



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Diversidade de Rizóbios em Áreas Revegetadas Após a Mineração de Bauxita

Wardsson Lustrino Borges⁽¹⁾ e Sergio Miana de Faria⁽²⁾

⁽¹⁾ Pesquisador Embrapa Amapá, Rodovia Juscelino Kubitschek, km 5, Nº2600 CEP 68903-419, Caixa Postal 10 - Macapá, AP, wardsson.lustrino@cpafap.embrapa.br

⁽²⁾ Pesquisador Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465, km 7, Seropédica - RJ - Brasil - CEP: 23890-000, sdefaria@cnpab.embrapa.br

RESUMO – A contribuição da diversidade dos rizóbios para manutenção da diversidade e funcionalidade de ecossistemas naturais tem sido pouco estudada. Neste trabalho objetivou-se avaliar a diversidade de rizóbios em áreas revegetadas em diferentes épocas. Utilizou-se siratro e mimosa como plantas-isca e as ferramentas PCR-RFLP, sequenciamento e BOX-PCR. Observou-se que as áreas de maior diversidade foram as revegetadas há mais tempo e as áreas revegetadas com plantio da leguminosa *Acacia mangium* e, que isolados proximamente relacionados ao gênero *Bradyrhizobium* foram os mais abundantes.

INTRODUÇÃO - Bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N₂) compõem um grupo de microrganismos de extrema importância para os diferentes ecossistemas, uma vez que propiciam a entrada de nitrogênio no solo. A capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico está amplamente distribuída entre microrganismos com diferentes níveis de relacionamento filogenético, onde são encontrados representantes de archaea e de diferentes grupos de eubacteria. Entretanto, a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico e induzir a formação de nódulos em leguminosas está restrita a membros do filo proteobacteria.

Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (rizóbio) são microrganismos presentes e, geralmente, abundantes em solos de muitos ecossistemas. Os rizóbios apresentam elevada diversidade e ampla variabilidade quanto à eficiência simbiótica (Soares et al., 2006).

A importância da fixação simbiótica de nitrogênio (FBN) em sistemas agrícolas é bastante documentada, onde várias espécies de plantas, como soja, feijão e amendoim se beneficiam. Por outro lado, o papel deste grupo de microrganismos em ecossistemas naturais é pobremente entendido (van der Heijden et al., 2006). Pouco é conhecido sobre a contribuição do incremento de diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio para a produtividade e diversidade de plantas vivendo em comunidades. Melloni et al. (2006) relataram que maior diversidade de bactérias no solo significa maior resiliência do sistema e que maior diversidade de bactérias nodulíferas de leguminosas pode favorecer a

simbiose com várias espécies leguminosas e maximizar a fixação biológica de nitrogênio em áreas degradadas.

Neste trabalho objetivou-se avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas em áreas com diferentes idades de revegetação após a atividade de mineração de bauxita, obtidos por meio de cultivo armadilha utilizando as espécies *Macropitilium atropurpureum* e *Mimosa acutistipula*.

MATERIAL E MÉTODOS - As amostras de solo foram coletadas em áreas revegetadas após a atividade de mineração de bauxita da Mineração Rio do Norte (MRN) (Localização: 1° 21' S - 56° 22' W, 180 m de altitude, Oriximiná, Pará). Nove áreas foram amostradas, sendo uma área de Floresta; seis áreas revegetadas sobre estéril de mineração nos anos de 1981, 1985, 1993, 1998, 2004 e 2006 e em duas áreas vegetadas sobre rejeito de mineração no ano de 1993.

A revegetação das parcelas implantadas sobre o substrato denominado de estéril foi realizada utilizando-se de sementes disponíveis nas áreas de Floresta próximas às áreas de mineração. Para as parcelas, implantadas sobre tanques de deposição de rejeito, o plantio foi realizado com a espécie *Acacia mangium* no ano de 1993.

Foi implantado experimento em vasos esterilizados tipo “Leonard” utilizando suspensão da amostra de solo como inóculo e as plantas iscas siratro (*Macropitilium atropurpureum*) e mimosa (*Mimosa acutistipula*). O experimento foi conduzido por 90 dias, onde as plantas receberam aplicação de água e solução nutritiva (Norris e T’Mannetje, 1964) de forma intercalada a cada 15 dias.

Os isolados foram caracterizados com base na análise de restrição do gene que codifica o RNA ribossomal amplificado (16S rDNA -ARDRA) (Laguerre et al., 1994) utilizando os iniciadores universais Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') e Y3 (5'-CTGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3') (Young et al., 1991); pelo seqüenciamento parcial do gene 16S (DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit, MegaBACE™ - GE Healthcare Life Sciences) e pela amplificação de regiões genômicas flanqueadas por seqüências repetitivas no DNA com o iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994).

A identidade das sequências foi verificada no National Center for Biotechnology Information através da Basic Local Alignment Search Tool. Com base na análise de agrupamento obtida calculou-se a riqueza de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), os valores dos índices de diversidade de Shannon e de Equitabilidade, bem como a análise de rarefação (Magurran, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO - No momento da coleta não foi observado nodulação na espécie de mimosa. Espécies do gênero *Mimosa* apresentam especificidade por isolados de rizóbio pertencentes à subdivisão beta de proteobacteria, notadamente isolados do gênero *Burkholderia* (Reis Júnior et al., 2010) e podem necessitar também da associação com fungos micorrízicos arbusculares para a nodulação. A ausência ou a baixa densidade de células de beta-rizóbio nas áreas amostradas, bem como a ausência de fungos micorrízicos arbusculares nos vasos tipo “Leonard” utilizados nesse experimento, podem ser possíveis explicações para a ausência de nodulação em mimosa. Por outro lado, a maior parte das plantas de siratro apresentou nodulação, demonstrando que a densidade de células de rizóbio presente no inóculo utilizado foi suficiente para induzir a nodulação nesta espécie. De fato, essa espécie tem sido utilizada em vários estudos que objetivam acessar a diversidade de isolados de nódulos em diferentes ecossistemas (Lima et al., 2009).

Dentre os 139 isolados, dois não cresceram em meio de cultivo após o período de armazenamento e foram excluídos das análises (1 de 2004 e 1 de Rejeito 2). Para dois isolados da parcela Rejeito 1 não foi obtido produto de PCR e esses também foram excluídos da análise de restrição. Assim, o produto do 16S rDNA foi obtido para 135 isolados, o qual foi então digerido com as endonucleases de restrição *Hinf*I, *Msp* I e *Dde* I.

Com base nos agrupamentos visualizados no dendrograma gerado com os perfis de restrição os isolados foram distribuídos em 25 diferentes grupos genotípicos e 56 isolados posicionados em diferentes grupos genéticos apresentaram 100% de similaridade.

A análise de BOX-PCR permite avaliar várias regiões genômicas simultaneamente, identificando variabilidade intra-específica. De fato, esta análise evidenciou maior poder de discriminação dos isolados, quando comparado com a análise de restrição, sendo que estes foram distribuídos em 40 grupos e, apenas 12 isolados não puderam ser discriminados apresentando 100% de similaridade.

O número de grupos observado tanto com base na restrição (25) quanto com base no BOX-PCR (40) demonstra presença de mais que uma espécie nestas áreas. De fato, este resultado foi confirmado pelo seqüenciamento parcial do gene 16S. Dentre os 12 isolados para os quais o gene 16S foi parcialmente seqüenciado pôde-se detectar similaridade com sequências de três gêneros. Destas, 8 pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, 3 pertencem ao gênero *Rhizobium* e 1 pertence ao gênero *Mesorhizobium*. Considerando todos os 135 isolados analisados pela restrição do 16S foi possível observar que 102 isolados agruparam com o

gênero *Bradyrhizobium*, 25 isolados com o gênero *Rhizobium* e 8 isolados com o gênero *Mesorhizobium*. Maior abundância de isolados do gênero *Bradyrhizobium* tem sido observada por outros autores em diferentes condições (Moreira et al., 1998, Lima et al., 2009; Perrineau et al., 2011). Estes resultados sugerem que existe elevada variabilidade dentro deste gênero.

Entre as áreas revegetadas o nível de diversidade foi mais elevado na área revegetada há mais tempo (1981) e menor na área revegetada há menos tempo (2006). As demais áreas apresentaram valores intermediários, com uma sequência quase linear de redução em função do ano de revegetação (Figura 1).

Foi possível, concluir que as estratégias de revegetação utilizadas nessas áreas têm proporcionado o estabelecimento de comunidade de plantas capaz de sustentar o incremento de diversidade de isolados de nódulos com o passar do tempo. Melloni et al. (2006) mencionam que estudos de diversidade de grupos-chave de microrganismos em áreas recuperadas são importantes, pois fornecem indicativo do efeito de diferentes métodos de reabilitação sobre a diversidade desses microrganismos e podem prover o isolamento de estirpes eficientes.

Comparando as áreas revegetadas com a área sob Floresta e com as duas áreas que foram revegetadas com o plantio de *Acacia mangium* (Rejeito 1 e 2) pôde-se observar que a área sob Floresta apresentou nível de diversidade menor que as áreas revegetadas, e que as duas áreas sob plantio de *Acacia mangium* apresentaram nível de diversidade similar a área revegetada em 1981.

As áreas revegetadas com o plantio de *Acacia mangium* foram recuperadas há 17 anos (1993), nesse tempo as alterações ocasionadas pela cobertura da área com uma espécie da família das leguminosas possivelmente proporcionou alterações no solo e na vegetação que propiciaram condições para o estabelecimento de comunidade diversa de isolados de nódulos. Maior diversidade de bactérias nodulíferas de leguminosas e fixadoras de nitrogênio foi também encontrada em áreas revegetadas com as leguminosas bracinga e feijão-guandu após atividade de mineração (Melloni et al., 2006).

A capacidade de espécies de leguminosas colonizarem ambientes degradados é relatada na literatura (Franco e de Faria, 1997) e, tem sido relacionada não somente ao fato destas formarem associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio incorporando-o ao solo, mas também ao fato destas se associarem a fungos micorrízicos arbusculares. Isso favorece a nutrição de plantas e possibilita a captura mais eficiente de nutrientes. Como resultado do incremento de nitrogênio na biomassa e absorção de nutrientes importantes, como o fósforo, o plantio de leguminosas favorece a sucessão vegetal.

Baseado na análise de rarefação pôde-se observar, exceto para a área revegetada em 2006, estabilização dos valores do índice de Shannon indicando que foi possível fazer estimativa acurada da diversidade de isolados de nódulos com o número de isolados obtidos. Para a área revegetada em 2006 o número de isolados obtidos foi baixo, o que comprometeu a estimativa da diversidade, que poderia ser mais elevada caso o número de isolados

fosse maior, pois não foi possível perceber estabilização dos valores do índice de Shannon (Figura 2).

Menor nível de diversidade de isolados de nódulos em áreas sob Floresta quando comparado com áreas sob cultivo ou capoeira também foram encontrados por outros autores (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2009; Melloni et al., 2006). Jesus et al. (2005) avaliando o efeito do tipo de uso da terra sobre a diversidade de isolados de nódulos capturados por siratro, observaram que a área sob cultivo de mandioca apresentou maior riqueza e diversidade que as áreas sob Floresta e cultivo de pupunha, que não diferiram entre si. Lima et al. (2009) também avaliando a comunidade de isolados de nódulos de siratro em áreas com diferentes tipos de uso na Floresta Amazônica observaram que a riqueza de isolados de nódulos na área sob floresta primária (PF) foi igual a 12, sendo o valor mais baixo entre as áreas analisadas. Os valores para as demais áreas foram 46 para área sob cultivo agrícola (AG), 48 em Agrofloresta (AF), 24 para área identificada como floresta secundária velha (OSF), 28 em floresta secundária nova (YSF) e 29 em área de pasto (PA).

Os dados apresentados nesse trabalho corroboram os resultados obtidos por Melloni et al. (2006) que observaram menor nível de diversidade de isolados de nódulos em áreas recém revegetadas, maior em áreas recuperadas com o cultivo de leguminosas e que a revegetação incrementa a diversidade deste grupo chave de microrganismos.

CONCLUSÕES - Áreas revegetadas há mais tempo mostraram maiores índices ecológicos de riqueza, diversidade e equitabilidade de unidades taxonômicas operacionais.

A área sob Floresta apresenta menor nível de riqueza e diversidade que as áreas revegetadas.

As áreas revegetadas com a leguminosa *Acacia mangium* em 1993 apresentam nível diversidade similar à área revegetada há mais tempo.

AGRADECIMENTOS - Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por bolsa concedida e financiamento do projeto. Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da UFRRJ. À Embrapa Agrobiologia pela infra-estrutura disponibilizada.

REFERÊNCIAS

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

van der HEIJDEN, M.G.A.; BAKKER, R.; VERWAAL, J.; SCHEUBLIN, T.R.; RUTTEN, M.; VAN LOGTESTIJN, R.; STAEHELIN, C. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in a dune grassland. *FEMS Microbiological Ecology*, v.56, p.178-187, 2006.

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

LAGUERRE, G.; ALLARD, M. R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.56-63, 1994.

LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A. DA SILVA, K.; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). *Plant and Soil*, v.20, p.1-19, 2009.

MAGURRAN, A.E. Ecological diversity and its measurement. New Jersey: Princeton, 1987. 179p.

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

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

NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, Nairobi, v. 29, p. 214-235, 1964.

PERRINEAU, M.M.; LE ROUX, C.; DE FARIA, S.M.; DE CARVALHO, F.B.; GALIANA A.; PRIN, Y.; BÉNA, G. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 376-384, 2011.

REIS JÚNIOR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M., ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F.; DE QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.-M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.C.; DE FARIA, S.M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, J.P.W.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*, v.186, p.934-946, 2010.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; DO VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi (1). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.30, n.5, p.795-802, 2006.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, v.5, n.1, p.25-40, 1994.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology*, v.173, p.2271-2277, 1991.

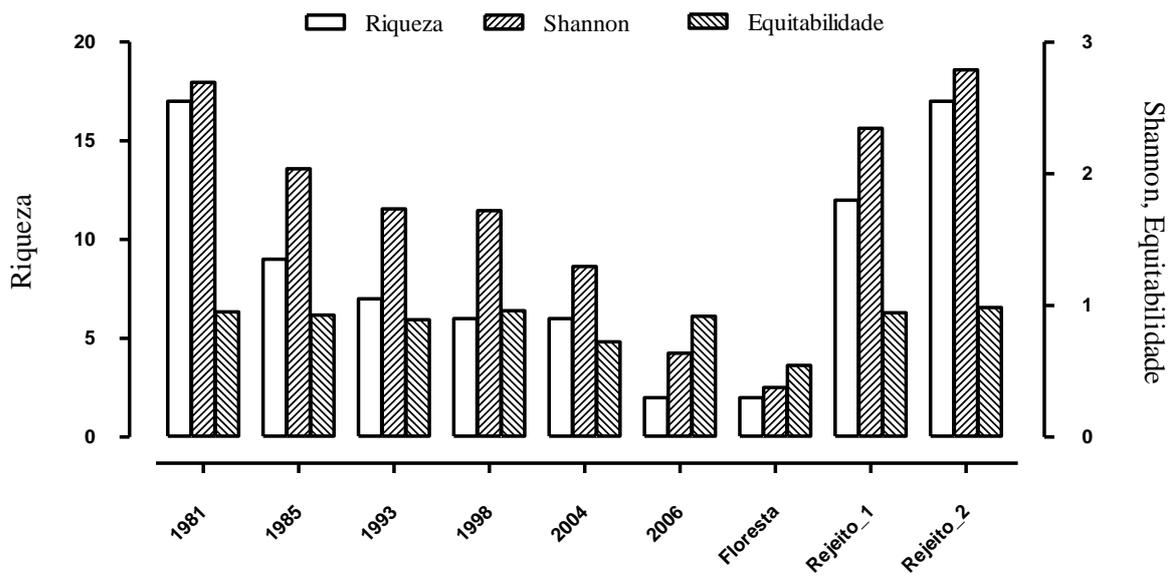


Figura 1: Riqueza de grupos genotípicos, valores dos índices de diversidade de Shannon e de Equitabilidade observados para o grupo de isolados de rizóbio analisado pela técnica de BOX-PCR para as amostras de solo coletadas nas parcelas revegetadas em 1981, 1985, 1993, 1998, 2004, 2006, Rejeito 1, Rejeito 2 e Floresta.

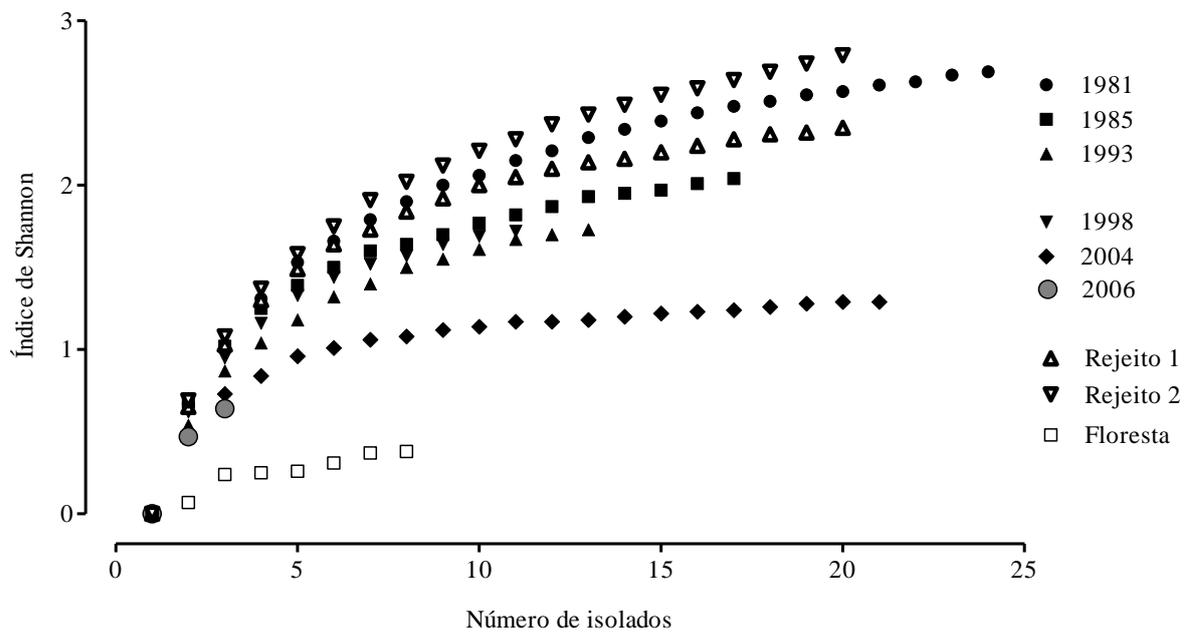


Figura 2: Variação dos valores do índice de diversidade de Shannon em função do número de isolados das áreas revegetadas em 1981, 1985, 1993, 1998, 2004, 2006, Rejeito 1, Rejeito 2 e Floresta.