estar sempre ao meu lado me protegendo e me guiando. Permitindo assim mais essa vitória e a realização de um sonho, por ter me proporcionado uma família abençoada que eu amo e admiro cada um com suas particularidades, mas são exemplo vida, família a qual eu tenho orgulho de fazer parte.

Aos meus pais, Fredolino Kister e Clemilda Kalck Kister por estar sempre ao meu lado me dando força, sempre uma palavra de ânimo, me orientando e depositado a confiança em mim e só Deus para retribuir o amor, carinho, atenção, orações e todo esforço que fizeram para que eu pudesse chegar até aqui aonde eu cheguei, meu muito obrigado por tudo. Eu amo muito vocês!

Agradeço a minha família e meus irmãos que chegando ao final dessa trajetória, fez uma enorme diferença, me dando confiança e força para seguir em frente, dia após dia.

Agradeço ao meu orientador Mr. Marcos Giovane Pedroza de Abreu, que se colocou a disposição para estar me auxiliando e me orientando com toda a atenção e aos meus professores Alan Antônio Miotti, Celso Pereira de Oliveira, Alisson Nunes, Cristiano Costenaro Ferreira e Joseane Bessa meu muito obrigada por todo o ensinamento ministrado, e por sempre estarem dispostos a ajudar nas iniciativas que tomamos que foi fundamental durante a graduação.

Aos meus amigos que se fizeram presente nessa trajetória Thiago Vinicio Guerson, Darllan Junior Luiz Santos Ferreira de Oliveira, Mikaandro Effgen, Juliana Figueredo, Ligia Araujo, Adriely Venturini, Sabrina dos Santos e Alcineide Teixeira, e aos demais que não coloquei os nomes, que juntos passamos por vários momentos que ficarão marcados sempre no meu coração, obrigado por todo companheirismo, ajuda e paciência.

Obrigada por tudo!

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE MANGANÊS

Andressa Kalck Kister¹

RESUMO

A exploração mineral é uma atividade de importância econômica global, no entanto, é responsável por uma série de impactos ambientais, incluindo degradação do ecossistema e perda de biodiversidade. Na maioria dos casos, baixo teor orgânico, baixa fertilidade do solo, pH ácido, estrutura física pobre e principalmente altas concentrações de metais pesados no solo como o manganês (Mn) são os principais fatores que restringem o desenvolvimento de espécies vegetais em áreas de mineração. Diante disso objetivou-se isolar, autenticar e caracterizar estirpes de rizóbios em área de mineração de manganês. Inicialmente, os isolados foram obtidos a partir de solo da área de mineração do Mn, utilizando espécies de feijão caupi como plantas isca. Em seguida, esses isolados foram autenticados e caracterizados morfológicamente. Os dados obtidos foram tabulados em planilhas e tabelas por meio da utilização do software Excel®. Os isolados de feijão-caupi apresentaram variabilidade quanto as características morfológicas, pH do meio, tempo de crescimento, cor e transparência das colônias e elasticidade. Apesar de haver algumas semelhanças entre os isolados, podemos observar que provavelmente, mesmo nas condições de degradação em que as áreas se encontram, aqui citando principalmente a área degradada e o rejeito de mineração ainda pode-se observar uma pequena diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de realizar simbiose com leguminosas. Conclui-se que as plantas de feijão-caupi foram capazes de formar nódulos com isolados das estirpes de rizobio tanto da área de mata nativa, área degradada e da área do rejeito e de acordo com as características morfológicas dos isolados parece haver ainda uma diversidade de bactérias fixadoras de N₂ nestas áreas.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio. Metais pesados. *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

Mineral exploration is an activity of global economic importance, however, it is responsible for a series of environmental impacts, including degradation of the ecosystem and loss of biodiversity. In most cases, low organic content, low soil fertility, acidic pH, poor physical structure and especially high concentrations of heavy metals in the soil such as manganese (Mn) are the main factors that restrict the development of plant species in mining areas. Therefore, the objective was to isolate, authenticate and characterize strains of rhizobia in the manganese mining area. Initially, the isolates were obtained from soil in the Mn mining area, using cowpea species as bait plants. Then, these isolates were authenticated and morphologically characterized. The data obtained were tabulated in spreadsheets and tables using the Excel® software. The isolates of cowpea showed variability in morphological characteristics, pH of the

¹ Andressa Kalck Kister, graduanda em agronomia pelo Centro Universitário São Lucas, 2020/1.

medium, growth time, color and transparency of the colonies and elasticity. Although there are some similarities between the isolates, we can see that probably, even in the degradation conditions in which the areas are found, here mainly citing the degraded area and the mining tailings, a small diversity of nitrogen-fixing bacteria can still be observed capable of symbiosis with legumes. It was concluded that the cowpea plants were able to form nodules with isolates of rhizobium strains from both the native forest area, degraded area and the tailings area and according to the morphological characteristics of the isolates there still seems to be a diversity of N₂-fixing bacteria in these areas.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Heavy metals. *Vigna unguiculata*.

1. INTRODUÇÃO

O manganês (Mn) é considerado um micronutriente essencial para as plantas e desempenha um papel importante no metabolismo e na ativação de diferentes enzimas (LAMBERS et al., 2015).

No entanto, o excesso de manganês no solo pode gerar toxidez nas plantas (XUE et al., 2004; MIN et al., 2007; PENG et al., 2008), que apresentam sintomas de manchas marrons, clorose e necrose nas folhas velhas e atrasos no crescimento das plantas (BALDISSEROTO et al., 2007; YANG et al., 2013).

A simbiose comum de plantas da família das leguminosas com bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos aumenta a eficiência e a capacidade de incorporação de Carbono (C) e Nitrogênio (N) ao solo, pois, o nitrogênio fixado biologicamente é prontamente absorvido pelas plantas, não ocorrendo a lixiviação para o lençol freático e mananciais, tornando-o mais eficaz na absorção de nutrientes e aumentando a tolerância da planta às cargas ambientais (FRANCO e BALIERO, 2000).

No entanto, a fim de utilizar efetivamente os recursos naturais para a reabilitação de áreas alteradas por atividades de mineração, é necessário um programa de seleção de espécies florestais com potencial para uso na regeneração, bem como cepas eficientes na fixação biológica de nitrogênio e, assim, permitir que as plantas hospedeiras se tornem total ou parcialmente independente da fertilização mineral com este elemento.

Uma das restrições à revegetação de áreas mineradas é a fertilidade do solo, sendo o nitrogênio considerado um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento das plantas. Portanto, uma maneira importante de disponibilizar nitrogênio em áreas

de extração de minério é o uso de espécies vegetais capazes de simbiose Bactérias que nodulam Leguminosas e Fixam o N₂ atmosférico (BNLFN) (FRANCO e FARIA, 1997). A maior diversidade do BNLFN pode promover simbiose com várias espécies de leguminosas e maximizar a fixação biológica de nitrogênio em áreas degradadas. Além disso, quanto maior a variedade de espécies, maior a resistência dos processos microbiológicos do solo.

Diante do exposto o objetivo desse trabalho foi isolar, autenticar e caracterizar estirpes de rizóbios em área de mineração de manganês.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Áreas degradadas por mineração

A recuperação de áreas degradadas é um processo que está sendo constantemente aprimorado requer conhecimento, tecnologia e monitoramento constante.

É sobre criar condições a fim de restaurar redes complexas de relações ecológicas entre solo, plantas, animais e microclima que permitem a restauração dinâmica do equilíbrio da natureza hoje sem essas condições (REIS, ZAMBONIN E NAKAZONO, 1999).

O maior objetivo da recuperação do ambiente deve ser tentar restaurar estruturas e funções fatores ecológicos que existiam no ecossistema antes da degradação (AUMOND, 2003).

Especialistas sugerem restaurar áreas degradadas pela mineração, antes do início da mineração (BARTH, 1989; IBAMA, 1990). Pré-definido o futuro dos locais degradados, planos para remover a cobertura vegetal e as camadas da superfície, gerenciando a forma da paisagem de mineração e restaurando juntamente com a exploração, são medidas para reduzir os custos de controle ambiental, tornando as atividades de mineração menor e mais lucrativo.

O impacto da mineração no meio ambiente pode ser intenso e extenso. Em termos de intensidade, o impacto da mineração depende de vários fatores, dos quais podemos destacar a topografia original, o volume total de material extraído, o método de mineração, as características do material extraído e a proporção de resíduos

estéreis de minério (GRIFFITH, 1980; ZIMMERMANN e TREBIEN, 2001; COLTURATO, 2002).

Quanto à extensão, destaca-se a erosão do material da superfície pela chuva, que contamina os recursos hídricos, refletindo em toda a bacia hídrica (DEDECEK, 1996; DIAS e GRIFFITH, 1998).

A maioria das agências ambientais exige a adoção de práticas calculadas de acordo com as referências ao desenvolvimento e implementação do Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD). Permitir a geração de riqueza sem transferir as obrigações ambientais das atividades de mineração para a sociedade e as gerações futuras é uma diretriz que levou à exigência de preparação e implementação do PRAD.

A mineração no Brasil agora exige aprovação prévia do setor uma política ambiental do governo que usa o PRAD para sistematizar e operacionalizar os princípios de desenvolvimento sustentável. O PRAD deve ser apresentado ao órgão de proteção ambiental apropriado após a emissão da licença anterior - LP para mineração. Em seguida, será analisada e a Licença de Instalação – (LI) será emitida somente após a aprovação dos técnicos do governo.

2.2 Importância do uso de leguminosas na revegetação de áreas degradadas por mineração

A restauração de áreas degradadas pode ser realizada com o uso de espécies de leguminosas capazes de formar simbiose com bactérias que fixam nitrogênio atmosférico e fungos micorrízicos, bem como com plantas herbáceas, essa técnica pode ser considerada de baixo custo e com bons resultados.

De acordo com Azevedo et al. (2007), o uso de leguminosas para recuperar áreas degradadas apresenta diversas vantagens, devido à sua existência em um grande número de espécies que são encontradas em diferentes regiões do Brasil e pela facilidade na obtenção de sementes. No entanto, a principal preferência de uso leguminosas seria devido à sua característica especial em relação a outras plantas, ou seja, a capacidade de se associar a microrganismos do solo, como bactérias fixadoras de nitrogênio que transformam nitrogênio do ar em compostos nitrogenados

disponíveis para vegetais, tornando o estabelecimento parcial ou totalmente independente de contribuição externa nutriente.

A fixação biológica de nitrogênio realizada por rizobio em simbiose com leguminosas são importantes para os programas de recuperação do solo degradado, geralmente com deficiência de nitrogênio, devido à perda intensiva matéria orgânica (TRANNIN et al., 2001).

As leguminosas também são importantes no processo de estabilização da matéria orgânica do solo, a cada 10 em unidades de carbono sequestrados, é necessária imobilização de uma unidade de nitrogênio (SISTI et al., 2004).

2.3 Efeito do manganês (Mn²⁺) na simbiose leguminosa-rizóbio

O manganês desempenha um papel fundamental na catálise de vários processos enzimáticos e na transferência de elétrons. Valdez et al. (2000) mencionam que o Mn²⁺ pode regular a fixação biológica do N em condições de seca. Isso se deve ao fato de que a enzima amido hidrolase responsável pela degradação dos ureídeos nas folhas depende do Mn²⁺, sob estresse hídrico, o suprimento de manganês pode ajudar a manter a fixação biológica de nitrogênio.

A eficiência de fixação do nitrogênio também está relacionada ao pH e à disponibilidade de alguns nutrientes do solo. Para obter um bom desempenho das bactérias, o solo deve ter um pH de cerca de 6,5. O alto nível de alumínio trocável e íons H⁺ prejudica o desenvolvimento radicular, o crescimento dos rizóbios e a infecção radicular (SILVA et al., 2002).

Alterações no pH da rizosfera das plantas que fixam N₂ parecem ter papel fundamental na absorção de micronutrientes, cuja disponibilidade depende de alterações na acidez do solo.

A relação entre o pH da rizosfera e a absorção de Mn é muito complexa. No solo, o elemento está presente em um amplo espectro de formas, mas é geralmente aceito que uma diminuição no pH rizosférico promove redução e aumenta a concentração de Mn²⁺, aumentando sua absorção pelas plantas. A adição de calcário em solos ácidos reduz a disponibilidade de Mn para a soja (TANAKA ET AL., 1990; Oliveira Jr. et al., 2000), e um aumento na produção de matéria seca em resposta às doses de Mn no solo ocorre em níveis de pH acima de 6,8 (OLIVEIRA ET AL., 1997).

Foi observado um comportamento diferente entre as cultivares em termos de eficiência de absorção e / ou uso de Mn em condições de disponibilidade limitada no solo. Variedade Paranaíba, segundo Oliveira et al. (1997), apresenta sintomas visuais de deficiência de Mn, embora não estejam associados à produção de matéria seca, iniciando em pH 6,8.

Novais et al. (1989) observaram um sintoma de deficiência de Mn nas folhas inferiores das plantas de soja, para pH acima de 6,5, em solo com textura média.

A quantidade de Mn dissolvido na rizosfera é muito maior do que na solução do solo (GODO E REISENAUER, 1980). As raízes das plantas sensíveis à deficiência de Fe podem levar ao aumento da mobilização de Mn^{2+} na rizosfera e estimular a absorção desse elemento (MARSCHNER et al., 1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e coleta de solo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Microbiologia do Solo, ambos pertencentes ao Departamento de Ciências do Solo (DCS) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Campus do Pici, em Fortaleza, Ceará. Segundo a classificação de Köppen o clima da região é caracterizado como sendo do tipo Aw' (Tropical quente) com temperatura e precipitação media anuais de 27 °C e 1600 mm respectivamente, situando-se nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 3°45'47' S e 38°31'23' W, com altitude média de 47m.

Amostras de solo foram coletadas em uma área de mineração de manganês, situada no município de Ocara – CE. Foram coletadas amostras de solo considerando a camada de 0-20 cm de três áreas distintas, sendo: Área 1 (Lat.:4°30'17.82''S; Long.: 38°31'22.89''O) considerada uma área de mata nativa preservada e adjacente à área de mineração; Área 2 (Lat.:4°30'14.05''S; Long.:38°31'17.65''O) área degradada pelo processo de extração mineral e Área 3 (Lat.:4°30'22.36''S; Long.:38°31'20.50''O) a amostra foi coletada diretamente do rejeito gerado pelo processo de extração mineral.

Amostras de solos de cada área foram destorroadas e peneiradas em peneira de abertura de malha de 2 mm para obtenção da TFSA (Terra Fina Seca ao Ar) e posteriormente utilizadas para realização de análises quanto às suas características

químicas e físicas de acordo com metodologias propostas por Teixeira et al. (2017). Os resultados das análises do solo são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização química e física dos solos de área de mata (área 1), área degradada (área 2) e rejeito (área 3).

Propriedade	Mata Nativa	Área Degradada	Rejeito
pH (H ₂ O)	7,03	5,30	5,03
K (mg dm ⁻³)	12,22	7,04	6,06
P total (mg dm ⁻³)	132,57	24,68	5,80
Ca ²⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	5,7	2	2,7
Mg ²⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	2,08	1,48	1,42
Al ³⁺ (Cmol _c dm ⁻³)	0	0,1	0,1
H+Al (Cmol _c dm ⁻³)	0,9	3,3	2,2
SB (Cmol _c dm ⁻³)	7,8	3,5	4,1
t (Cmol _c dm ⁻³)	7,8	3,6	4,2
T (Cmol _c dm ⁻³)	8,7	6,8	6,3
V (%)	89,7	51,4	65,2
m (%)	0	2,8	2,4
CO (g kg ⁻¹)	39,5	24,6	15,2
N (g kg ⁻¹)	1,25	0,63	0,82
Zn (mg dm ⁻³)	5,23	1,67	1,17
Fe (mg dm ⁻³)	5,15	5,11	6,93
Mn (mg dm ⁻³)	332	421	516
Cu (mg dm ⁻³)	1,82	2,56	1,61
Areia (g kg ⁻¹)	808,2	227,6	669,2
Silte (g kg ⁻¹)	77,7	387,4	173,7
Argila (g kg ⁻¹)	113,9	385	157

Nota. SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca de cátions; V (%): saturação por bases; m (%): saturação por alumínio.

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Feijão-caupi) foi utilizada inicialmente como planta isca para a captura de bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN) nativas existentes nos solos coletados da área de mineração de manganês. Para este estudo foram utilizadas sementes da cultivar moita branco, adquiridas junto à comunidade fazenda massapé, no município de Monsenhor Tabosa - CE.

3.2 Isolamento, Autenticação e Caracterização cultural de estirpes nativas de BFNN de área de mineração de manganês

O isolamento de estirpes de BFNN nativas foi realizado em casa de vegetação, onde foram utilizados vasos plásticos de 500 mL contendo solo das três áreas avaliadas, semeados com quatro sementes, usando-se como planta-isca a espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. As sementes utilizadas no plantio foram 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.

As plantas foram irrigadas diariamente com água destilada e esterilizada por autoclavagem a 121°C e 1 atm de pressão por 2 horas. Semanalmente foi aplicado 150 mL da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com omissão de N, de forma fracionada (três vezes na semana).

As plantas de feijão-caupi foram coletadas 35 dias após semeadura para a retirada de nódulos mais representativos da região radicular. Os nódulos coletados foram desinfectados superficialmente por imersão em solução de etanol a 95% durante dez segundos para quebra da tensão superficial e remoção de bolhas de ar do tecido, seguido de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 10 % durante dez minutos para desinfecção superficial e em seguida, lavada em água esterilizada para retirada do excesso de hipoclorito de sódio por cinco vezes (DIONÍSIO et al., 2016).

Os nódulos desinfestados foram abertos sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um bisturi cirúrgico e, em seguida, com uma agulha estéril, foi extraída uma porção da massa de bacteroides do cerne nodular que apresentaram a coloração avermelhada, caracterizado pela presença de leghemoglobina, cor típica de nódulos eficientes na fixação do N₂ (HUNGRIA e ARAUJO, 1994). O conteúdo da gota foi repicado para outra placa de Petri contendo meio de cultura sólido de Vincent (1970) – YMA, com pH ajustado a 6,8, acrescido com o pigmento vermelho congo a 1 % em solução aquosa com a finalidade inicial de evidenciar alguma contaminação.

As placas foram incubadas por um período de 12 dias na ausência de luz em estufa bacteriológica regulada a 28 °C até a formação de colônias visíveis de cor clara

devido a não absorção do vermelho congo, indicação de que possivelmente trata-se de uma colônia de rizóbio sem contaminação. Após 12 dias, as colônias de coloração clara foram repicadas para uma nova placa de Petri contendo meio “YMA” de Vincent (1970) sólido, acrescido com o indicador azul de bromotimol e incubadas novamente sob as mesmas condições.

Para a realização da autenticação das estirpes isoladas, as mesmas foram inoculadas novamente em plantas de feijão-caupi utilizando-se vasos plásticos de 500 mL contendo 400 g de areia lavada (para remoção dos sais) e autoclavada por 2 horas, a 1 atm de pressão e temperatura de 121 °C. Em cada vaso plástico foram semeadas três sementes, desinfectadas superficialmente, com quatro repetições para cada isolado.

As estirpes inoculadas nas sementes foram multiplicadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura “YMB” de Vincent (1970), acrescido de azul de bromotimol e mantidos sob agitação até atingirem uma concentração de 10⁹ células por mL de caldo (quantificado em câmara de Neubauer). Posteriormente, foram aplicados assepticamente 3 mL do caldo rizobiano às sementes da espécie leguminosa por ocasião do plantio e, após cinco dias da germinação das sementes, será realizada uma aplicação de reforço (3 mL) no colo de cada plântula recém emergida. Após a observação da formação dos nódulos nas raízes das plantas, as estirpes provenientes dessa autenticação serão novamente isoladas e incubadas para posterior utilização nos experimentos seguintes.

Após o período de 12 dias essas colônias foram caracterizadas morfológicamente de acordo com Vincent (1970), quando foram analisadas as seguintes características: reação a técnica de Gram, pH do meio, tempo de crescimento-TC; cor das colônias-CC; transparência-TR; elevação-EL; formação de muco-FM; Elasticidade do muco-EM; forma da colônia-FC.

Também foi realizado uma caracterização fenotípica dos isolados autenticados, baseado em características morfológicas avaliadas nas plantas e em relação a nodulação, sendo: altura da planta (cm), coloração da parte aérea (verde intenso ou verde claro), posição dos nódulos na raiz (principal ou ramificada), forma e superfície nodular (globoso, rugoso), frequência nodular (muito numeroso ou pouco numerosos) e coloração do cerne nodular (intenso, médio, fraco).

Os dados obtidos foram tabulados em planilhas e tabelas por meio da utilização

do software Excel®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Vigna unguiculata* utilizada como planta isca para captura de BFNN foi capaz de realizar simbiose efetiva com estirpes nativas da área de mineração de manganês nas diferentes áreas amostradas. Foram autenticados cinco isolados de BFNN para a área de mata, cinco isolados da área degradada e três isolados do rejeito da mineração, num total de quinze isolados submetidos a autenticação (Tabela 2).

Tabela 2 – Isolados de bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN) da área de mineração de manganês autenticadas em associação com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Isolados	Hospedeiro	Origem
FCI1	Feijão-caupi	Área de mata
FCI2	Feijão-caupi	Área de mata
FCI3	Feijão-caupi	Área de mata
FCI4	Feijão-caupi	Área de mata
FCI5	Feijão-caupi	Área de mata
FCI6	Feijão-caupi	Área degradada
FCI7	Feijão-caupi	Área degradada
FCI8	Feijão-caupi	Área degradada
FCI9	Feijão-caupi	Área degradada
FCI10	Feijão-caupi	Área degradada
FCI11	Feijão-caupi	Rejeito
FCI14	Feijão-caupi	Rejeito
FCI15	Feijão-caupi	Rejeito

A caracterização cultural e morfológica dos isolados autenticados e selecionadas para o ensaio sobre o efeito do manganês no crescimento e nodulação de feijão-caupi estão listadas na tabela 3. Pode-se observar que todas os isolados apresentaram reação de Gram negativa, o que é caraterístico do grupo das BFNN pertencente às proteobactérias (Brenner et al., 2005).

Com relação à mudança de pH do meio de cultura, dos nove isolados selecionados de feijão-caupi, sete (FCI2, FCI3, FCI7, FCI8, FCI11, FCI14, FCI15) apresentaram reação neutra em meio de cultura YMA, um (FCI1) apresentou capacidade de acidificar o meio e um (FCI9) isolado teve reação alcalina. Em relação ao tempo de crescimento, apenas dois isolados selecionados de feijão-caupi (FCI9, FCI14) apresentaram crescimento lento (5 a 10 dias), todos os outros isolados,

apresentaram crescimento rápido (3 dias) em meio de cultura YMA acrescido de azul de bromotimol.

Tabela 3 - Caracterização cultural de isolados de BFNN da área de mineração de Mn em associação com feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Estirpe	Origem	Gram	pH do meio	TC	CC	TR	EL	FM	EM	FC
FCI1	Mata	-	A	R	B	O	C	P	V	Irregular
FCI2	Mata	-	N	R	B	O	C	P	V	Irregular
FCI3	Mata	-	N	R	B	O	C	P	V	Irregular
FCI7	AD	-	N	R	AM	T	C	P	G	Irregular
FCI8	AD	-	N	R	AM	T	C	P	V	Irregular
FCI9	AD	-	AL	L	B	O	C	P	V	Irregular
FCI11	Rejeito	-	N	R	B	O	C	P	G	Irregular
FCI14	Rejeito	-	N	L	B	O	C	P	V	Irregular
FCI15	Rejeito	-	N	R	B	O	C	P	G	Irregular

Nota. AD: área degradada; -: negativo; A: ácido; AL: alcalino; N: neutro TC: tempo de crescimento; R: rápido; L: lento; CC: cor das colônias; A: amarela; B: branca; TR: transparência; O: opaca; T: translúcida; EL: elevação do muco; C: convexa; FM: formação de muco; P: presente; EM: elasticidade do muco; G: gomosa V: viscoso; FC: forma da colônia.

Obtiveram-se algumas diferenças entre os isolados selecionados sendo, em sua grande maioria similares, ou seja, apresentando reação neutra em meio YMA, crescimento rápido, coloração branca, transparência opaca, elevação convexa e presença de muco. Apenas na forma da colônia todos os isolados foram similares apresentando forma irregular. Houve diferenças em alguns isolados quanto à reação em meio YMA, tempo de crescimento (onde algumas apresentaram crescimento lento), cor predominante amarela, transparência translúcida e quanto à elasticidade do muco, com algumas colônias apresentando muco viscoso e gomoso.

Apesar de haver algumas semelhanças entre os isolados, podemos observar que provavelmente, mesmo nas condições de degradação em que as áreas se encontram, aqui citando principalmente a área degradada e o rejeito de mineração ainda pode-se observar uma pequena diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de realizar simbiose com leguminosas. Estas estirpes provavelmente são adaptadas as condições de extremo estresse, principalmente quanto da presença elevada de Mn^{2+} no solo, assim apresentam um potencial biotecnológico a ser explorado para a própria recuperação destas áreas.

Observando a caracterização fenotípica da espécie *Vigna unguiculata* pelos isolados obtidos da área de mineração, observa-se que estes isolados apresentam características de eficiência no processo de nodulação dessa espécie, demonstrado principalmente pela nodulação que ocorreu principalmente nas raízes principais das plantas, e um frequência nódular elevada (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização fenotípica da nodulação de Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) por rizóbios isolados da área de mineração de manganês.

Feijão-caupi							
Estirpes	Origem	Altura da planta (cm)	Coloração da parte aérea	Posição dos nódulos na raiz	Forma e superfície nodular	Frequência Nodular	Coloração do cerne nodular
FCI1	MATA	21.0	VI	Principal	G/R	MN	Intenso
FCI2	MATA	22.1	VI	Principal	G/R	MN	Intenso
FCI3	MATA	23.5	VI	Principal	G/R	MN	Intenso
FCI7	AD	24.5	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI8	AD	20.6	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI9	AD	17.9	VC	Ramificações	G/R	MN	Médio
FCI11	REJEITO	17.1	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI14	REJEITO	19.4	VI	Principal	G/R	MN	Médio
FCI15	REJEITO	21.4	VI	Principal	G/R	MN	Médio

Nota. AD: área degradada; V.I: verde intenso; V.C: verde claro; G/R: globoso e rugoso; M.N: muito numerosos.

Por meio destas observações podemos confirmar inicialmente que os isolados obtidos apresentam eficiência na fixação de N₂ juntamente com a espécie vegetal, auxiliando na nutrição nitrogenada adequada para a espécie, uma vez que durante o tempo de avaliação não se observou deficiência de nitrogênio nas plantas.

Os isolados também se demonstraram teoricamente bastante competitivos em relação a nodulação, uma vez que a nodulação foi predominantemente na raiz principal na maioria dos isolados, exceto o isolado FCI9 isolado da área degradada, esta observação reflete teoricamente que estes isolados teriam capacidade para competir com estirpes nativas de solos posteriores, se utilizado como inoculante, sendo preciso realizar testes posteriores para confirmação e em condições não estéreis.

5. CONCLUSÃO

Os isolados da área degradada pela mineração de Mn são tolerantes à presença de Mn em elevadas concentrações.

Há uma diversidade, mesmo que reduzida, de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio nestas áreas.

Todas as plantas de feijão-caupi foram capazes de formar nódulos com isolados das estirpes de rizobio tanto da área da florestal, área degradada e da área do rejeito.

Todos os isolados rizobianos das áreas degradadas pela mineração de manganês são capazes de induzir a formação de nódulos radiculares e fixar nitrogênio em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)

REFERÊNCIAS

AUMOND, J. J. Teoria dos sistemas: Uma nova abordagem para recuperação e restauração ambiental. In: II Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental, 2003, Itajaí. **Anais...** Itajaí, p.6. 2003.

AZEVEDO, R.L.; RIBEIRO, G. T.; AZEVEDO, C. L. L. Feijão guandu: uma planta multiuso. **Revista da FAPese**, v. 3, n. 2, p. 81-86, 2007.

BALDISSEROTTO, C. et al. Responses of *Trapa natans* L. floating laminae to high concentrations of manganese. **Protoplasma**, v. 231, n. 1-2, p. 65-82, 2007.

BARTH, R. C. **Avaliação da recuperação de áreas mineradas no Brasil**. Univ. Federal, Department de Engenharia Florestal, 1989.

BRENNER, D. J. et al. (Ed.). **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria, Part A Introductory Essays**. Springer-Verlag US, 2005.

COLTURATO, S. C. O. Aspectos e impactos ambientais da mineração de argila na região de Rio Claro e Santa Gertrudes, SP: proposta metodológica para ponderação dos impactos negativos, Rio Claro, SP. 2002. 137p. **Dissertação** (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista.

DEDECEK, R. A. A dinâmica dos solos em áreas degradadas. Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas – Palestras convidadas. In: Recuperação de Áreas Degradadas – III Curso de atualização, 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba, p. 44-57. 1996.

DIAS, L. E.; GRIFFITH, James Jackson. Conceituação e caracterização de áreas degradadas. **Recuperação de áreas degradadas**, v. 1, 1998.

DIONÍSIO, J. A. et al. Guia prático de biologia do solo. **Embrapa Semiárido-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2016.

FRANCO, A. A.; BALIEIRO, F. C. The role of biological nitrogen fixation in land reclamation. **Agroecology and Sustainability of Tropical Agriculture., Seropédica: EMBRAPA–CNPBS. 223p**, 2000.

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

GODO, G. H.; REISENAUER, H. M. Plant effects on soil manganese availability. **Soil Science Society of America Journal**, v. 44, n. 5, p. 993-995, 1980.

GRIFFITH, J. J. **Recuperação conservacionista de superfícies mineradas: Uma revisão de literatura**. Universidade Federal de Viçosa, 1980.

HOAGLAND, D. R. et al. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-Serviço de Produção e Informação, 1994.

IBAMA. **Manual de Recuperação de áreas degradadas pela mineração**. Brasília, IBAMA, 1990. 96p.

LAMBERS, H. et al. Leaf manganese accumulation and phosphorus-acquisition efficiency. **Trends in plant science**, v. 20, n. 2, p. 83-90, 2015.

MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V.; OSSENBERG-NEUHAUS, H. Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 105, n. 5, p. 407-416, 1982.

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**, v. 30, n. 2, p. 235-246, 2006.

MIN, Y. et al. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Minerals Engineering**, v. 20, n. 2, p. 188-190, 2007.

NOVAIS, R. F. et al. Deficiência de manganês em plantas de soja cultivadas em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 13, p. 199-204, 1989.

OLIVEIRA JUNIOR, J. A.; MALAVOLTA, E.; CABRAL, C. P. Efeitos do manganês sobre a soja cultivada em solo de cerrado do triângulo mineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1629-1636, 2000.

PENG, K. et al. Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator—*Phytolacca Americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1-3, p. 674-681, 2008.

REIS, A.; ZAMBONIM, R. M.; NAKAZONO, E. M.. **Recuperação de áreas florestais degradadas utilizando a sucessão e as interações planta-animal**. Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 1999.

SILVA, A. F.; DE FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P.. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 24, p. 1327-1333, 2002.

SISTI, C. P. J et al. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil and tillage research**, v. 76, n. 1, p. 39-58, 2004.

TANAKA, R. T. et al. Ocorrência de deficiência nutricional em soja cultivada em solo de cerrado devido a incorporação superficial do calcário. **Inf. Agron.**, v. 51, 1990.

TEIXEIRA, P. C. et al. Manual de métodos de análise de solo. **Rio de Janeiro**, v. 4, 2017.

TRANNIN, I. C. B. et al. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre" in vitro". **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 25, n. 2, p. 305-316, 2001.

VADEZ, V. et al. Manganese application alleviates the water deficit-induced decline of N₂ fixation. **Plant, Cell & Environment**, v. 23, n. 5, p. 497-505, 2000.

VINCENT, J. M. et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**, 1970.

XUE, S. G. et al. Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb.(Phytolaccaceae). **Environmental Pollution**, v. 131, n. 3, p. 393-399, 2004.

YANG, Q. et al. Investigation of manganese tolerance and accumulation of two Mn hyperaccumulators *Phytolacca americana* L. and *Polygonum hydropiper* L. in the real Mn-contaminated soils near a manganese mine. **Environmental earth sciences**, v. 68, n. 4, p. 1127-1134, 2013.

ZIMMERMANN, D. G.; TREBIEN, D. O. P. Solos construídos em áreas mineradas como fundamento para recuperar o ambiente. In: **Revista de tecnologia e ambiente**. Universidade do Extremo Sul Catarinense. v. 7, n. 1. Criciúma: FUCR/UNESC, 2001. p. 61-103.

