



**DENSIDADE E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES EM SOLOS DE MINERAÇÃO DE
BAUXITA**

ROGÉRIO MELLONI

2001

MEMORANDUM

DATE
20 30

TO : [Illegible]


FROM : [Illegible]

51220

MPU 36205

ROGÉRIO MELLONI

**DENSIDADE E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS DE
MINERAÇÃO DE BAUXITA**



Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Fátima M.S. Moreira

VCRA
FAEPE
REAGENTE

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

MELLONI, ROGÉRIO

DENSIDADE E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

173 p. : il.

1005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Melloni, Rogério

Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita / Rogério Melloni. -- Lavras : UFLA, 2001.

173 p. : il.

Orientadora: Fátima M.S. Moreira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Rhizobium. I. Azospirillum. 3. Micorriza. 4. Indicador. 5. Alcoa. 6. Reabilitação. 7. Endofítico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.45

-631.6

-589.9


ROGÉRIO MELLONI

**DENSIDADE E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS DE
MINERAÇÃO DE BAUXITA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso de
Pós-graduação em Agronomia, área de
concentração em Solos e Nutrição de Plantas,
para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 13 de fevereiro de 2001

Prof. José Oswaldo Siqueira	UFLA/DCS
Prof. Luiz R. G. Guilherme	UFLA/DCS
Profa. Janice G. de Carvalho	UFLA/DCS
Profa. Elke J.B.N. Cardoso	ESALQ/USP


Prof. Fátima M.S. Moreira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Este este un document de confidență
și conține informații care pot fi
prejudiciale interesului național
în cazul în care sunt divulgate.

Informații

1. Informațiile conținute în acest document sunt clasificate ca fiind de confidență în conformitate cu prevederile Legii nr. 509/2002 privind protejerea informațiilor de confidență.

2. Informațiile conținute în acest document sunt clasificate ca fiind de confidență în conformitate cu prevederile Legii nr. 509/2002 privind protejerea informațiilor de confidență.

Informații de confidență

- 1. Informațiile conținute în acest document sunt clasificate ca fiind de confidență în conformitate cu prevederile Legii nr. 509/2002 privind protejerea informațiilor de confidență.
- 2. Informațiile conținute în acest document sunt clasificate ca fiind de confidență în conformitate cu prevederile Legii nr. 509/2002 privind protejerea informațiilor de confidență.
- 3. Informațiile conținute în acest document sunt clasificate ca fiind de confidență în conformitate cu prevederile Legii nr. 509/2002 privind protejerea informațiilor de confidență.
- 4. Informațiile conținute în acest document sunt clasificate ca fiind de confidență în conformitate cu prevederile Legii nr. 509/2002 privind protejerea informațiilor de confidență.

SECRET
Informații de confidență

SECRET
Informații de confidență

“Ninguém pisando está impedido de protestar contra quem pisa. Mas é preciso sempre começar por enxergar as próprias patas. O corpo antes da roupa.”

Raduan Nassar

**Aos meus pais Octávio e Helena
e irmãos,
DEDICO**

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	i
GENNERAL ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	01
1 Introdução geral	01
2 Referencial teórico	03
2.1 Atividade de mineração de bauxita e a legislação brasileira	03
2.2 Grupos funcionais de microrganismos em solos minerados	05
2.2.1 Diazotróficos simbióticos com plantas: rizóbios	05
2.2.2 Diazotróficos endofíticos	08
2.2.3 Fungos micorrízicos arbusculares (MAs)	10
2.3 A reabilitação de solos minerados	17
3 Referências bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2: Eficiência e diversidade fenotípica de populações de rizóbio em solos de mineração de bauxita, empregando caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp) e feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) ...	33
Resumo	33
Abstract.....	34
1 Introdução	35
2 Material e métodos	36
2.1 Localização, caracterização dos sítios de estudo e épocas de amostragem de solo	36
2.2 Amostragem e caracterização física e química das amostras de solo	47
2.3 Experimentos em casa-de-vegetação	50
2.4 Isolamento e caracterização de isolados de rizóbio	52
2.5 Análise estatística	54
3 Resultados e discussão.....	54
3.1 Experimentos com amostras de solo coletadas no inverno (agosto de 1998)	54
3.1.1 Crescimento vegetal	54
3.1.2 Nodulação e atividade da nitrogenase	58
3.1.3 Caracterização cultural de isolados de rizóbio	60
3.1.4 Índice de diversidade de rizóbio	65
3.2 Experimentos com amostras de solo coletadas no verão (março de 1999).....	68
3.2.1 Crescimento vegetal	68
3.2.2 Nodulação e atividade da nitrogenase	70

3.2.3 Caracterização cultural de isolados de rizóbio	74
3.2.4 Índice de diversidade de rizóbio	80
4 Conclusões	82
5 Referências bibliográficas	83

CAPÍTULO 3: Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação	87
Resumo	87
Abstract.....	88
1 Introdução	89
2 Material e métodos	90
2.1 Avaliação semiquantitativa-inverno (agosto de 1998).....	90
2.2 Densidade-verão (março de 1999) e primavera (dezembro de 1999).....	91
2.3 Diversidade fenotípica dos isolados	92
3 Resultados e discussão.....	93
3.1 Ocorrência e densidade	93
3.2 Diversidade fenotípica-cultural dos isolados	96
4 Conclusões	102
5 Referências bibliográficas	103

CAPÍTULO 4: Potencial de inóculo, diversidade e eficiência de fungos MAs em solos de mineração de bauxita em reabilitação	106
Resumo	106
Abstract.....	107
1 Introdução	108
2 Material e métodos	109
2.1 Micélio extrarradicular	110
2.2 Número total de esporos e espécies	111
2.3 Colonização micorrízica de espécies coletadas <i>in situ</i> e de feijoeiro e caupi em vasos (bioensaio)	112
2.4 Multiplicação de fungos MAs em vasos-armadilha.....	112
2.5 Número mais provável (NMP) de propágulos de fungos MAs	112
2.6 Eficiência de populações em feijoeiro	114
3 Resultados e discussão.....	116
3.1 Quantificação da população de fungos MAs	116
3.2 Eficiência de populações de fungos MAs	133
4 Conclusões	136
5 Referências bibliográficas	137

CAPÍTULO 5: Bactérias diazotróficas e fungos MAs como indicadores da reabilitação de solos em áreas de mineração de bauxita.....	143
Resumo	143
Abstract.....	144
1 Introdução	145
2 Material e métodos	146
3 Resultados e discussão.....	149
4 Conclusões	168
5 Referências bibliográficas	170

RESUMO GERAL

MELLONI, R. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita. Lavras: UFLA, 2001. 173p. (Tese – Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*

A mineração é uma atividade antrópica que provoca grandes alterações físicas, químicas e biológicas no solo. A reabilitação desses solos é obrigatória por lei e sua avaliação geralmente é realizada através de estudos de cobertura vegetal e diversidade florística. No entanto, nem sempre a reabilitação obtida com estas determinações apresenta relações com a reabilitação do solo, já que a última deve envolver estudos de funcionalidade e sustentabilidade, as quais estão intimamente ligadas à presença e atividade de grupos-chave de microrganismos. Fungos micorrízicos arbusculares e microrganismos diazotróficos podem ser considerados fundamentais para a reabilitação de solos minerados, principalmente pela participação em ciclos biogeoquímicos, incluindo a fixação biológica de nitrogênio, contribuição à agregação do solo e otimização da utilização de nutrientes e água pelas plantas. No entanto, apesar desta importância, não há trabalhos mostrando o efeito de diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação de solos minerados nestas populações. Para este estudo, 7 sítios da região de campo e 8 da região de serra, pertencentes à ALCOA Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG), foram amostrados em três estações do ano (inverno-agosto de 1998, verão-março de 1999 e primavera-dezembro de 1999). Estes sítios apresentavam-se sob diferentes estratégias e cronosseqüência de reabilitação (recém-minerado até referências não mineradas) e as amostras foram utilizadas em experimentos de casa-de-vegetação e laboratório, para avaliação de populações de rizóbio (densidade, diversidade fenotípica cultural e eficiência de populações em feijoeiro e caupi), diazotróficos endofíticos (densidade e diversidade fenotípica cultural) e fungos MAs (potencial de inóculo, diversidade e eficiência de populações em feijoeiro). A mineração reduziu a ocorrência, diversidade e eficiência de microrganismos diazotróficos e fungos MAs. As espécies vegetais contribuem de modo diferenciado à recuperação destes grupos de microrganismos, com efeito positivo das estratégias de reabilitação que utilizam gramíneas (capim-gordura, braquiária e azevém) e bracingas, e efeito negativo daquelas que empregam eucalipto em plantio adensado e homogêneo. Através da utilização de índices de reabilitação, obtidos pelas características de solo e vegetação *in situ*, dendogramas de similaridade e análise de componentes principais (PCA), foi

* Comitê de Orientação: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Orientadora), José Oswaldo Siqueira - UFLA

possível discriminar os diferentes sítios de estudo e verificar que o efeito das estratégias de reabilitação foi mais importante do que sua cronossequência, não havendo relação entre a reabilitação avaliada por atributos *in situ* e aquela obtida através das variáveis microbiológicas. A reabilitação dos sítios do campo mostrou-se fortemente influenciada pelas variáveis microbiológicas, enquanto aquela dos sítios da serra, mais influenciada pelos atributos físicos e químicos. As variáveis microbiológicas mostraram alta sensibilidade em discriminar os diferentes sítios de estudo, apresentando, portanto, grande potencial de utilização como indicadores microbiológicos da reabilitação de solos de mineração de bauxita.

GENERAL ABSTRACT

MELLONI, R. Density and diversity of fixing nitrogen bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in bauxite mined soils. Lavras: UFLA, 2001. 173p. (Thesis – Doctorate in Soil and Plant Nutrition)*

Mining is an anthropic activity that promotes great physical, chemical and biological changes in soil. The rehabilitation of these soils is obligatory by law and its evaluation generally is done by studies of soil covering indexes and plant diversity. However, the rehabilitation on surface soil can not be related with actual soil rehabilitation, because the last one must involve studies of functioning and sustainability, which are closely related to the presence and activity of some key microbial groups. Arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria are considered very important to mining soil rehabilitation, mainly for participation in biogeochemical cycling, including biological nitrogen fixation, contribution to soil aggregation and optimization of nutrient and water plant absorption. Despite this importance, there are no reports showing the effect of different rehabilitation strategies and chronosequences on these populations. For this study, 7 sites on "campo" region and 8 sites on "serra", belonging to ALCOA Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG), were sampled in winter-August 1998, summer-March 1999 and spring-December 1999. These sites were under different rehabilitation strategies and chronosequences (newly-mined non-rehabilitated to undisturbed references) and the soil samples were used in greenhouse and laboratory experiments for evaluation of rhizobia populations (density, cultural phenotypic diversity and efficiency on bean and cowpea plants), endophytic fixing bacteria (density and cultural phenotypic diversity) and AM fungi (inoculum potential, diversity and efficiency on bean plants). The mining activity reduced the occurrence, diversity and efficiency of diazotrophic bacteria and AM fungi. The rehabilitation strategies contributed differently to recuperation of these microbial groups, with positive effect of those involving graminous plants (*Melinis minutiflora*, *Brachiaria decumbens* and *Lolium multiflorum*) and "bracatingas" (*Mimosa scabrella*), and negative effect of those involving eucalyptus in homogenous and high density conditions. Through the rehabilitation indexes obtained from *in situ* soil and plant characteristics, similarity dendograms and principal components analysis (PCA), it was possible discriminate the different sites and verify that the effect of rehabilitation strategies was higher than its age, with no relationship between *in situ* rehabilitation and that evaluated from microbial parameters. The rehabilitation

* Guidance Committee: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Major Professor), José Oswaldo Siqueira - UFLA.

of "campo" sites was more influenced by microbial parameters, while that of "serra" was more dependent on physical and chemical parameters. The microbial parameters showed high sensibility to discriminate the different sites, with high potential of utilization as microbial indicators of rehabilitation on bauxite mined soils.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil se destaca como a terceira reserva mundial de bauxita, com um volume estimado em 3,2 bilhões de toneladas, inferior somente ao da Nova Guiné e ao da Austrália (Gisler, 1995). Em 1998, no Brasil foram produzidas 13,5 milhões de toneladas de bauxita, com produção estável há vários anos (www.mbendi.co.za/indy/ming/baux/sa/p0005.htm). Minas Gerais é o Estado com o maior número de lavras de bauxita e, por estar as indústrias de mineração localizadas junto às jazidas minerais, esta constitui um dos fatores principais de interiorização do Brasil e estabelecimento de novas fronteiras de desenvolvimento (Lorenzo, 1991). O planalto de Poços de Caldas (MG), com 800 km² de área, constitui um dos maiores centros ígneos do mundo e um grande produtor de bauxita (Gisler, 1995), a qual é explorada pela empresa de mineração Alcoa Alumínio S/A, desde 1970 (Souza, 1997), responsável por 25% da produção do alumínio nacional (www.alcoa.com.br).

A atividade de mineração provoca expressivos impactos no solo, paisagem, água e no ar, sendo considerada uma das mais impactantes ao meio ambiente. Segundo BRASIL (1990), áreas degradadas pela mineração são caracterizadas como aquelas em que a vegetação nativa e a fauna foram destruídas, removidas ou expulsas. A camada superficial do solo é perdida, removida ou enterrada, e a qualidade e o regime de vazão do sistema hídrico são alterados. A degradação ambiental é inerente à mineração, sendo o impacto desta no ambiente dependente do volume explorado, tipo de mineração, e dos rejeitos produzidos (Griffith, 1980). No entanto, a recuperação dessas áreas é obrigatória por lei e a revegetação é empregada visando reconstruir o fluxo de energia e nutrientes no ecossistema, o que ocorre através de processos que são em sua maioria mediados pelos organismos do solo (Siqueira et al., 1994).

Os solos recém-minerados são submetidos a extremos de temperatura e pH, limitação de água, erosão, baixa disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica, exercendo grande impacto na densidade e diversidade de microrganismos funcionais, como bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares, os quais apresentam importante papel na sustentabilidade destes sistemas pela incorporação de nitrogênio (Bashan e Holguin, 1997; Franco e Faria, 1997), contribuição na agregação do solo e otimização da utilização de nutrientes pelas plantas (Siqueira, 1996; Smith e Read, 1997).

A avaliação do sucesso da reabilitação de solos degradados tem sido difícil e praticamente restrita a aspectos visuais de cobertura do solo e diversidade florística (Brower e Zar, 1977). No entanto, estes parâmetros podem não refletir a qualidade e funcionalidade de solos em ecossistemas impactados (Skouse, Johnson e Garbutt, 1994; Ruivo, 1998). Devido à importância dos microrganismos como mediadores dos processos do solo e destes serem muito sensíveis às perturbações no solo (Doran e Zeiss, 2000; van Bruggen e Semenov, 2000) e na cobertura vegetal (Prasad, Basu e Behera, 1994), os microrganismos e seus processos apresentam grande potencial como indicadores nas avaliações de áreas reabilitadas.

Apesar de bastante conhecido o impacto da mineração sobre os organismos e processos do solo, são raros ou inexistentes os estudos sobre o efeito de diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação na densidade e diversidade destes microrganismos. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar populações de bactérias diazotróficas simbióticas e associativas com plantas, e de fungos micorrízicos arbusculares em solos de mineração de bauxita sob diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação, avaliando também a potencialidade de utilização destas variáveis microbiológicas como indicadores do grau de reabilitação desses solos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Atividade de mineração de bauxita e a legislação brasileira

Bauxita é o resultado da intemperização de rochas alumino-silicatadas e matéria-prima básica da indústria de alumínio primário (Negreiros, 1979). A maior parte dos depósitos de bauxita ocorre nos trópicos e poucos em áreas de clima temperado (Errico e Horta, 1977). A atuação dos processos de intemperismo sobre o maciço de rochas alcalinas do município de Poços de Caldas (MG) levou à formação de extensos depósitos de bauxita, os quais receberam interesse econômico a partir de 1934 (BRASIL, 1979). As jazidas de bauxita desta região ocorrem em duas situações distintas: as de serra e as de campo. As jazidas de serra são formadas diretamente a partir do intemperismo de rochas alcalinas, enquanto nas jazidas de campo, o minério bauxítico é formado indiretamente pela dissilicatação das argilas (BRASIL, 1979). Esses processos, especialmente dessilicatação e perda de bases, podem ser considerados aspectos básicos para entendimento, recuperação e revegetação dos solos de bauxita altamente intemperizados (Fox et al., 1991).

As leis brasileiras têm se tornado exigentes com respeito à regulamentação das atividades mineradoras, visando a minimização do impacto ambiental ou a recuperação de áreas nas quais se realizam atividades de mineração. Segundo Lorenzo (1991), essa regulamentação está contida no Decreto lei nº 227, de 28 de fevereiro de 1967 (código da mineração) e nº 62934, de 03 de julho de 1968. A nova Constituição Brasileira é mais específica sobre a recuperação de áreas mineradas, constando no segundo parágrafo do artigo 225 do capítulo VI: "Aquele que explorar recursos minerais fica obrigado a recuperar o meio ambiente degradado, de acordo com solução técnica exigida pelo órgão público competente, na forma de lei." Em 1989, pela Lei nº 6938 do Decreto nº 97632, esclarece-se que os novos empreendimentos no setor mineral

devem apresentar ao órgão oficial competente um EIA (Estudo de Impacto Ambiental) / RIMA (Relatório de Impacto Ambiental), juntamente com plano de recuperação da área degradada pela atividade de mineração (BRASIL, 1990).

O processo de mineração envolve a construção de estradas de acesso à mina e a remoção da cobertura vegetal e da camada superficial do solo, assim como de todo o solo que se encontra acima da rocha a ser explorada. A camada superficial, normalmente com maiores quantidades de matéria orgânica, nutrientes e microrganismos, é retirada e armazenada, para posteriormente ser adicionada à superfície do solo minerado no processo de recuperação (Williams, Bugin e Reis, 1990). Com isso, há grandes alterações nos atributos físicos, químicos e biológicos do solo, destacando-se a oxidação da matéria orgânica, perda de nutrientes (Fresquez, Aldon e Lindermann, 1986; Franco et al., 1995) e viabilidade dos propágulos microbianos (White, Munn e Williams, 1989).

Uma das primeiras etapas para melhorar os atributos físicos, químicos e biológicos desses solos é promover sua revegetação. Segundo Souza e Silva (1996), o processo de revegetação pode envolver o emprego de técnicas diferenciadas denominadas recuperação ou reabilitação, conforme as espécies vegetais utilizadas. Na recuperação, são empregadas espécies preexistentes, de forma a dar condições para que o ecossistema adquira características próximas das originais. Já na reabilitação, as plantas constituem, em sua maioria, espécies exóticas ou originais de outros ecossistemas locais e, como resultado desse processo, novo ecossistema com características distintas do original é formado. No entanto, a reabilitação de áreas mineradas é recente no Brasil, e atualmente tem sido realizada através da adição de matéria orgânica, calagem, adubação e revegetação com plantas de rápido crescimento e resistentes aos estresses edáficos (Andrade, 1991; Lorenzo, 1991; Souza, 1997). Segundo Biro et al. (1993), a adição de matéria orgânica tem contribuído para a aceleração da revegetação e aumento da fertilidade de solos minerados. Nesses solos, a

revegetação parece ser capaz de estabelecer um ecossistema estável e funcional, com processos de ciclagem de nutrientes (Janos, 1980; Siqueira, 1996). Trata-se de um processo que envolve não somente o plantio de espécies vegetais, mas também a seleção adequada dessas espécies e das técnicas de manejo visando aceleração e reconstituição dos processos naturais de sucessão (Griffith, 1980; Barth, 1989).

Assim, através da implantação de vários tipos de cobertura vegetal, de acordo com a estratégia de reabilitação adotada, tem-se procurado criar condições edáficas que permitam a reabilitação dos solos minerados. No entanto, apesar da importância atribuída às estratégias, não se deve desconsiderar o possível efeito do tempo de revegetação na reabilitação desses solos, cujo estudo pode ser de grande interesse no contexto de sustentabilidade desses ambientes impactados.

2.2 Grupos funcionais de microrganismos em solos minerados

2.2.1 Diazotróficos simbióticos com plantas: rizóbios

O solo representa um dos menores reservatórios de N da natureza, onde ocorre predominantemente na forma orgânica, sendo suas transformações e fluxos quase totalmente dependentes da ação microbiana. Numerosos estudos têm demonstrado que estas transformações são sensíveis a interferências impostas sobre o solo. Assim, a própria fixação biológica de N_2 e os microrganismos diazotróficos são muito afetados pelas alterações no manejo do solo, podendo ser empregados em estudos da qualidade e avaliações do grau de reabilitação do solo minerado.

Dentre os diversos grupos de microrganismos do solo, aqueles fixadores de N_2 atmosférico ou diazotróficos são considerados grupos funcionais-chave, uma vez que desempenham papel importante em processos relacionados à sustentabilidade do sistema solo-planta, incorporando nitrogênio nesses

ecossistemas (Boddey et al., 1997; Franco e Faria, 1997; Franco e Balieiro, 1999). Estas formam um grupo com alta diversidade bioquímica, fisiológica e morfológica, podendo ser encontrados entre as bactérias, cianobactérias e actinomicetos, e vivendo livremente no solo ou em simbiose com plantas. Dentre os que formam simbiose, destacam-se os rizóbios, que produzem estruturas típicas denominadas nódulos nas raízes ou, excepcionalmente, no caule das plantas e, atualmente, estão distribuídos em 6 gêneros (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*), os quais são capazes de nodular, de modo específico ou promíscuo, uma variedade imensa de leguminosas. Há plantas, como feijoeiro, caupi, siratro, e outras, que, por sua baixa especificidade em nodular, são consideradas boas plantas-isca para detectar a diversidade das populações de rizóbio no solo. O caupi, por exemplo, é uma destas plantas que se destaca na captura de rizóbios de grande diversidade, apresentando grande potencial de utilização nesses estudos (Lewin et al., 1987; Martins, Neves e Rumjanek, 1997; Pereira, 2000).

São inexistentes os estudos ligados à densidade, diversidade e eficiência desses microrganismos diazotróficos simbióticos com plantas em solos de mineração de bauxita sob diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação. A sobrevivência, competitividade e eficiência simbiótica do rizóbio são limitadas por diversos fatores, como espécie e nutrição vegetal, baixa fertilidade do solo, toxicidade por Al e Mn decorrente da acidez, altas temperaturas, baixa ou elevada umidade no solo, revolvimento, entre outros, condições estas que podem ser normalmente encontradas em solos minerados (Brockwell, Bottomley e Thies, 1995). Vários pesquisadores relataram redução da diversidade de rizóbio pelo revolvimento do solo (Coutinho et al., 1999; Chueire et al., 2000; Ferreira et al., 2000). Como já discutido, a fertilidade do solo varia com a espécie empregada como estratégia de reabilitação das áreas

mineradas (Franco et al., 1992; Maschio, Scalzo e Gaiad, 1992; Dias, Franco e Campello, 1994), podendo atuar, portanto, positivamente no aumento da densidade, diversidade e atividade de rizóbios nos solos (Franco e Faria, 1997; Andrade, Murphy e Giller, 2000; Denton et al., 2000; Hungria e Vargas, 2000; Straliozzo, Ferreira e Rumjanek, 2000). Também a revegetação com leguminosas tem sido indicada na reabilitação de solos degradados, e uma dessas espécies é a *Mimosa scabrella* (bracatinga), a qual foi normalmente empregada na revegetação dos sítios deste estudo, por tolerar solos ácidos (Mattos e Mattos, 1980) e com baixa disponibilidade de N (Simões et al., 1978), formar simbiose eficiente com rizóbio (Franco et al., 1992), ser considerada a mais eficiente (em relação à floresta nativa, eucalipto, pinus e solos desnudos) na recuperação da microbiota e fertilidade de solos de mineração de xisto-pirobetuminoso (Maschio, Scalzo e Gaiad, 1992) e produzir grande quantidade de serapilheira com elevado teor de nitrogênio (EMBRAPA, 1988). Estudos conduzidos por Baggio (1995) mostraram que a fixação biológica de N₂ em bracatinga inoculada com estirpe selecionada de rizóbio pode variar de 190 a 493 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, representando um grande papel na incorporação desse nutriente no solo.

Ainda, em condições de baixa disponibilidade de carbono e energia, Wong e Evans (1971) mostraram que células de rizóbio podem viver saprofiticamente por possuírem PHB (poli-β-hidroxibutirato), o qual pode ser catabolizado e manter a sua sobrevivência independentemente da planta hospedeira. No entanto, em altos teores de matéria orgânica no solo, além da possibilidade de incrementarem a disponibilidade de nitrogênio e, conseqüentemente, afetar negativamente a nodulação e atividade de rizóbio (Salminen, 1981), podem reduzir sua população devido ao aumento da predação por protozoários (Pena-Cabriales e Alexander, 1983). Estes resultados indicam a possibilidade de células de rizóbio sobreviverem em condições de baixa fertilidade do solo, a qual é normalmente encontrada em solos recém-minerados.

2.2.2 Diazotróficos endofíticos

O termo endófito refere-se à colonização interna da raiz por microrganismos (fungos e bactérias) que usualmente não causam prejuízo ao hospedeiro e que vivem a maior parte de sua vida internamente no tecido vegetal, sem provocar sintomas patogênicos (Baldani et al., 1999). Devido à habilidade de alguns diazotróficos colonizarem primariamente o interior radicular de gramíneas, apresentarem baixa sobrevivência no solo e fixarem nitrogênio em associação com estas plantas, o termo endófito foi também introduzido na área de fixação biológica de nitrogênio por Döbereiner (1992). Estas bactérias endofíticas localizam-se em nichos protegidos com baixas pressões de oxigênio (condição ideal para a atividade da nitrogenase), alta disponibilidade energética e baixa competitividade, podendo expressar a máxima capacidade de fixação de nitrogênio. Segundo Döbereiner, Baldani e Baldani (1995), estas características parecem ser a chave para explicar a contribuição eficiente da fixação de nitrogênio dessas associações.

A classificação destes microrganismos em endofíticos facultativos ou endofíticos obrigatórios foi sugerida para diferenciar, respectivamente, microrganismos que podem colonizar tanto a superfície quanto o interior das raízes, e sobreviverem bem no solo, daqueles que não sobrevivem bem no solo mas colonizam o interior das raízes e parte aérea das plantas. O grupo de endofíticos facultativos, composto na maior parte por bactérias do gênero *Azospirillum*, é um dos mais estudados, principalmente em relação aos aspectos ecológicos, fisiológicos e ubiquidade com relação aos hospedeiros. No entanto, bactérias dos gêneros *Herbaspirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* compõem o grupo de endofíticos obrigatórios, com grande variação na especificidade de hospedeiro (Magalhães e Döbereiner, 1984; Baldani et al., 1997).

Métodos laboratoriais envolvendo a utilização de meios seletivos para diferentes microrganismos são atualmente empregados para isolamento de *Azospirillum* spp. (meio NFb - Döbereiner, 1980), *Herbaspirillum* spp. (meio JNFb - Baldani et al., 1992) e *A. amazonense* (meio Fam - Magalhães, 1983). Com os isolados obtidos, pode-se estudar a diversidade fenotípica de uma maneira simples, através das características morfológicas das colônias em meios de cultura, como aquelas descritas por Döbereiner, Baldani e Baldani (1995).

As maiores ocorrências destes microrganismos são com plantas da família *Gramineae*, principalmente bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Azospirillum* (Okon e Labandera-Gonzales, 1994; Bashan e Holguin, 1997). Quanto às bactérias do gênero *Herbaspirillum*, pesquisas comprovaram a baixa capacidade de sobrevivência no solo (Olivares et al., 1996), podendo se apresentar em estágio viável mas não cultivável (Baldani et al., 1999), dificultando o isolamento em solos recém-minerados. Pelo fato das gramíneas serem atualmente muito empregadas na maioria das estratégias de reabilitação de solos minerados, espera-se que este grupo de microrganismos e seus processos sejam estimulados e contribuam ao fluxo de energia e nutrientes nesses ambientes.

A ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas endofíticas são influenciadas por inúmeros fatores ambientais (disponibilidade de fontes de carbono e energia, presença de nitrogênio fixado, pH, umidade, nutrientes, temperatura, entre outros) e, apesar de não haver relatos de estudos em solos minerados, podem contribuir para sua reabilitação e ainda apresentar potencialidade de utilização nesta avaliação.

Segundo Okon e Itzigsohn (1992) e Bashan e Holguin (1997), bactérias do gênero *Azospirillum* podem sobreviver a condições estressantes do solo na forma de cistos, os quais são fisiologicamente ativos e capazes de fixar nitrogênio, na ausência de carbono. Pesquisas mostraram ainda que, assim como

células de rizóbio, possuem PHB em condições de estresse, que pode ser catabolizado e utilizado como fonte de carbono e energia (Tal e Okon, 1985; Baldani et al., 1999). Esta característica pode permitir a sobrevivência de células de *Azospirillum* em solos recém minerados, as quais poderiam se multiplicar e incorporar nitrogênio nesses ecossistemas, quando do processo de reabilitação.

Boddey e Victoria (1986) verificaram que a FBN em *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* foi de 30 e 45 kg N ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente, o que comprova a contribuição das gramíneas na incorporação de nitrogênio no solo. Além da fixação de nitrogênio, bactérias endofíticas são conhecidas pela capacidade de produzir hormônios de crescimento, tais como auxinas, giberelinas e citoquininas *in vitro* (Hartmann e Zimmer, 1994). A produção, pela planta, de substâncias de crescimento em resposta à colonização radicular também tem sido sugerida como uma explicação alternativa para os aumentos de crescimento em plantas inoculadas com *Azospirillum* (Fallik, Okon e Fisher, 1988). Tem-se verificado que ocorre um aumento da densidade de pêlos radiculares, da taxa de aparecimento de raízes secundárias e da superfície radicular quando as plantas são colonizadas por essas bactérias. Tal incremento resulta num aumento de absorção de água e nutrientes, elevando, assim, a capacidade da planta se desenvolver e suportar estresses ambientais (Baldani et al., 1999; Bazzicalupo e Okon, 2000), como em áreas mineradas.

2.2.3 Fungos micorrízicos arbusculares (MAs)

Outro grupo de microrganismos que pode estar diretamente envolvido na reabilitação de solos minerados é aquele formado por fungos MAs. As associações simbióticas mutualísticas formadas entre esses fungos do solo e as raízes da maioria das espécies vegetais vasculares são conhecidas como micorrizas arbusculares. Estas associações exercem efeitos fisiológicos e nutricionais marcantes sobre a planta hospedeira, sendo o fungo responsável

pelo aumento da capacidade de absorção e transferência de nutrientes minerais do solo à planta, aumentando a capacidade destas de sobreviver em condições adversas ou sub-ótimas de fertilidade do solo e competição entre plantas no processo de sucessão.

As espécies vegetais diferem quanto à capacidade de formar e de se beneficiar da simbiose pelo fato dos efeitos no crescimento das plantas serem predominantemente nutricionais, os quais variam em função da exigência da mesma e da fertilidade do solo (Siqueira e Saggin-Júnior, 1995). Pelos seus efeitos, essa simbiose se torna de grande importância para as plantas em solos minerados, onde há maximização do uso de nutrientes do solo (principalmente P e Zn), incremento da fixação biológica de N₂ em leguminosas (Cardoso, 1986; Franco e Faria, 1997), atuação na agregação e estabilidade de agregados através da rede micelial (Miller e Jastrow, 1992a,b) e estabilização e sustentabilidade do ecossistema (Johnson e Pflieger, 1992; Souza e Silva, 1996; Smith e Read, 1997). Segundo Fox et al. (1991), o P pode ser considerado o nutriente mais limitante em solos de mineração de bauxita e a chave para sua reabilitação, sendo sua absorção largamente incrementada na presença de fungos MAs. A maior absorção de P por plantas micorrizadas tem sido atribuída a uma maior exploração superficial de solo (Jasper, Robson e Abbott, 1979; Xiao-Lin, George e Marschner, 1991) e à capacidade das hifas extrarradiculares de absorver P em baixa concentração (Karunaratne, Baker e Barker, 1986; Silveira e Cardoso, 1991).

Após a perturbação do solo (deslocamento e reposição da camada superficial em áreas mineradas, por exemplo), estratégias devem ser tomadas para evitar a criação de condições desfavoráveis e, principalmente, diminuir o período no qual o solo permanece sem vegetação. A ausência de cobertura vegetal promove ausência de exsudatos radiculares no solo, os quais podem reduzir o número de propágulos de fungos MAs (Bécard e Piché, 1989; Bécard,

Douds e Pfeffer, 1992). Em solos revolvidos, vários pesquisadores (Kabir et al., 1998; Cuenca, Andrade e Escalante, 1998; Kling e Jakobsen, 1998; Yano et al., 1998) verificaram redução no número de propágulos de fungos MAs, além da menor diversidade (Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira, 1989; Douds et al., 1995), diminuindo o número de propágulos no solo, selecionando espécies para a sobrevivência e reduzindo a possibilidade de formação de micorriza nessas condições.

* A ocorrência, diversidade e eficiência simbiótica destes fungos são também influenciadas pelas condições ambientais, como valores extremos de temperatura (Brundrett e Abbott, 1994; McGonigle e Miller, 1999) e umidade (Jasper, Abbott e Robson, 1993; Braunberg, Abbott e Robson, 1996), além das variações das relações genótipo-hospedeiro. Segundo Read (1981), a substituição da vegetação nativa por plantas exóticas pode exercer pressão seletiva nas populações de fungos MAs. Johnson e Pflieger (1992) observaram que mudanças na população vegetal podem ser devidas à preferência seletiva dessas plantas por alguns membros da comunidade de fungos MA, reduzindo a sua diversidade no solo. Este resultado indica que uma diversidade de fungos micorrizicos é desejável, se não necessária, para o desenvolvimento e sustentabilidade da comunidade vegetal (Gardner e Malajczuk, 1988; Moldenke et al. 1994; Gould, Hendrix e Ferriss, 1996) num solo de áreas mineradas, fornecendo as condições para a sua reabilitação. No entanto, apesar de não se poder generalizar (Lima, 1993), solos cobertos com eucalipto apresentam baixo número de propágulos e populações de fungos MAs (Malajczuk et al., 1981; Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira, 1989; Souza, 1997; Mehrotra, 1998), confirmando o efeito diferenciado da espécie vegetal na frequência e dominância desses microrganismos.

Na tabela 1, há gêneros e algumas espécies de fungos MAs nativos de solos minerados e com potencial de utilização em estudos relacionados à

colonização de plantas visando revegetação e reabilitação desses solos. A maioria dos trabalhos de levantamento de espécies de fungos MAs trata de solos de mineração de carvão e domínio de espécies do gênero *Glomus*, sendo poucos os estudos em solos de mineração de bauxita no Brasil e no mundo. No entanto, o conhecimento das espécies freqüentemente encontradas em solos minerados é fundamental para futuros estudos visando seleção de espécies adaptadas e, ou, introdução de espécies visando aumento da diversidade e funcionalidade desses solos.

Segundo Reeves et al. (1979) e Janos (1980), o processo de sucessão vegetal num ecossistema degradado, como aquele pela mineração, se inicia com o desenvolvimento de espécies menos micotróficas, evoluindo para o crescimento de plantas mais micotróficas. No entanto, há pesquisadores que observaram o surgimento de espécies menos micotróficas ao longo da sucessão (Allsopp e Stock, 1994; Francis e Read, 1994; Siqueira et al., 1998), mostrando que os conhecimentos ainda não são conclusivos a esse respeito. Essas diferenças entre espécies mais ou menos micotróficas podem contribuir para a redução ou incremento de espécies de fungos MAs associados.

Tabela 1. Fungos MAs nativos de solos minerados.

Fungos MAs	Mineração	Local	Referências
<i>Entrophospora infrequens</i>	Carvão	Canadá	Zak, Danielson e Parkinson (1982)
<i>E. colombiana</i>		E.U.A.; Índia	Morton e Walker (1984); Mehrotra (1998)
<i>Scutellospora calospora</i>	Carvão	Escócia, E.U.A., Índia	Daft, Hacsckaylo e Nicolson (1975), Mehrotra (1998)
<i>S. aurigloba</i> ; <i>S. erythropha</i> ; <i>S. nigra</i> ; <i>S. persica</i> <i>S. pellucida</i>	Magnetita	Índia	Raman et al. (1993)
<i>Gigaspora</i> sp.	Bauxita	Brasil	Souza (1997)
<i>G. rosea</i>	Magnetita	Índia	Raman et al. (1993)
<i>G. gigantea</i>	Carvão	Escócia, E.U.A.	Daft, Hacsckaylo e Nicolson (1975); Daft e Hacsckaylo (1976)
	Magnetita	Índia	Raman et al. (1993)
<i>Glomus</i> sp.	Carvão	Índia	Mehrotra (1998)
	Bauxita	Brasil	Souza (1997)
<i>G. aggregatum</i>	Carvão	Canadá, Índia	Zak, Danielson e Parkinson (1982); Mehrotra (1998)
	Carvão e calcita	Índia	Ganessan et al. (1991)
	Magnetita	Índia	Raman et al. (1993)
<i>G. fasciculatum</i>	Carvão	Escócia, E.U.A., Índia	Daft, Hacsckaylo e Nicolson (1975); Daft e Hacsckaylo (1976); Allen e Allen (1980); Raman et al. (1993)
<i>G. macrocarpum</i>	Carvão	Escócia, E.U.A.	Daft, Hacsckaylo e Nicolson (1975); Khan (1978); Allen e Allen (1980); Raman et al. (1993)
<i>G. microcarpum</i>	Magnetita	Índia	
<i>G. mosseae</i>	Carvão	Canadá, Rep. Tcheca	Zak, Danielson e Parkinson (1982); Enkhtuya, Rydlová e Visátka (2000)
<i>G. ambisporum</i>	Carvão	Índia	Mehrotra (1998)
<i>G. etunicatum</i>	Bauxita	Brasil	Souza (1997)
	Pirita e carvão	Rep. Tcheca	Enkhtuya, Rydlová e Visátka (2000)
<i>G. intraradices</i>	Magnetita	Índia	Raman et al. (1993)
<i>G. fistulosum</i>	Pirita e carvão	Rep. Tcheca	Enkhtuya, Rydlová e Visátka (2000)
<i>G. occultum</i>	Bauxita	Brasil	Souza (1997)
<i>G. rubiforme</i>	Carvão	Austrália	Khan (1978)
<i>Acaulospora</i> sp.; <i>A. longula</i> ; <i>A. morrowiae</i> ;	Bauxita	Brasil	Souza (1997)
<i>A. birecticulata</i>	Magnetita	Índia	Raman et al. (1993)
<i>A. scrobiculata</i>	Carvão	Índia	Mehrotra (1998)
	Bauxita	Brasil	Souza (1997)

Ainda, em função dos fatores edáficos, pode haver alteração populacional, com redução, aumento e, ou, surgimento de espécies dominantes. Há uma correlação inversa entre alta fertilidade do solo e micotrofismo (Cardoso et al., 1986; Siqueira, 1994; Smith e Read, 1997). No entanto, a correção da fertilidade do solo tende a aumentar a colonização radicular por reduzir fatores supressivos relacionados ao pH e disponibilidade de nutrientes (Siqueira, Hubbell e Mahmud, 1984; Lambais e Cardoso, 1990; Smith e Read, 1997). Vários pesquisadores verificaram dominância de espécies de fungos MAs em função do pH do solo e de práticas agrícolas. Espécies de *Acaulospora scrobiculata* e *Entrophospora colombiana* tendem a dominar em solos com pH menor que 6,5, enquanto espécies de *Gigaspora* e *Glomus* dominam em solos com maiores valores de pH (Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira, 1989; Souza, 1997; Mehrotra, 1998). Douds et al. (1995) verificaram maior frequência de *G. occultum* em solos com pequeno revolvimento ou sob plantio direto, e *G. etunicatum* e *Glomus* spp. em solos revolvidos e cultivados, confirmando o efeito diferenciado dessas práticas nas populações de fungos MAs do solo.

As variações na densidade e diversidade de populações de fungos MAs em solos minerados submetidos à reabilitação podem ser estudadas através da determinação quantitativa (contagem direta) e qualitativa (identificação) dos esporos extraídos do solo. Entretanto, o potencial de inóculo natural (capacidade de colonização radicular) nem sempre é explicado pelo número total de esporos no solo, visto à existência de outros propágulos como micélio fúngico e fragmentos de raízes colonizadas, também responsáveis pela colonização radicular. Assim, a técnica do número mais provável (NMP) desses propágulos (Souza e Guerra, 1998) é fundamental para uma avaliação mais precisa da infectividade e eficiência das populações de fungos MAs nativos do solo.

Em solos de mineração, Jasper, Robson e Abbott (1987), Walland e Allen (1987) e Diaz e Honrubia (1993) verificaram redução no número de

propágulos de fungos MAs, a qual poderia comprometer a revegetação e reabilitação desses sistemas. Tem sido registrado baixo número de espécies de fungos MAs em solos minerados de carvão (Mehrotra, 1998) (6 espécies) e magnesita (13 espécies) na Índia (Raman et al., 1993), de carvão (8 espécies) nos Estados Unidos (Kieman, Hendrix e Maronek, 1983) e de bauxita (11 espécies) no Brasil (Souza, 1997). Para incrementar esse baixo número de espécies, pode-se indicar duas possibilidades: 1) inoculação de espécies através de plantas micorrizadas (Silva, Souza e Franco, 1996; Saggin-Júnior e Lovato, 1999), e 2) melhorando as condições edáficas e, ou, cobertura vegetal para estimular a sobrevivência, esporulação e atividade da população nativa desses microrganismos (Fox et al., 1991; Silva, Souza e Franco, 1996). Diaz e Honrubia (1995) avaliaram a possibilidade de cultivo de plantas inoculadas com *Glomus fasciculatum* em solos minerados e verificaram baixa competitividade dessa espécie com os fungos nativos. Resultados semelhantes foram obtidos por Franco et al. (1996) após introdução de fungos MAs em solos de mineração de bauxita em Porto Trombetas (PA, Brasil), demonstrando baixa capacidade de adaptação das espécies exóticas ao novo ambiente. Enkhtuya, Rydlová e Vosátka (2000) compararam a eficiência de fungos MAs nativos (*Glomus mosseae*, *G. fistulosum*, *G. etunicatum*, *G. intraradices*) de solos minerados de carvão da República Tcheca com fungos exóticos (*G. mosseae*, *G. fistulosum*, *G. geosporum*) no crescimento de milho cultivado nesses mesmos solos e verificaram que nem sempre os fungos mais adaptados às condições de estresse apresentam alta capacidade simbiótica. Outros resultados de Rydlová (1998), citado por Enkhtuya, Rydlová e Vosátka (2000), comprovaram que fungos MAs nativos de solos minerados apresentaram baixa eficiência em plantas nativas desses solos, mesmo apresentando alta capacidade de colonização radicular.

Tótola (1994) estudou o efeito da inoculação de *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora margarita* e *Glomus etunicatum* em cedro e angico

vermelho cultivados em solos de mineração de bauxita e verificou efeito positivo, principalmente de *G. etunicatum*, no crescimento e acúmulo de nutrientes por essas espécies arbóreas. Ainda, Silva, Souza e Franco (1996) obtiveram aumento na densidade e diversidade de fungos MAs em solos onde a camada superficial foi retirada, quando realizaram o plantio de leguminosas micorrizadas.

Estudos de ocorrência, densidade e diversidade de fungos MAs em solos minerados tomam-se essenciais em futuros planejamentos de reabilitação, os quais envolvem não somente a seleção de estratégias adequadas, mas também o tempo necessário para recuperação dessas populações e o retorno de fluxo de energia e nutrientes nesses ambientes.

2.3 A reabilitação de solos minerados

O sucesso da reabilitação de solos minerados é extremamente variável em função das condições físicas, químicas e biológicas dos sítios e das estratégias adotadas no processo. Pode-se dizer que a fertilidade do solo varia em função das espécies utilizadas na revegetação e do grau de reabilitação (Franco et al., 1992; Maschio, Scalzo e Gaiad, 1992; Dias, Franco e Campello, 1994), afetando diretamente o sucesso da reabilitação dos solos minerados. O grau de cobertura vegetal e a diversidade florística, que são expressões da estrutura e organização biológica dos ecossistemas, como também a fauna silvestre, têm sido empregados como indicadores do grau de reabilitação de sítios impactados (Brower e Zar, 1977). Estes parâmetros, além de outros, são de fato indicadores da complexidade e estabilidade do novo ecossistema, mas podem não refletir a reabilitação dos solos minerados por não oferecerem indicações da funcionalidade deste componente do ecossistema. Em estudos conduzidos em solos de mineração de carvão nos EUA (Skouse, Johnson e Garbutt, 1994) e de bauxita no Brasil (Ruivo, 1998), não foi encontrada relação

entre características da vegetação e reabilitação do solo, mostrando que nem sempre a reabilitação visualizada acima do solo é semelhante àquela que ocorre no subsolo. Assim, o conhecimento das condições biológicas do solo em ecossistema cronologicamente distinto em termos de reabilitação é de grande interesse no contexto eco-funcional dessas áreas (Siqueira et al., 1994).

Doran, Sarrantonio e Liebig (1996) elaboraram uma lista de atributos que afetam as funções ecológicas e a qualidade do solo, como, por exemplo, densidade, infiltração e capacidade de retenção de água, C e N orgânico total, condutividade elétrica, pH, nutrientes disponíveis, biomassa e atividade microbianas. Embora estes atributos possam ser úteis como indicadores da qualidade do solo, não estão necessariamente associados com a saúde do solo e a manutenção das suas funções ecológicas essenciais. Uma das razões para essa inconsistência pode ser a falta de sensibilidade de muitas dessas avaliações ao tempo de amostragem, ao manejo ou a eventos ambientais (van Bruggen e Semenov, 2000). Muitos, se não a maioria dos atributos físicos e químicos do solo exigidos para o máximo desenvolvimento vegetal, são afetados diretamente pelos processos bióticos (Lee, 1994), destacando-se a importância dos microrganismos no funcionamento e equilíbrio de ecossistemas. Estes facilitam o desenvolvimento da estrutura do solo e controlam a disponibilidade de nutrientes às plantas através da mediação nos ciclos biogeoquímicos dos elementos e melhoramento de limitações químicas como pH ou níveis tóxicos de substâncias, proporcionando maior desenvolvimento da comunidade vegetal em solos minerados (Tate e Klein, 1985). Qualquer perturbação do solo promoverá uma alteração da comunidade microbiana do solo com impacto direto na cadeia trófica associada. A extensão e duração das mudanças sucessionais dependerão da intensidade e duração da perturbação, a qual pode ser fraca e curta ou crônica (van Bruggen e Semenov, 2000). Em resposta à perturbação fraca, as comunidades microbianas tendem a retornar rapidamente às condições originais,

enquanto as perturbações crônicas resultam numa longa sucessão microbiana, levando a um novo equilíbrio dinâmico entre os componentes do ecossistema. Os microrganismos do solo podem contribuir para o processo de sucessão e alterar a estrutura da comunidade vegetal (Janos, 1980; Pflieger, Stewart e Noyd, 1994; Francis e Read, 1994; Siqueira et al., 1998; Van der Heijden et al., 1998; Clay e Holah, 1999). Visser e Parkinson (1992) indicaram a importância das mudanças na estrutura da comunidade microbiana e diversidade funcional para avaliar a extensão da degradação e o progresso da reabilitação de solos degradados pela mineração. No entanto, poucos pesquisadores têm atualmente investigado as alterações na estrutura da comunidade microbiana ao longo do tempo em resposta à perturbação ou estresse.

→ Os microrganismos funcionais, como os diazotróficos e fungos MAS, apresentam grande potencialidade de utilização como indicadores da qualidade do solo (Visser e Parkinson, 1992; Turco, Kennedy e Jawson, 1994) e, devido à participação nos ciclos biogeoquímicos e incorporação de nitrogênio, otimização da utilização de nutrientes pelas plantas, contribuição ao processo de agregação do solo e sustentabilidade do solo, apresentam grande potencial de serem também utilizados na avaliação da reabilitação de solos degradados pela mineração. Segundo Doran e Zeiss (2000), estes microrganismos podem ser considerados indicadores eficientes da reabilitação desses solos devido à sensibilidade a perturbações antropogênicas e boa correlação com as funções benéficas do solo, constituindo excelentes ferramentas de compreensão dos processos que ocorrem nesse ecossistema impactado.

No Brasil e no mundo, os estudos ligados ao efeito de diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação de solos de mineração de bauxita na densidade e diversidade de microrganismos diazotróficos endofíticos e simbióticos com plantas bem como de fungos micorrizicos arbusculares são inexistentes ou raros. Estes grupos funcionais-chave de microrganismos nos

solos minerados são ferramentas fundamentais nos estudos da qualidade e reabilitação desses solos, auxiliando a sua avaliação e planejamento. Seu manejo pode contribuir para o retorno de processos microbiológicos importantes na funcionalidade e sustentabilidade desses sistemas degradados pela atividade da mineração.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, E.B.; ALLEN, M.F. Natural re-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in Wyoming. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v.17, n.1, p.139-147, Apr. 1980.
- ALLSOPP, N.; STOCK, W.D. VA mycorrhizal infection in relation to edaphic characteristics and disturbance regime in three lowland plant communities in the South-Western Cape, South Africa. *Journal of Ecology*, Oxford, v.82, n.2, p.271-279, June 1994.
- ANDRADE, L.A.B.L. de. Associação micorrízica e matéria orgânica no crescimento de *Brachiaria decumbens* em estéril de mineração de ferro e bauxita. Viçosa: UFV, 1991. 53p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. Diversity and abundance of populations of bean-nodulating rhizobia as a function of liming and cropping history in acidic Brazilian soils. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds). *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000. p.546.
- BAGGIO, A.J. The role of Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) traditional agroforestry systems in biological nitrogen fixation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS. THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. Abstracts... Angra dos Reis: EMBRAPA-CNPBS, 1995. p.72.
- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S. de; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME,

- L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: UFLA/DCS, 1999. p.621-666.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, May/June 1997.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v.13, p.65-73, 1992.
- BARTH, R.C. **Avaliação de áreas mineradas no Brasil**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 41p. (Boletim Técnico, 1).
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, n.2, p.103-121, Feb. 1997.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds). **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-410.
- BÉCARD, G.; DOUDS, D.D.; PFEFFER, P.E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.3, p.821-825, Mar. 1992.
- BÉCARD, G.; PICHÉ, Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.9, p.2320-2325, Sept. 1989.
- BIRO, B.; VOROS, I.; KOVESPECHY, K.; SZEGI, J. Symbiont effect of rhizobium-bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on *Pisum sativum* in recultivated mine spoils. **Geomicrobiology Journal**, New York, v.11, n.3/4, p.275-284, July/Dec. 1993.
- BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, n.1/3, p.265-292, 1986.
- BODDEY, R.M.; SÁ, J.C.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural

systems in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.787-799, May/June 1997.

BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Projeto Sapucaí: Estado de Minas Gerais e São Paulo. Brasília, 1979. 299p. (Relatório Geologia, 4).

BRASIL. Ministério do Interior. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação. Brasília, 1990. 96p.

BRAUNBERG, P.G.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi after wetting and drying. *The New Phytologist*, Oxford, v.134, n.4, p.673-684, Dec. 1996.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J.; THIES, J.E. Manipulation of rhizobia microflora for imposing legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil*, The Hague, v.174, n.1/2, p.143-180, July 1995.

BROWER, J.E.; ZAR, J.H. *Field & laboratory methods for general ecology*. Dubuque: Iowa Wm. C. Brown, 1977. p.8-20.

BRUNDRETT, M.C.; ABBOTT, L.K. Mycorrhizal fungus propagules in the Jarrah Forest. 1. Seasonal study of inoculum levels. *The New Phytologist*, Oxford, v.127, n.3, p.539-546, July 1994.

*CARDOSO, E.J.B.N. Eficiência de fungos micorrizicos vesículo-arbusculares em soja, com *Rhizobium japonicum* e fosfato de rocha, em função do tipo de solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.10, n.1, p.17-23, jan./abr. 1986.

*CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D.; OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrizicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citrus. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.10, n.1, p.25-30, jan./abr. 1986.

CHUEIRE, L.M.O.; FERREIRA, M.C.; ANDRADE, D.S.; HUNGRIA, M. Effects of soil tillage management and crop rotation on bradyrhizobia population. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds.) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000. p.551.

CLAY, K.; HOLAH, J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, London, v.285, n.5934, p.1742-1744, Sept. 1999.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; LOVATO, A.; MAIA, A.H.N.; MANFIO, G.P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian

agricultural soils cultivated with soybeans. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.13, n.2, p.159-167, Oct. 1999.

CUENCA, G.; ANDRADE, Z. de; ESCALANTE, G. Diversity of glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.30, n.6, p.711-719, June 1998.

DAFT, M.J.; HACSKAYLO, E. Arbuscular mycorrhizas in the anthracite and bituminous coal wastes of Pennsylvania. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v.13, n.3, p.523-531, Dec. 1976.

DAFT, M.J.; HACSKAYLO, E.; NICOLSON, T.H. Arbuscular mycorrhizas in plants colonizing coal spoils in Scotland and Pennsylvania. In: SAUNDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (eds). *Endomycorrhizas*. New York: Academic Press, 1975. p.561-580.

DENTON, M.D.; CONVENTRY, D.R.; BELLOTTI, W.D.; HOWIESON, J.G. Distribution, abundance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* from alkaline pasture soils in South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Victoria, v.40, n.1, p.25-35, Jan. 2000.

DIAS, L.E.; FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C. Dinâmica de matéria orgânica e de nutrientes em solo degradado pela extração de bauxita e cultivado com *Eucaliptus pellita* e *Acacia mangium*. SIMPÓSIO SUL AMERICANO, 1.; SIMPÓSIO NACIONAL: recuperação de áreas degradadas, 2., 1994, Foz do Iguaçu. Anais... Curitiba: FUPEF, 1994. p.515-525.

* DIAZ, G.; HONRUBIA, M. Effect of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytosoides*. *Biologia Plantarum*, Dordrecht, v.37, n.1, p.121-129, 1995.

DIAZ, G.; HONRUBIA, M. Infectivity of mine soils from southeast Spain. 2. Mycorrhizal population levels in spoilt sites. *Mycorrhiza*, Berlin, v.4, n.2, p.85-88, Dec. 1993.

DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J. (ed.) *Methods for evaluating biological nitrogen-fixation*. New York: J. Wiley, 1980. p.535-555.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.44, n.5, p.310-313, set./out. 1992.

- DÓBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI; Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- DORAN, J.W.; SARRANTONIO, M.; LIEBIG, M.A. Soil health and sustainability. *Advances in Agronomy*, New York, v.56, p.1-54, 1996.
- DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.15, n.1, p.3-11, Jan. 2000.
- DOUDS, D.D.; GALVEZ, L.; JANKE, R.R.; WAGONER, P. Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v.52, n.2/3, p.111-118, Feb. 1995.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa em Florestas. Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1988. 70p.
- ENKHTUYA, B.; RYDLOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.14, n.3, p.201-211, May 2000.
- ERRICO, J.C.D.; HORTA, R.M.H. Geologia e fisiologia de planalto de Poços de Caldas. Poços de Caldas: ALCOMINAS, 1977. 68p. (Relatório Técnico).
- FALLIK, E.; OKON, Y.; FISHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.20, n.1, p.45-50, 1988.
- FERREIRA, M.C.; ANDRADE, D.D.; CHUEIRE, L.M.D.; TAKEMURA, S.M.; HUNGRIA, M. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.32, n.5, p.627-637, May 2000.
- FOX, R.L.; DE LA PENA, R.S.; GAVENDA, R.T.; HABTE, M.; HUE, N.V.; IKAWA, H.; JONES, R.C.; PLUCKNETT, D.L.; SILVA, J.A.; SOLTANPOUR, P. Amelioration, revegetation, and subsequent soil formation in denuded bauxitic materials. *Allertonia*, v.6, n.2, p.128-184, Jan. 1991.
- FRANCIS, R.F.; READ, D.J. The contributions of mycorrhizal fungi on the determination of plant community structure. *Plant and Soil*, The Hague, v.159, n.1, p.11-25, Feb. 1994.

- FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F.C. Fixação biológica de nitrogênio: alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa: UFLA/DCS, 1999. p.577-596.
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.; SILVA, E.M.R.; FARIA, S.M. *Revegetação de solos degradados*. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1992. 11p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 9).
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C; DIAS, L.E.; FARIA, S.M. Use of nodulated and mycorrhizal legume trees for revegetation of residues from bauxite mining. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS-NITROGEN FIXATION*, 1995, Angra dos Reis. Abstracts... Angra dos Reis: EMBRAPA-CNPAB/ UFRRJ/ Brazilian Academy of Sciences, 1995. p.80.
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C; DIAS, L.E.; FARIA, S.M. *Uso de leguminosas associadas a microrganismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas-PA*. Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1996. 69p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 27).
- FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. de. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.897-903, May/June 1997.
- FRESQUEZ. R.R.; ALDON, A.A.; LINDERMANN, W.C. Microbial diversity of fungal genera in reclaimed coal mine spoils and soils. *Reclamation Reveg. Res.*, v.4, n.3, p.245-258, 1986.
- GANESAN, V.; RAGHUPATHY, S.; PARTHIPAN, B.; RAJINI RANI, D.B.; MAHADEVAN, A. Distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal association in coal, lignite and calcite mine spoils of India. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.12, n.2, p.131-136, 1991.
- GARDNER, J.H.; MALAJCZUK, N. Recolonisation of rehabilitated bauxite mine sites in Western Australia by mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v.24, n.1, p.27-42, 1988.
- GISLER, C.V.T. *O uso da serapilheira na recomposição vegetal em áreas mineradas de bauxita, Poços de Caldas, MG*. São Paulo: USP, 1995. 147p. (Tese - Mestrado em Ecologia).
- GOULD, A.B.; HENDRIX, J.W.; FERRISS, R.S. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentuck. I. Propagule and spore population densities. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.74, n.2, p.247-261, Feb. 1996.

- GRIFFITH, J.J. Recuperação conservacionista da superfície de áreas mineradas: uma revisão de literatura. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1980. 106p. (UFV. Boletim Técnico, 79).
- HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (ed.) *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.15-39.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, v.65, p.151-164, 2000.
- JANOS, D.P. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, St. Louis, v.12, p.56-64, June 1980.
- * JASPER, D.A.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. The survival of infective hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in dry soil: an interaction with sporulation. *The New Phytologist*, Oxford, v.124, n.3, p.473-479, July 1993.
- JASPER, D.A.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. The effect of surface mining on the infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, v.35, n.6, p.641-652, 1987.
- JASPER, D.A.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Phosphorus and the formation of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.11, p.501-505, 1979.
- JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (eds.). *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison, 1992. p. 71-99.
- KABIR, Z.; O'HALLORAN, I.P.; WIDDEN, P.; HAMEL, C. Vertical distribution of arbuscular mycorrhizal fungi under corn (*Zea mays* L.) in no-till and conventional tillage systems. *Mycorrhiza*, Berlin, v.8, n.1, p.53-55, July 1998.
- KARUNARATNE, S.; BAKER, J.H.; BARKER, A.V. Phosphorus uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal root of soybean. *Journal of Plant Nutrition*, New York, v.9, n.10, p.1303-1313, 1986.
- KHAN, A.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in plants colonizing black wastes from bituminous coal mining in the Illawarra region of New South Wales. *The New Phytologist*, Oxford, v.81, n.1, p.53-63, Jan. 1978.
- KIERNAN, J.M.; HENDRIX, J.W.; MARONEK, D.M. Endomycorrhizal fungi occurring on orphan strip mines in Kentucky. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.61, n.6, p.1798-1803, June 1983.

- KLING, M.; JAKOBSEN, I. Arbuscular mycorrhiza in soil quality assessment. *Ambio*, Stockholme, v.27, n.1, p.29-34, Feb. 1998.
- LAMBAIS, M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Response of *Stylosanthes guianensis* to endomycorrhizal fungi inoculation as affected by lime and phosphorus applications. I. Plant growth and development. *Plant and Soil*, The Hague, v.129, n.2, p.283-289, Dec. 1990.
- LEE, K.E. The functional significance of biodiversity in soils. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15., 1994, Acapulco. *Anais... Acapulco: International Society of Soil Science*, 1994. p.168-182.
- LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, Z.A.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.8, p.447-459, 1987.
- LIMA, W.P. *Impacto ambiental do eucalipto*. 2.ed. São Paulo: EDUSP, 1993. 301p.
- LORENZO, J.A. *Regeneração natural de uma área minerada de bauxita em Poços de Caldas, Minas Gerais*. Viçosa: UFV, 1991. 151p. (Tese - Mestrado em Ciência Florestal)
- MAGALHÃES, F.M.M. *Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio*. Manaus: Universidade do Amazonas, 1983. 89p. (Tese - Mestrado em Botânica).
- MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.15, n.4, p.246-252, out./dez. 1984.
- MALAJCZUK, N.; LINDERMAN, R.G.; KOUGH, J.; TRAPPE, J.M. Presence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Eucalyptus* spp. and *Acacia* sp. and their absence in *Banksia* sp. after inoculation with *Glomus fasciculatus*. *The New Phytologist*, Oxford, v.87, n.4, p.567-572, Apr. 1981.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east Region of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.1005-1010, May/June 1997.
- MASCHIO, L.M.A.; SCALZO, M.S.; GAIAD, S. Bracatinga (*Mimosa scabrella*), eucalipto (*Eucalyptus viminalis*) e pinus (*Pinus taeda*) na recuperação da biodiversidade a nível microbiológico, de solos degradados.

- In: CONGRESSO NACIONAL DE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, Manaus. Anais... Manaus: INPA, 1992. p.457-462.
- MATTOS, J.R.; MATTOS, N.F. A bracinga. Porto Alegre: Instituto de Pesquisa de Recursos Naturais Renováveis, 1980. 40p. (Publicação IPRNR, 5).
- McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H. Winter survival of extraradical hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.12, n.1, p.41-50, Apr. 1999.
- MEHROTRA, V.S. Arbuscular mycorrhizal associations of plants colonizing coal mine spoil in India. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v.130, n.2, p.125-133, Mar. 1998.
- MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. The application of VA Mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In: ALLEN, M.F. (ed). *Mycorrhizal Functioning*. London: Chapman and Hall, 1992a. p.438-467.
- * MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison: ASA, 1992b. p.29-44. (American Society of Agronomy, 54)
- MOLDENKE, A.R.; BAUMEISTER, N.; ESTRADA-VENEGAS, E.; WERNZ, J. Linkages between soil biodiversity and above-ground plant performance. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 15., 1994, Acapulco. Anais... Acapulco, 1994. p.186-204.
- MORTON, J.B.; WALKER, C. *Glomus diaphanum*: a new species in the Endogonaceae common in West Virginia. *Mycotaxon*, New York, v.21, p.431-440, 1984.
- NEGREIROS, J.H.C. Bauxita em Poços de Caldas. Poços de Caldas: ALCOMINAS, 1979. 24p.
- OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.103, p.131-139, 1992.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.26, n.12, p. 1591-1601, Dec. 1994.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.21, n.3, p.197-200, Feb. 1996.

- PENA-CABRIALES, J.J.; ALEXANDER, M. Growth of *rhizobium* in soil amended with organic matter. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.47, n.2, p.241-245, Mar/Apr. 1983.
- PEREIRA, E.G. Diversidade de rizóbios de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. Lavras: UFLA, 2000. 93p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas).
- PRASAD, P.; BASU, S.; BEHERA, N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and cropfield from Eastern India. *Plant and Soil*, The Hague, v.175, n.1, p.85-91, Aug. 1994.
- RAMAN, N.; NAGARAJAN, N.; GOPINATHAN, S.; SAMBANDAN, K. Mycorrhizal status of plant species colonizing a magnesite mine spoil in India. *Biology and Fertility of Soils*, Heidelberg, v.16, n.1, p.76-78, June 1993.
- READ, D.J. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, Basel, v.47, p.376-390, 1981.
- REEVES, F.B.; WAGNER, D.; MOORMAN, T.; KIEL, J. The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid wastes. *American Journal of Botany*, Davis, v.66, n.1, p.6-13, Jan. 1979.
- RUIVO, M.L.P. Vegetação e características do solo como indicadores de reabilitação de áreas mineradas na Amazônia Oriental. Viçosa: UFV, 1998. 101p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas).
- SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; LOVATO, P.E. Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa: UFLA/DCS, 1999. p.725-773.
- SALMINEN, S.O. Effect of ammonium ion on nitrogenase activity in nodule breis and bacteroids from *Pisum sativum* cultivar Trapper. *Biochemistry Biophysics Acta*, Amsterdam, v.658, p.1-9, 1981.
- SILVA, E.M.R.; SOUZA, F.A.; FRANCO, A.A. The establishment of arbuscular mycorrhizal fungi associated with nodulated legume trees in land reclamation in the Amazon and Atlantic forest regions of Brazil. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCORRHIZAE*, 1., 1996, Berkeley. Program and Abstracts... Berkeley: University of California, 1996. p.109.

- * **SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N.** Influência da micorriza vesículo-arbuscular nos parâmetros cinéticos de absorção de P, no crescimento e nutrição do feijoeiro em dois estádios do ciclo da planta. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 4., 1991, Mendes. Trabalhos apresentados... Mendes: EMBRAPA/UFRRJ, 1991. p.144.
- SIMÕES, J.W.; POGGIANI, F.; BALLONI, E.A.L RORIZ, M.S.; LEITE, J.C.C.; VIDGAL, R.M.** Adaptabilidade de espécies florestais de rápido crescimento em solo alterado pela exploração de xisto. IPEF, Piracicaba, v.16, p.1-12, jun. 1978.
- SIQUEIRA, J.O. (ed.)** Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras: UFLA, 1996. 290p.
- SIQUEIRA, J.O.** Micorrizas arbusculares. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. Microorganismos de importância agrícola. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.151-194.
- SIQUEIRA, J.O.; CARNEIRO, M.A.C.; ROSADO, S.C.S.; DAVIDE, A.C.; CURI, N.** Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v.107, n.1/3, p.241-252, Aug. 1998.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. de.** Ocorrência de micorrizas vesicular-arbuscular em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.12, p.1499-1506, dez. 1989.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; MAHMUD, A.W.** Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, The Hague, v.76, n.1/3, p.115-124. 1984.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S.** Microorganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA, 1994. 142p.
- SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.** The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ENVIRONMENTAL STRESS: maize in perspective, 1995, Brasil. Proceeding... Brasil: EMBRAPA/CIMMYT/UNDT, Brasil/México, 1995. p.240-280.
- SKOUSE, J.G.; JOHNSON, C.D.; GARBUTT, K.** Natural revegetation of 15 abandoned mine land sites in West Virginia. *Journal of Environmental Quality*, Madison, v.23, p.1224-1230, 1994.

SMITH, S.E.; READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. 2nd. ed. London: Academic Press, 1997. 605p.

SOUZA, F.A. de; GUERRA, J.G.M. Emprego da técnica do número mais provável (NMP) no estudo de populações de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Seropédica: EMBRAPA/CNPAB, 1998. 34p. (EMBRAPA-CNPAB. Circular Técnica, 2)

SOUZA, F.A. de; SILVA, E.M.R. da. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J.O. (ed.) Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas. Lavras: UFLA/DCS/DCF, 1996. p.255-290.

SOUZA, J.A. Avaliação das estratégias de recuperação de áreas degradadas pela mineração de bauxita em Poços de Caldas (MG). Lavras: UFLA, 1997. 104p. (Tese - Doutorado em Agronomia).

STRALIOTTO, R.; FERREIRA, M.E.; RUMJANEK, N.G. Genotypic diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazilian tropical soils. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds) Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000. p.610.

TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly-beta-dihydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.31,n.7, p.608-613, July 1985.

TATE III, R.L.; KLEIN, D.A. (eds) Soil reclamation processes: microbiological analyses and applications. New York: M. Dekker, 1985. 349p.

*STÓTOLA, M.R. Eficiência de fungos MVA nas espécies cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e angico vermelho (*Piptadenia peregrina* Benth) em estéril de mineração de bauxita. Viçosa: UFV, 1994. 61p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola).

TURCO, R.F.; KENNEDY, A.C.; JAWSON, M.D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. Defining soil quality for a sustainable environment. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.73-90.

VAN BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. Applied Soil Ecology, Amsterdam, v.15, n.1, p.13-24, Jan. 2000.

VAN DER HELDEN, M.G.A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of

- plant community structure. *Ecology*, Washington, v.79, n.6, p.2082-2091, Sept. 1998.
- VISSER, S.; PARKINSON, D. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*, v. 7, n.1/2, p.33-37, 1992.
- WALLAND, M.E.; ALLEN, E.B. Relationships between VA mycorrhizal fungi and plant cover following surface mining in Wyoming. *Journal of Range Management*, Denver, v.40, n.3, p.271-276, May 1987.
- WHITE, J.A.; MUNN, L.C.; WILLIAMS, S.E. Edaphic and reclamation aspects of vesicular-arbuscular mycorrhizal in Wyoming Red Desert soils. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.53, n.1, p.86-90, Jan./Feb. 1989.
- WILLIAMS, D.D.; BUGIN, A.; REIS, J.L.B.C. Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação. Brasília: IBAMA, 1990. 96p.
- WONG, P.P.; EVANS, H.J. Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiology*, Rockville, v.47, n.6, p.750-755, June 1971.
- XIAO-LIN, L.; GEORGE, E.; MARSCHNER, H. Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. *Plant and Soil*, The Hague, v.136, n.1, p.41-48, Sept. 1991.
- YANO, K.; YAMAUCHI, A.; IJIMA, M.; KONO, Y. Arbuscular mycorrhizal formation in undisturbed soil counteracts compacted soil stress for pigeon pea. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.10, n.1/2, p.95-102, Oct. 1998.
- ZAK, J.C.; DANIELSON, R.M.; PARKINSON, D. Mycorrhizal fungal spore numbers and species occurrence in two amended mine spoils in Alberta, Canada. *Mycologia*, New York, v.74, p.785-792, 1982.

CAPÍTULO 2

EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIO EM SOLOS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA, EMPREGANDO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp) E FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

RESUMO

MELLONI, R. Eficiência e diversidade fenotípica de populações de rizóbio em solos de mineração de bauxita, empregando caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Lavras: UFLA, 2001. Cap. 2. 54p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*

A atividade de mineração provoca degradação ambiental em várias partes do mundo, e técnicas de revegetação têm sido indicadas visando reabilitar essas áreas. Levantamentos da ocorrência, eficiência e diversidade de grupos-chaves de microrganismos, como aqueles com capacidade de fixação biológica de nitrogênio, é de extrema importância neste contexto por estarem envolvidos em processos de ciclagem de nutrientes e sustentabilidade dessas áreas. Com este propósito, coletaram-se amostras de solo de sítios de áreas mineradas e sob diferentes estratégias e cronosséqüências de reabilitação, pertencentes à Alcoa Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG), em duas épocas distintas (inverno e verão), em anos consecutivos (1998 e 1999), para instalação de experimentos empregando feijoeiro e caupi como espécies de plantas-isca de rizóbio. Na floração, coletaram-se as plantas, avaliando-se a matéria fresca de raízes, matéria seca da parte aérea, número, matéria fresca e atividade de nódulos, número e diversidade fenotípica de isolados de rizóbio através das características culturais em meio YMA. A mineração reduz a densidade e diversidade fenotípica cultural de populações de rizóbio, enquanto práticas de reabilitação, principalmente com bracatingas e, excetuando com eucalipto em plantio homogêneo e adensado, proporcionam aumentos nestas variáveis. O caupi é mais indicado que o feijoeiro para estudos de densidade, diversidade fenotípica cultural e eficiência simbiótica de populações de rizóbio.

* Comitê de Orientação: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Orientadora), José Oswaldo Siqueira - UFLA

**EFFICIENCY AND PHENOTYPIC DIVERSITY AMONG RHIZOBIA
POPULATIONS IN BAUXITE MINED SOILS, USING *Vigna unguiculata*
L. Walp AND *Phaseolus vulgaris* L. PLANTS**

ABSTRACT

MELLONI, R. Efficiency and phenotypic diversity among rhizobia populations in bauxite mined soils, using *Vigna unguiculata* L. Walp and *Phaseolus vulgaris* L. plants. Lavras: UFLA, 2001. Chap. 2. 54p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)*

Mining activity promotes high environmental degradation in many countries, and revegetation techniques have been indicated for rehabilitation of these areas. Occurrence, efficiency and diversity of key microbial groups, like those with fixing nitrogen capacity, is very important because they are related to nutrient cycling processes and sustainability of these areas. With this aim, soil samples were collected from different bauxite mining areas and with different rehabilitation strategies and chronosequences, belonging to Alcoa Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG, Brazil), in winter and summer of 1998 and 1999, for conducting experiments using bean and cowpea as rhizobia trap plants, under greenhouse conditions. At flowering, the plants were harvested and shoot dry matter, fresh root matter, nodules number, fresh matter and nitrogenase activity, number and phenotypic diversity of rhizobia isolates by cultural characterization on YMA medium were evaluated. It was observed that mining activity reduces density and cultural phenotypic diversity of rhizobia populations, while rehabilitation strategies, mainly with "bracatingas" (*Mimosa scabrella*) contribute to increase these values. The use of eucalyptus in homogeneous and high density planting was not shown to be an adequate strategy for rehabilitation. Cowpea is more indicated than bean for studies of density, cultural phenotypic diversity and symbiotic efficiency of rhizobia populations.

* Guidance Committee: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Major Professor), José Oswaldo Siqueira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

As atividades de mineração estão entre aquelas mais impactantes do meio ambiente (Sengupta, 1993), sendo responsáveis pela degradação de extensas áreas em todo mundo. A reabilitação dessas áreas é obrigatória e a revegetação tem sido a principal prática para recompor e proteger o solo, evitando a poluição das águas e contribuindo para o fluxo de energia e nutrientes no ecossistema (Siqueira et al., 1994).

Em solos ou substratos pobres ou desprovidos de matéria orgânica, como os de áreas mineradas, o nitrogênio é considerado o nutriente mais limitante para o crescimento vegetal (Franco e Faria, 1997). Por isso, o processo de fixação biológica de nitrogênio é de grande importância na recuperação de áreas degradadas (Boddey et al., 1997; Franco e Faria, 1997; Franco e Balieiro, 1999), com envolvimento de microrganismos diazotróficos e muitas espécies leguminosas e não leguminosas. Para que ocorra a nodulação e fixação biológica de nitrogênio em espécies leguminosas cultivadas nessas áreas, e dentre as quais destaca-se a bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham), é necessária a presença de estirpes de rizóbio com grande capacidade saprofítica, competitiva e eficiência. Atualmente, não há estudos de levantamentos da ocorrência, diversidade e eficiência de populações destes microrganismos em solos de mineração de bauxita sob diferentes estratégias e cronosequências de reabilitação. A eficiência, competitividade e sobrevivência do rizóbio são limitadas por diversos fatores como espécie e nutrição vegetal, baixa fertilidade do solo, toxicidade por Al e Mn decorrente de baixos valores de pH, valores extremos de temperatura e umidade excessiva ou insuficiente no solo, revolvimento, entre outros (Brockwell, Bottomley e Thies, 1995), comuns em solos minerados. A eventual redução da densidade e diversidade da população desses microrganismos compromete o processo de fixação biológica de nitrogênio e faz com que o solo

perca funções importantes que governam a sua sustentabilidade, contribuindo negativamente à reabilitação. Por estes motivos, estratégias adequadas de reabilitação devem ser adotadas visando preservar e, ou, aumentar a densidade e diversidade desses microrganismos no solo.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes estratégias e cronossequências de reabilitação em solos de mineração de bauxita na eficiência e diversidade fenotípica de populações de rizóbio, utilizando feijoeiro e caupi como espécies de plantas-isca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização, caracterização dos sítios de estudo e épocas de amostragem de solo

Os estudos foram desenvolvidos em amostras de solo de áreas pertencentes à empresa ALCOA Alumínio S/A, no município de Poços de Caldas (MG), em duas épocas: agosto de 1998 (final do inverno) e março de 1999 (final do verão). Segundo a classificação de Köppen, o clima dominante na região é Cfb, com verões chuvosos e estações bem definidas, sendo a chuvosa de outubro a março e a seca de abril a setembro. De 1998 a 1999, a precipitação média anual foi de 1852 mm, com mínima de 0 mm, nos meses de julho e agosto, e máxima de 153,0 mm, no mês de dezembro de 1999. A temperatura média anual na região foi de 17,3°C, com menor valor médio em julho (14°C) e maior valor médio em janeiro (21°C). A umidade relativa anual média foi de 78,2%.

Na tabela 1 encontram-se os valores mensais de temperatura, umidade relativa, precipitação e evapotranspiração da região, fornecidos pela estação meteorológica da Alcoa-Poços, na própria empresa ALCOA Alumínio S/A.

Destacam-se a baixa precipitação e alta evapotranspiração registradas no inverno de 1998 (primeira amostragem), em relação ao verão de 1999 (segunda amostragem).

TABELA 1. Valores mensais de temperatura (Temp), umidade relativa (UR), precipitação (Prec.) e evapotranspiração (Evap.) da região de Poços de Caldas (MG), segundo estação meteorológica da Alcoa/Poços.

Ano Mês	1998				1999			
	Temp. °C	U.R. %	Prec. mm	Evap. mm	Temp. °C	U.R. %	Prec. mm	Evap. mm
Jan.	20,8	86,2	26,8	99,4	n.d.	n.d.	n.d.	0,0
Fev.	20,8	84,8	258,5	50,3	15,6	88,5	90,0	14,0
Mar.	21,2	79,5	16,0	12,0	16,0	87,9	127,2	45,0
Abr.	24,5	86,9	52,5	6,1	16,6	85,7	72,5	67,3
Mai.	20,2	87,7	2608,0	50,1	14,0	82,8	34,5	79,5
Jun.	18,7	90,9	2,5	86,6	13,3	87,7	39,8	35,4
Jul.	15,8	83,3	0,0	82,3	14,2	84,4	6,5	50,9
Ago.	14,7	80,4	1,0	64,0	13,1	73,3	0,0	83,5
Set.	15,8	77,5	8,0	47,0	16,2	74,1	69,5	80,0
Out.	16,4	81,0	0,0	12,0	17,6	80,1	74,5	79,2
Nov.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,4	81,3	62,3	84,7
Dez.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,6	86,4	153,2	33,7

n.d. = não disponível. Precipitação e evapotranspiração acumuladas durante o mês.

No município de Poços de Caldas (MG) ocorrem dois tipos de jazidas de bauxita: as jazidas de serra e as jazidas de campo (BRASIL, 1979). Por isso, duas regiões foram escolhidas para o estudo, sendo uma região de campo, com espécies herbáceas e arbustivas (características de campo tropical), e outra região de serra, mais montanhosa e com cobertura vegetal abundante de espécies arbóreas. Posteriormente, os sítios de estudo foram selecionados conforme o tipo

de solo e variedade de estratégias de revegetação adotadas e cronosseqüências de reabilitação. A caracterização destes sítios está na tabela 2 e as respectivas fotos nas figuras de 1 a 15.

Todos os sítios apresentaram o mesmo tipo de solo, Cambissolo distrófico. Esta homogeneização permitiu isolar o efeito das diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação na microbiota destes solos. Deve-se salientar ainda que os sítios recém-minerados (RM) do campo e serra da primeira amostragem (agosto de 1998) foram revegetados, entrando em processo de reabilitação. Assim, como a próxima amostragem foi em março de 1999 (verão), estes sítios já estavam em processo de reabilitação há 6 meses, cuja identificação foi alterada para RM-BG no campo (reabilitado com braquiária e guandu) e RM-GG na serra (reabilitado com capim-gordura e guandu), conforme tabela 2.

TABELA 2. Principais características dos sítios amostrados no campo e serra.

Sítios	CAMPO	Idade ¹	Área (ha)	Localização e altitude ²
RM-BG ³ (Figura 1)	Recém-minerado, coberto por braquiária (<i>Brachiaria decumbens</i>) e feijão-guandu (<i>Cajanus cajan</i>).	6 meses	4,98	LS 21°51'31" LW 46°30'36" 1.455 m
E3 (Figura 2)	Plantio homogêneo de eucalipto (<i>Eucalyptus saligna</i>)	3 anos	4,22	LS 21°50'54" LW 46°30'09" 1.435 m
CA4 (Figura 3)	Capim-azevém (<i>Lolium multiflorum</i>) e <i>Eupatorium</i> sp. (Asteraceae)	4 anos	1,33	LS 21°51'35" LW 46°30'32" 1.425 m
BCG10 (Figura 4)	Capim-gordura (<i>Melinis minutiflora</i>), em sucessão. Presença de espécies nativas como bracatinga.	10 anos	1,9	LS 21°51'39" LW 46°30'15" 1.410 m
E16 (Figura 5)	Eucalipto (<i>Eucalyptus saligna</i>) e serapilheira espessa	16 anos	4,69	LS 21°50'12" LW 46°29'21" 1.400 m
BCG19 (Figura 6)	Bracatinga (<i>Mimosa scabrella</i>) e sub-bosque bem desenvolvido (capim-gordura, alecrim)	19 anos	1,73	LS 21°51'36" LW 46°30'37" 1.455 m
RF (Figura 7)	Referência, com espécies gramínoídes e arbustivas (sem alteração antrópica)	-	11,0	LS 21°51'32" LW 46°30'43" 1.466 m
SERRA				
RM-GG ³ (Figura 8)	Recém-minerado. Coberto por capim-gordura, feijão guandu e espécies arbóreas nativas	6 meses	4,85	LS 21°50'12" LW 46°29'21" 1.400 m
BG2 (Figura 9)	Braquiária, feijão-guandu e espécies arbóreas nativas	2 anos	n.d.	LS 21°47'21" LW 46°31'36" 1.370 m
BCG6 (Figura 10)	Bracatinga e sub-bosque coberto por capim-gordura	6 anos	2,55	LS 21°47'10" LW 46°31'30" 1.450 m
M10 (Figura 11)	Mata de espécies arbóreas nativas e sub-bosque bem desenvolvido, com serapilheira adicionada	10 anos	2,18	LS 21°46'33" LW 46°52'08" 1.560 m
B14 (Figura 12)	Bracatinga e vegetação rasteira e arbustiva, processo de sucessão lento	14 anos	8,89	LS 21°47'08" LW 46°31'21" 1.510 m
E16 (Figura 13)	Eucalipto (<i>E. saligna</i>) e sub-bosque bem desenvolvido (gramíneas e arbustos)	16 anos	17,42	LS 21°47'11" LW 46°31'20" 1.547 m
M18 (Figura 14)	Mata de espécies nativas, incluindo bracatinga, sub-bosque fechado, serapilheira espessa, troncos caídos	18 anos	3,85	LS 21°47'36" LW 46°31'10" 1.850 m
RF (Figura 15)	Referência, mata fechada com espécies arbóreas (sem alteração antrópica)	-	57,23	LS 21°47'27" LW 46°31'19" 1.460m

n.d. = não disponível. ¹ Idade aproximada de reabilitação, em março de 1999. ² Localização: Morro das Árvores (Sítio RM-BG campo), Morro das Árvores II (Sítios CA4, BCG10, BCG19, RF campo), Cabeça de Boi (Sítio E16 campo e RM-GG serra), José Gabriel (Sítio E3 campo), Santa Rosália (Sítio M10 serra), Retiro Branco (Sítios BG2, BCG6, B14, E16, M18, RF serra). ³ Considerar RM para a amostra de solo coletada no inverno (recém-minerado e sem reabilitação) e RM-BG no campo para aquela coletada no verão (sítio reabilitado com braquiária e guandu 6 meses) e RM-GG na serra para o sítio reabilitado há 6 meses com capim-gordura e guandu.

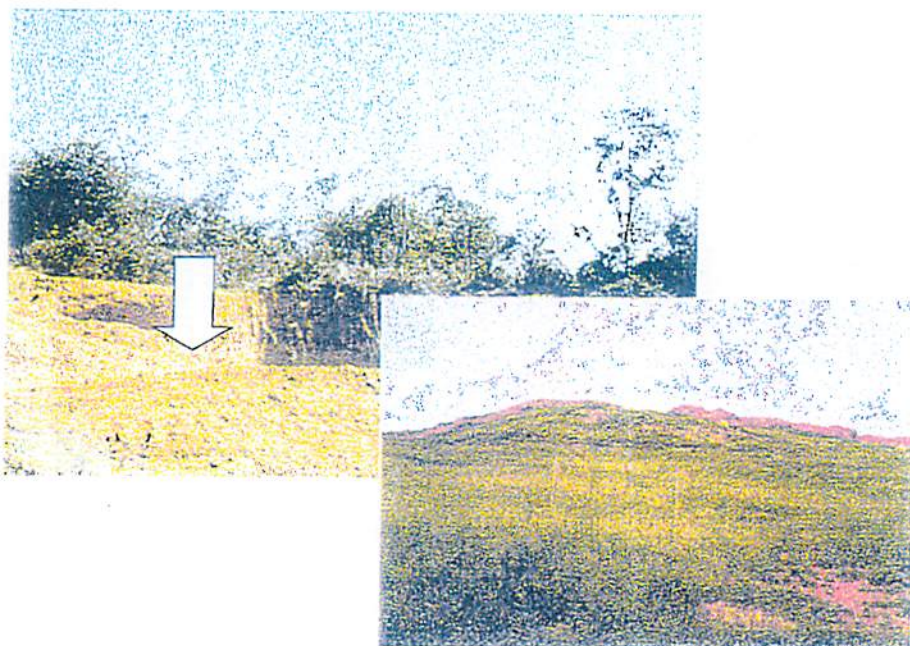


FIGURA 1. Sítio recém-minerado (RM) acima e rehabilitado com braquiária e feijão-guandu 6 meses (RM-BG) abaixo.



FIGURA 2. Sítio com plantio homogêneo e adensado de eucalipto 3 anos (E3).



FIGURA 3. Sítio com capim-azevém e *Eupatorium* 4 anos (CA4).

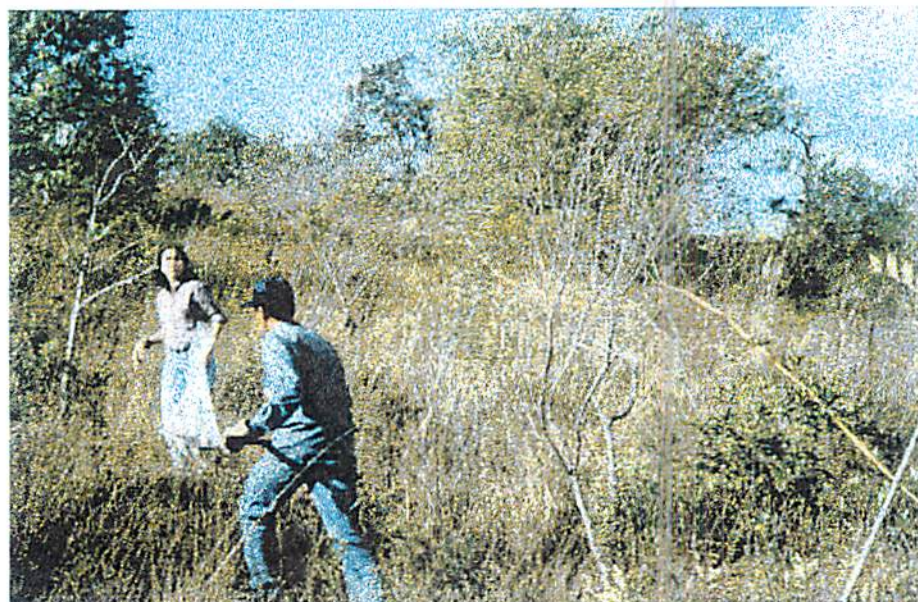


FIGURA 4. Sítio com bracatinga e capim-gordura 10 anos (BCG10).



FIGURA 5. Sítio com plantio homogêneo e adensado de eucalipto 16 anos (E16). Em detalhe, presença de grande quantidade de serapilheira.



FIGURA 6. Sítio com bracatinga e capim-gordura 19 anos (BCG19).



FIGURA 7. Área-referência do campo (RF).

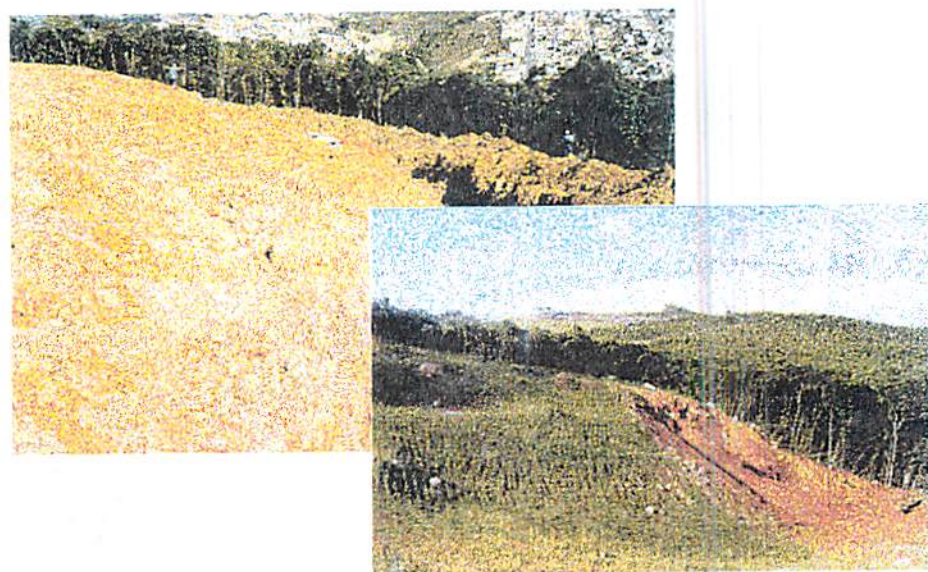


FIGURA 8. Sítio recém-minerado da serra (RM) acima e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses (RM-GG) abaixo.



FIGURA 9. Sítio com braquiária e feijão-guandu 2 anos (BG2).



FIGURA 10. Sítio com bracatinga e capim-gordura 6 anos (BCG6).



FIGURA 11. Sítio com mata de espécies nativas 10 anos (M10). Em detalhe, a coleta de amostra de solo no sub-bosque desenvolvido.



FIGURA 12. Sítio com bracatinga e vegetação rasteira e arbustiva 14 anos (B14).

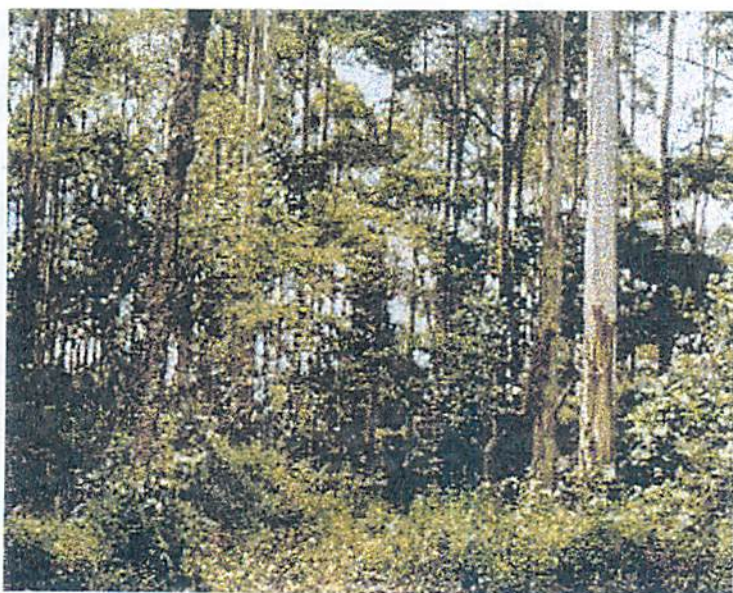


FIGURA 13. Sítio com eucalipto e sub-bosque desenvolvido 16 anos, na serra (E16).



FIGURA 14. Sítio com mata de espécies nativas, incluindo bracatinga e sub-bosque fechado 18 anos (M18).



FIGURA 15. Área-referência da serra (RF).

2.2 Amostragem e caracterização física e química das amostras de solo

As coletas de solo de cada sítio foram feitas dentro de três transectos de 4 x 25 m, na profundidade de 0-10 cm, num total de três amostras compostas por sítio, formadas por dez subamostras cada. As amostras foram submetidas à análise de textura (areia, silte e argila) pela metodologia descrita em EMBRAPA (1997) e às seguintes caracterizações químicas: pH em água relação 1:2,5; Ca, Mg e Al trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹ analisados por titulometria (EMBRAPA, 1997); P e K extraídos pelo método Mehlich 1 e analisados por colorimetria e fotometria de chama, respectivamente (Vettori, 1969), e matéria orgânica determinada por colorimetria (EMBRAPA, 1997).

Os atributos químicos das amostras de solo coletadas no inverno e verão são mostrados nas tabelas 3 e 4, respectivamente, enquanto o resultado da textura das amostras encontra-se na tabela 5.

TABELA 3. Atributos químicos das amostras de solo coletadas no inverno (médias de 3 repetições).

Sítios	pH	P	K	Ca	Mg	Al	MO	V
	H ₂ O 1:2,5	mg dm ⁻³		----- cmol _c dm ⁻³ -----			dag kg ⁻¹	%
Campo								
RM	5,13	1,00	23,00	0,37	0,17	0,00	0,70	20,87
RM*	6,00	1,00	54,00	1,10	0,40	0,00	0,70	55,00
E3	4,77	1,67	34,67	0,53	0,17	0,93	3,51	10,23
CA4	4,90	1,00	31,33	0,50	0,20	0,17	2,04	19,13
BCG10	5,70	1,00	30,33	1,10	1,00	0,00	2,45	45,53
E16	4,67	4,33	24,00	0,40	0,17	1,03	4,02	7,23
BCG19	4,67	1,00	40,67	0,53	0,20	0,80	3,71	10,27
RF	4,70	1,00	41,00	0,33	0,13	0,67	3,80	7,13
Serra								
RM	5,10	1,00	17,00	0,37	0,10	1,67	0,03	13,10
RM*	5,90	6,00	56,30	1,90	1,40	0,00	0,03	73,00
BG2	7,05	2,00	22,33	2,17	1,17	0,00	0,94	68,50
BCG6	6,50	1,00	32,33	3,30	1,77	0,00	3,05	65,83
M10	5,73	4,00	54,33	1,93	1,83	0,07	3,93	45,57
B14	4,97	1,00	43,67	0,97	0,67	1,00	3,70	14,13
E16	4,93	1,00	41,00	0,73	0,20	1,50	2,95	9,87
M18	5,17	2,33	44,33	4,13	1,53	0,37	5,91	36,20
RF	4,87	1,00	88,67	0,67	0,20	1,97	6,27	7,20

* Resultado após calagem e adubação, na colheita das plantas. Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

TABELA 4. Atributos químicos das amostras de solo coletadas no verão (médias de 3 repetições).

Sítios	pH	P	K	Ca	Mg	Al	MO	V
	H ₂ O 1:2,5	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	dag kg ⁻¹	%
Campo								
RM-BG*	5,70	1,67	33,00	2,40	6,33	0,00	3,23	66,23
E3	4,47	1,00	35,33	0,37	0,13	0,87	3,73	9,47
CA4	4,77	1,00	37,33	0,43	0,20	0,57	3,90	11,90
BCG10	5,53	1,33	49,00	1,17	0,83	0,13	3,87	38,90
E16	4,60	2,00	36,00	0,37	0,13	1,17	5,10	8,70
BCG19	4,63	1,67	46,67	0,60	0,20	1,13	6,33	11,67
RF	4,70	2,00	55,33	0,53	0,20	0,97	3,50	11,40
Serra								
RM-GG*	4,87	2,67	32,67	0,67	0,20	1,03	3,50	14,63
BG2	7,00	4,00	38,00	2,07	1,10	0,00	1,17	75,40
BCG6	6,73	1,00	36,00	3,23	2,10	0,00	3,93	71,73
M10	5,17	1,00	46,33	1,73	1,23	0,17	4,57	40,37
B14	4,93	1,00	37,33	0,67	0,20	0,97	4,83	12,53
E16	4,67	1,33	49,33	0,53	0,20	1,80	6,73	8,33
M18	4,87	1,00	27,00	1,50	0,97	0,63	6,97	25,87
RF	5,07	1,00	83,00	0,53	0,20	1,60	7,63	8,90

*Após calagem, adubação mineral e orgânica *in situ*. Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

TABELA 5. Textura das amostras de solo coletadas dos sítios de estudo, na profundidade de 0-10 cm.

Sítios	Areia	Silte	Argila
	g kg ⁻¹		
Campo			
RM	150	250	600
RM-BG	170	280	550
E3	190	300	510
CA4	220	270	510
BCG10	80	300	620
E16	160	360	470
BCG19	110	330	560
RF	100	250	650
Serra			
RM	210	300	490
RM-GG	230	330	440
BG2	130	250	620
BCG6	180	240	580
M10	270	280	450
B14	380	360	260
E16	390	200	410
M18	310	390	300
RF	200	300	500

Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-BG braquiária e guandu 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-GG capim-gordura e guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

2.3 Experimentos em casa-de-vegetação

Em agosto de 1998 (inverno), foram instalados dois experimentos em casa-de-vegetação, sendo um utilizando feijoeiro cv. Carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) e outro caupi cv. Mulato (*Vigna unguiculata* L. Walp) como plantas-isca de rizóbio. Outros dois experimentos foram realizados em março de

1999 (verão), sendo todos instalados em delineamento inteiramente ao acaso e três repetições por tratamento (cada amostra composta equivaleu a uma parcela). Utilizaram-se vasos de PVC (Figura 16) revestidos com sacos plásticos pretos de 1 L (1,25 kg de amostra de solo) para semeadura de feijoeiro e caupi, cujas sementes foram desinfestadas superficialmente em álcool 70% por 3 min, hipoclorito de sódio 1% por 3 min e lavagens sucessivas em água corrente (Andrade e Hamakawa, 1994).



FIGURA 16. Visão geral dos experimentos instalados em casa de vegetação (caupi à esquerda e feijoeiro à direita), utilizando amostras de solo dos sítios de estudo.

Para os experimentos utilizando amostras de solo coletadas no inverno, somente aquelas recém-mineradas e não-reabilitadas (RM) do campo e serra (Tabela 2) receberam calcário dolomítico (14% MgO, 35% CaO e PRNT 100%) para elevar a saturação por bases a 60% e adubação básica (27 mg dm⁻³ de P na forma de superfosfato simples, 50 mg dm⁻³ de K na forma de cloreto de potássio). Estas amostras foram corrigidas pelo fato de os solos desses sítios

recém-minerados não terem ainda recebido calagem e adubação quando da amostragem e pelo fato da baixa fertilidade do solo dificultar o crescimento vegetal. No entanto, todas as amostras de solo coletadas no verão foram corrigidas com calcário dolomítico para elevar a saturação por bases a 70% e adubadas com: 50 mg kg⁻¹ de P-KH₂PO₄, 100 mg kg⁻¹ de K-K₂SO₄, 15 mg kg⁻¹ de S-K₂SO₄, 0,1 mg kg⁻¹ de Mo-HMoO₄.H₂O, 5 mg kg⁻¹ de Zn-ZnSO₄.7H₂O, 1,5 mg kg⁻¹ de Cu-CuCl₂.2H₂O, 0,5 mg kg⁻¹ de B-H₃BO₃. A padronização dos atributos químicos foi feita visando minimizar esse efeito sobre as estratégias de reabilitação, fazendo com que a estratégia em si, e não a fertilidade, pudesse ser o fator causal das variações observadas nas variáveis estudadas.

Manteve-se uma planta por vaso em todos os experimentos e, na floração, após 35 dias da semeadura (experimentos com amostras de solo coletadas no inverno) e 47 dias da semeadura (experimentos com amostras de solo coletadas no verão), coletaram-se as plantas para determinação da matéria seca da parte aérea (secagem em estufa a 60°C com circulação forçada de ar, até peso constante), matéria fresca de raízes, número, matéria fresca e atividade da nitrogenase dos nódulos através da leitura de redução de acetileno em cromatógrafo a gás Varian Star 3400CX (Dilworth, 1966). Com os dados da matéria seca da parte aérea, calculou-se um índice relativo de produção de matéria seca, considerando o valor 100 àquela produzida em amostras de solo da área-referência.

2.4 Isolamento e caracterização de isolados de rizóbio

Após a pesagem dos nódulos frescos, procedeu-se o isolamento de rizóbio. Para isso, os nódulos (mínimo de 10 por planta) foram desinfestados superficialmente com álcool 95%, cloreto de mercúrio 0,1% e lavagens sucessivas em água esterilizada, antes da maceração sob condições assépticas em meio de cultura YMA (Vincent, 1970). As seguintes características culturais

dos isolados foram avaliadas: taxa de crescimento (crescimento muito rápido - 1 dia, rápido - 2 a 3 dias, intermediário - 4 a 5 dias, lento - 6 a 10 dias e muito lento - mais que 10 dias), diâmetro médio das colônias, modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutro), produção de goma (baixa à alta) e coloração das colônias (amarelada e branca). Na figura 17 são mostradas placas com meio YMA e colônias de rizóbio com diferentes características culturais.

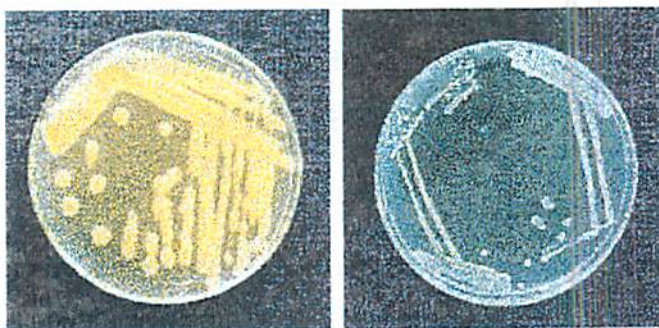


FIGURA 17. Placas com meio YMA e diferentes grupos fenotípicos culturais de isolados de rizóbio: crescimento rápido e acidificação do meio (à esquerda) e crescimento lento e alcalinização do meio (à direita) .

Os grupos fenotípicos culturais dos isolados e as características das estirpes tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (LMG 8819^T) e *trifolii* (LMG 6119^T), *R. etli* (CFN 42^T), *R. tropici* (LMG 9503^T), *R. galegae* bv. *orientalis* (LMG 6214^T), *Bradyrhizobium japonicum* (LMG 6138^T), *B. elkanii* (LMG 6134^T), *Sinorhizobium meliloti* (LMG 6133^T), *S. fredii* (LMG 6217^T), *S. medicae* (USDA 1037^T), *S. saheli* (USDA 4893^T), *S. teranga* (USDA 4894^T), *Mesorhizobium loti* (LMG 6215^T), *M. plurifarum* (INPA 12A^T), *M. ciceri* (USDA 3383^T), *M. huakuii* (USDA 4779^T), *M. tianshiense* (USDA 3592^T), *M. mediterraneum* (USDA 3392^T), *Azorhizobium caulinodans* (LMG 6465^T) e

Alorhizobium undicola (ORS 992^T), foram utilizadas para construção de dendogramas de similaridade, pelo método Complete Linkage e Distância Euclidiana (Everitt, 1993), através do programa STATISTICA 5.0.

Com os grupos morfológicos, calculou-se posteriormente o índice de diversidade de Shannon-Weaver (Shannon e Weaver, 1949) para os diferentes sítios de estudo, conforme a equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i, \text{ onde:}$$

k = número de grupos formados com as diferentes características culturais,

p_i = abundância relativa dos isolados em cada grupo.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com comparação de médias por Duncan a 5% de significância. Valores obtidos de número de nódulos por planta receberam transformação raiz quadrada de $x+0,5$, utilizando o programa estatístico SANEST (Zonta, Machado e Silveira Júnior, 1984).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimentos com amostras de solo coletadas no inverno (agosto de 1998)

3.1.1 Crescimento vegetal

Os resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), índice relativo de produção de MSPA e matéria fresca de raízes (MFR) de feijoeiro e caupi estão apresentados na tabela 6. Houve efeito das diferentes estratégias de reabilitação,

com comportamentos diferenciados entre as espécies de plantas- isca, mas sem efeito da cronossequência de reabilitação nestas variáveis.

TABELA 6. Matéria seca da parte aérea (MSPA), índice relativo de produção de MSPA (IR-MSPA) e matéria fresca (MF) de raízes de feijoeiro e caupi, cultivados em amostras de solo dos diferentes sítios de estudo, coletadas no inverno.

Sítios	MSPA		IR-MSPA		MFR	
	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi
	g planta ⁻¹				g planta ⁻¹	
Campo						
RM	0,45a	0,60a	180	133	1,11d	2,79a
E3	0,44a	0,46bc	176	102	1,87c	2,99a
CA4	0,41a	0,28d	164	62	3,13a	2,40ab
BCG10	0,37a	0,53ab	148	118	3,26a	3,05a
E16	0,37a	0,28d	148	62	2,29bc	1,88b
BCG19	0,25b	0,32d	100	71	1,74c	2,47ab
RF	0,25b	0,45c	100	100	2,80ab	1,94b
Serra						
RM	0,34e	0,65bc	69	112	1,58d	3,43d
BG2	0,54c	0,73b	110	126	3,66a	5,96a
BCG6	0,45d	0,54d	92	93	2,14b	4,21c
M10	0,78a	0,71b	159	122	4,69a	3,54d
B14	0,28e	0,68b	57	117	1,80b	2,30e
E16	0,35e	0,29e	71	50	1,34b	1,46f
M18	0,69b	1,06a	140	183	4,61a	5,18b
RF	0,49cd	0,58cd	100	100	2,13b	1,00f

IR-MSPA: produção de MSPA em relação à produção na área-referência (considerada 100). Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

Para o feijoeiro, com exceção dos sítios da área-referência (RF) e com bracatinga e capim-gordura 19 anos (BCG19) do campo, que promoveram os menores valores de MSPA, os demais sítios não diferiram entre si, com produção relativa de MSPA de 48 a 80% superior àquela produzida em amostras de solo da área-referência. Na serra, as menores produções de MSPA foram obtidas em plantas cultivadas em amostras de solo dos sítios B14 (bracatinga 14 anos), E16 (eucalipto 16 anos), e BCG6 (bracatinga e capim-gordura 6 anos), enquanto os maiores valores foram verificados em plantas cultivadas em amostras de solo do sítio M10 (mata com espécies nativas 10 anos) e M18 (mata de espécies nativas 18 anos), com aumentos de 59 e 40% na produção de MSPA, respectivamente, quando comparado com plantas da área-referência.

Para MFR, os maiores valores foram para os sítios RF, CA4 (capim-azevém 4 anos) e BCG10 (bracatinga e capim-gordura 10 anos) do campo e o menor para o sítio recém-minerado e não reabilitado (RM), enquanto para a serra, os maiores valores foram obtidos para os sítios M10, BG2 e M18, com os demais apresentando os menores valores. Portanto, as maiores produções de MSPA e MFR de feijoeiro foram obtidas em amostras de solo dos sítios M10 e M18 da serra, com valores superiores aos apresentados pelas plantas cultivadas em amostras das áreas-referência do campo e serra. Este resultado indica que a reabilitação, principalmente com espécies arbóreas nativas (incluindo bracatinga) e adição de serapilheira (M10), promoveu importantes alterações químicas e biológicas nesses solos, melhorando a sua fertilidade. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por Souza (1997) e Gisler (1995), que já tinham observado efeitos benéficos da adição de serapilheira e plantio de bracatinga na fertilidade do solo, processo sucessional e funcionamento dos ecossistemas degradados pela mineração na região de Poços de Caldas (MG).

A correção da fertilidade das amostras de solo dos sítios recém-minerados (RM) do campo e da serra, antes da instalação dos experimentos,

promoveu efeito diferenciado nos valores de MSPA, sendo positivo no sítio RM do campo (aumento de 80% em relação à referência) e negativo no sítio RM da serra (redução de 31% em relação à referência). Esta diferença pode estar relacionada ao maior teor de matéria orgânica nos solos do campo, previamente adicionada em condições *in situ* (Tabela 3), concordando com os resultados obtidos por Biro et al. (1993), os quais obtiveram melhor revegetação e fertilidade de solos minerados após adição de matéria orgânica.

Para o caupi, os menores valores de MSPA foram obtidos em plantas cultivadas em amostras de solo dos sítios BCG19, CA4 e E16, enquanto as maiores produções de MSPA foram obtidas em amostras dos sítios RM e BCG10 do campo, com aumentos de 33 e 18% em relação à referência. Os sítios RM e BCG10 apresentaram os maiores valores de pH e saturação por bases em relação aos demais, os quais podem ter contribuído para o maior crescimento destas plantas (Tabela 3). Na serra, o menor valor foi verificado para os sítios E16 e BCG6, e os maiores para M18, BG2 e M10, com aumentos de 83, 26 e 22% em relação à referência, respectivamente. Estes resultados indicam que os atributos químicos dos solos amostrados variam em função das plantas utilizadas como estratégias de reabilitação, principalmente das leguminosas (Franco et al., 1992; Maschio, Scalzo e Gaiad, 1992; Dias, Franco e Campello, 1994), as quais indiretamente atuam de modo diferenciado no crescimento das plantas em casa-de-vegetação. A MFR foi menor nos sítios RF, BCG19 e E16 do campo, sem diferença entre os demais, enquanto para a serra, os maiores valores foram obtidos nos sítios BG2 e M18 e os menores nos sítios E16, RF e B14. Portanto, plantas de caupi cultivadas em amostras de solo dos sítios M18 e BG2 da serra apresentaram valores de MSPA e MFR superiores àquelas cultivadas em amostras de solo referência (RF), indicando o efeito positivo das estratégias de reabilitação, embora sem efeito de sua cronossequência. Contrariamente, plantas cultivadas em amostras do sítio E16 da serra e BCG19 do campo apresentaram

os menores valores destas duas variáveis, possivelmente devido à menor fertilidade destes solos (Tabela 3). Por esta tabela, verificam-se resultados contraditórios do efeito da bracatinga na fertilidade dos solos, principalmente entre os sítios BCG19 do campo e M18 da serra, indicando que outras variáveis (diversidade vegetal, diferenças na produção e decomposição de serapilheira, atividade microbiana, etc) poderiam estar atuando na redução ou aumento da fertilidade destes solos.

Portanto, as estratégias de reabilitação atuam de maneira diferenciada no crescimento vegetal, destacando-se aquelas que empregam espécies arbóreas e bracatingas na serra (ex. M18) ou gramíneas e bracatingas no campo (ex. BCG10), sem efeito evidente da cronossequência de reabilitação.

3.1.2 Nodulação e atividade da nitrogenase

A tabela 7 mostra os valores encontrados para número, matéria fresca (MF) e atividade da nitrogenase em nódulos de feijoeiro e caupi. Houve efeito das diferentes estratégias de reabilitação nestas variáveis. Os maiores valores de número e MF de nódulos foram encontrados em feijoeiro e caupi cultivados em amostras de solo dos sítios RM e BCG10 do campo, confirmando os resultados obtidos de MSPA e MFR e indicando maiores densidades de rizóbio nestes sítios. Na serra, os maiores valores destas variáveis foram obtidos em plantas de feijoeiro e caupi cultivadas em amostras de solo dos sítios BCG6, BG2 e RM. Nódulos de caupi, tanto em plantas cultivadas em amostras de solo do campo quanto da serra, apresentaram atividade, obtendo-se maiores valores para os sítios RF e BCG10 do campo, e BCG6, BG2 e RM da serra. Obtiveram-se correlações negativas significativas a 5% de probabilidade, variando de 0,79 a 0,86, entre as variáveis de nodulação de feijoeiro e caupi e o teor de matéria orgânica do solo, no campo e serra. Em solos com baixos teores de matéria orgânica (Tabela 3), menor quantidade de N mineralizado e, conseqüentemente,

menor interferência na atividade da nitrogenase, tende a ocorrer, concordando com os resultados obtidos por Salminen (1981).

TABELA 7. Número, matéria fresca (MF) e atividade de nódulos coletados de feijoeiro e caupi, cultivados em amostras de solos dos diferentes sítios de estudo do campo e serra, coletadas no inverno (médias de 3 repetições).

Sítios	Nódulos		MF nódulos		Atividade de nódulos	
	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi
	n ^o planta ⁻¹		mg planta ⁻¹		nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ planta ⁻¹	
Campo						
RM	45,0a	23,2ab	89a	203ab	15a	30ab
E3	0,0b	5,5bc	0b	52bc	0b	26ab
CA4	0,0b	10,9abc	0b	85bc	0b	8ab
BCG10	25,0ab	38,3a	58ab	297a	0b	472a
E16	0,0b	0,9c	0b	0c	0b	0b
BCG19	6,8ab	7,6abc	18ab	44bc	0b	7ab
RF	0,0b	19,0abc	0b	160abc	0b	222ab
Serra						
RM	109,5a	26,2ab	189a	327a	19ab	1278a
BG2	101,4a	34,6a	263a	296a	28a	1346a
BCG6	38,9ab	16,0b	22b	87b	0b	514ab
M10	2,7bc	2,3c	2b	10b	0b	3b
B14	1,1c	0,5c	2b	0b	0b	0b
E16	1,4c	3,1c	2b	0b	0b	0b
M18	0,0c	0,0c	0b	0b	0b	0b
RF	0,0c	0,0c	0b	0b	0b	0b

Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

Não houve correlações entre as variáveis de nodulação e MSPA ou MFR de feijoeiro e caupi, possivelmente devido à baixa eficiência das populações de rizóbio presentes nos sítios de estudo no crescimento dessas plantas e, ou, ao efeito diferenciado da fertilidade das amostras de solo nestas variáveis.

3.1.3 Caracterização cultural de isolados de rizóbio

O número de isolados de caupi e feijoeiro obtidos das amostras de solo dos diferentes sítios de estudo encontra-se na tabela 8. Em feijoeiro, foram encontrados nódulos em 60% das plantas, das quais se obtiveram 129 isolados, enquanto, em caupi, foram encontrados nódulos em 87% das plantas, das quais se obtiveram 200 isolados, num total de 329 isolados caracterizados em placa com meio YMA. Utilizando caupi como planta-isca, foram obtidos isolados de praticamente todos os sítios de estudo em ambas as regiões, excetuando-se em solos sob mata nativa referência (RF) e mata com serapilheira espessa (M18), na serra, onde também não foram obtidos isolados de feijoeiro. O feijoeiro não nodulou quando cultivado em amostras de solos RF, CA4, E16 e E3 do campo, confirmando a menor promiscuidade em relação ao caupi. Maior número de isolados de rizóbio foi obtido nos sítios RM e BCG10 do campo e sítios BG2 e RM da serra, utilizando feijoeiro e caupi como plantas-isca (Tabela 8), sendo proporcional ao número de nódulos encontrados nestes sítios (Tabela 7) e, possivelmente, à densidade destes microrganismos.

TABELA 8. Número total de isolados de rizóbio obtidos de caupi e feijoeiro cultivados em amostras de solo dos diferentes sítios de estudo, coletadas no inverno.

Sítios	Planta-isca		Total de isolados de rizóbio
	Caupi	Feijoeiro	
Campo			
RM*	19	20	39
E3	13	0	13
CA4	20	0	20
BCG10	17	23	40
E16	2	0	2
BCG19	9	14	23
RF	15	0	15
Serra			
RM*	33	25	58
BG2	24	27	51
BCG6	24	11	35
M10	10	5	15
B14	2	2	4
E16	12	2	14
M18	0	0	0
RF	0	0	0

* Sítios que receberam adubação e calagem. Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

Os 329 isolados de feijoeiro e caupi foram agrupados de acordo com suas características culturais em 5 grupos fenotípicos, cuja descrição se encontra na tabela 9.

TABELA 9. Grupos fenotípicos culturais de rizóbio e número de isolados de feijoeiro e caupi por grupo.

Grupos	Características culturais*					Número de isolados			
						Feijoeiro		Caupi	
	1	2	3	4	5	C**	S	C	S
A	2-3	3-4	ácido	alta	amarelada	37	58	13	19
B	2-3	1-2	ácido	seca/baixa	amarelada	13	4	5	7
C	6-10	1-2	alcalino	média	branca	0	3	23	45
D	2-3	2	neutro	média	amarelada	6	7	0	8
E	6-10	<1	alcalino	seca/baixa	branca	1	0	54	26

* 1 (taxa de crescimento, em dias), 2 (diâmetro médio das colônias, em mm), 3 (modificação do pH do meio YMA), 4 (produção de goma) e 5 (coloração das colônias). ** C (campo) e S (serra).

Com estes grupos fenotípicos culturais e com as características das estirpes-tipo pertencentes a espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium* (Tabela 10), construiu-se um dendograma de similaridade para os isolados de feijoeiro e caupi, que pode ser visto na figura 18.

TABELA 10. Características culturais das estirpes-tipo utilizadas para comparação com os isolados de feijoeiro e caupi.

Estirpes tipo representativas	Características culturais*				
	1	2	3	4	5
Rhizobium					
<i>R. l. bv. phaseoli</i> (LMG 4285 ^T)	2	>2	ácido	alta	amarelada
<i>R. l. bv. trifolii</i> (LMG 6119 ^T)	2	>2	ácido	alta	amarelada
<i>R. etli</i> (CFN 42 ^T)	3	>2	ácido	alta	amarelada
<i>R. tropici</i> (LMG 9503 ^T)	3	>2	ácido	alta	amarelada
<i>R. galegae</i> (LMG 6214 ^T)	2	1-2	ácido	média	amarelada
Sinorhizobium					
<i>S. meliloti</i> (LMG 6133 ^T)	2	1-2	ácido	seca	branca
<i>S. fredii</i> cv. <i>fredii</i> (LMG 6217 ^T)	3	1-2	ácido	baixa	amarelada
<i>S. medicae</i> (USDA 1037 ^T)	2	>2	ácido	média	branca
<i>S. saheli</i> (USDA 4893 ^T)	3	1-2	ácido	baixa	amarelada
<i>S. teranga</i> (USDA 4894 ^T)	2	>2	ácido	média	branca
Mesorhizobium					
<i>M. loti</i> (LMG 6215 ^T)	4	1-2	neutro	baixa	amarelada
<i>M. plurifarium</i> (INPA 12A ^T)	4	1-2	ácido	alta	amarelada
<i>M. ciceri</i> (USDA 3383 ^T)	4	1-2	ácido	alta	amarelada
<i>M. huakuii</i> (USDA 4779 ^T)	4	>2	neutro	alta	amarelada
<i>M. tianshinense</i> (USDA 3592 ^T)	5	<1	neutro	baixa	amarelada
<i>M. mediterraneum</i> (USDA 3392 ^T)	5	1-2	ácido	baixa	amarelada
Bradyrhizobium					
<i>B. japonicum</i> (LMG 6138 ^T)	6	1-2	alcalino	baixa	branca
<i>B. elkanii</i> (LMG 6134 ^T)	6	1-2	alcalino	média	branca
Azorhizobium					
<i>A. caulinodans</i> (LMG 6465 ^T)	3	<1	alcalino	seca	branca
Allorhizobium					
<i>A. undicola</i> (ORS 992 ^T)	1	1-2	ácido	média	branca

* 1 (taxa de crescimento, em dias), 2 (diâmetro médio das colônias, em mm), 3 (modificação do pH do meio YMA), 4 (produção de goma) e 5 (coloração das colônias).

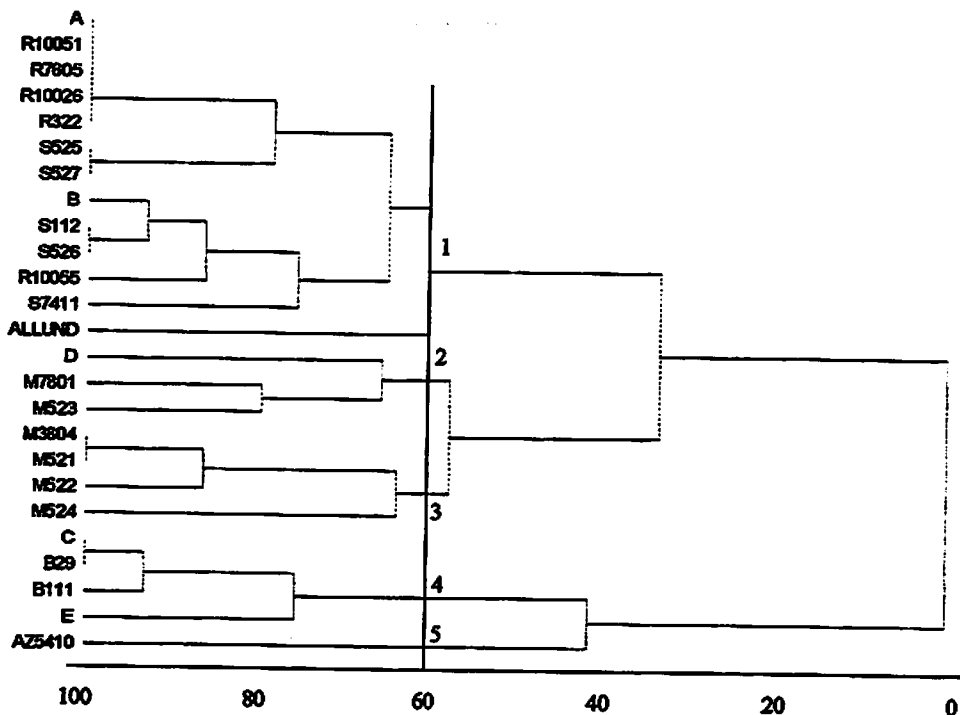


FIGURA 18. Dendrograma de similaridade construído de acordo com os grupos fenotípicos culturais dos isolados de rizóbio de feijoeiro e caupi (A, B, C, D e E) cultivados em amostras de solos de áreas de mineração, e as estirpes tipo: R10051 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*), R7605 (*R. l. trifolii*), R10026 (*R. etli*), R322 (*R. tropici*), R10055 (*R. galegae* bv. *orientalis*), S7411 (*Sinorhizobium meliloti*), S112 (*S. fredii* cv. *fredii*), S525 (*S. medicae*), S526 (*S. sahelii*), S527 (*S. teranga*), M7801 (*Mesorhizobium loti*), M3804 (*M. plurifarum*), M521 (*M. ciceri*), M524 (*M. huakuii*), M523 (*M. tianshinense*), M522 (*M. mediterraneum*), B111 (*Bradyrhizobium japonicum*), B29 (*B. elkanii*), AZ5410 (*Azorhizobium caulinodans*), ALLUND (*Allorhizobium undicola*). Descrição dos grupos fenotípicos culturais dos isolados na tabela 9.

A 60% de similaridade, cinco grandes grupos foram formados com os 200 isolados de caupi, sendo o grupo 1 com 44 isolados (22%) pertencentes aos

grupos culturais A e B e com as estirpes tipo de espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*, grupo 2 com 8 isolados (4%) pertencentes ao grupo cultural D e as estirpes tipo de *M. loti* e *M. tianshinense*, grupo 4 com 148 isolados (74%) pertencentes aos grupos culturais C e E e com as estirpes tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium*. As estirpes tipo *M. plurifarium*, *M. ciceri*, *M. mediterraneum* e *M. huakuii* formaram o grupo 3 e a estirpe tipo *Azorhizobium caulinodans* formou o grupo 5. Portanto, o caupi capturou predominantemente rizóbios com características culturais semelhantes às de estirpes-tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium*.

Os 129 isolados de feijoeiro apresentaram o seguinte agrupamento: 112 isolados (87%) pertencentes aos grupos morfológicos A e B e estirpes tipo de espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*, 13 isolados (10%) pertencentes ao grupo D e estirpes tipo de *M. loti* e *M. tianshinense*, 4 isolados (3%) pertencentes aos grupos culturais C e E e estirpes tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium* (Figura 18). Diferentemente do caupi, o feijoeiro capturou predominantemente rizóbios com características culturais semelhantes às de estirpes-tipo de espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*.

3.1.4 Índice de diversidade de rizóbio

A tabela 11 mostra os valores obtidos nos diferentes sítios, utilizando feijoeiro ou caupi como plantas-isca. Houve efeito das diferentes estratégias de reabilitação no índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'), calculado através dos grupos fenotípicos culturais dos isolados de rizóbio (Tabela 9).

TABELA 11. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') para isolados de rizóbio obtidos de caupi e feijoeiro cultivados em amostras de solo dos diferentes sítios de estudo, coletadas no inverno.

Sítios	H'	
	Caupi	Feijoeiro
Campo		
RM	1,11	0,61
E3	0,69	a.i.
CA4	1,31	a.i.
BCG10	0,89	0,46
E16	0,69	a.i.
BCG19	0	a.i.
RF	0	a.i.
Serra		
RM	0,70	0,53
BG2	0,65	0,35
BCG6	0,70	0,30
M10	0,50	0,67
B14	0	0
E16	0,62	0
M18	a.i.	a.i.
RF	a.i.	a.i.

a.i. = ausência de isolado. O valor 0 significa isolados com as mesmas características culturais em meio YMA. Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Com exceção do sítio M10 da serra, o caupi promoveu o isolamento de maior diversidade de rizóbios do que o feijoeiro, nos diferentes sítios de estudo, demonstrando ser uma espécie mais promíscua que o feijoeiro e com maior potencial de utilização em estudos de diversidade de rizóbio em solos

minerados. Resultados semelhantes foram obtidos por Lewin et al. (1987), Martins, Neves e Rumjanek (1997) em ecossistemas do nordeste e Pereira (2000) em ecossistema do norte do Brasil, utilizando caupi como planta-isca. Os maiores valores do índice de diversidade de Shannon-Weaver para isolados de caupi foram obtidos nos sítios RM e CA4 do campo e nos sítios E16, BCG6, BG2 e RM da serra. Este resultado indica o efeito diferenciado das estratégias de reabilitação na diversidade fenotípica de rizóbio, com a maioria apresentando maior diversidade que aquela obtida nas áreas-referência, embora sem relação com a cronossequência. Utilizando caupi, não foi observada diversidade de rizóbio nos sítios RF e BCG19 do campo e B14 da serra, já que os isolados apresentaram as mesmas características culturais.

Pelos resultados obtidos das amostras de solo dos sítios recém-minerados e não reabilitados (RM) do campo e serra, verificou-se que a correção da fertilidade, antes da semeadura das espécies de plantas-isca, possibilitou o isolamento de maior número e diversidade de rizóbio. Assim, evidenciou-se a importância desta prática à sobrevivência, multiplicação e diversidade de rizóbio em solos minerados, os quais, segundo Biro et al. (1993), apresentam baixa população e diversidade destes microrganismos. O efeito positivo da correção da fertilidade do solo na densidade, diversidade e atividade de rizóbios concorda com os resultados obtidos por vários outros pesquisadores (Franco e Faria, 1997; Andrade, Murphy e Giller, 2000; Hungria e Vargas, 2000).

Assim como observado para MSPA e MFR das espécies de plantas-isca, houve efeito diferenciado das estratégias de reabilitação na nodulação, com destaque para aquelas que utilizaram calagem e adubação recente (RM e BG2 da serra e RM do campo), ou que contribuem para melhor fertilidade dos solos, como as bracatingas (BCG10 do campo e BCG6 da serra). Os resultados positivos na população de rizóbio, utilizando bracatinga como estratégia de reabilitação, concordam com aqueles obtidos por Maschio, Scalzo e Gaiad

(1992), os quais verificaram alta eficiência na recuperação de solos de mineração de xisto, e com Franco et al. (1992), que verificaram formação de simbiose eficiente com rizóbios de solos degradados.

3.2 Experimentos com amostras de solo coletadas no verão (março de 1999)

3.2.1 Crescimento vegetal

A tabela 12 mostra o efeito das diferentes estratégias de reabilitação na produção de MSPA, índice relativo de produção de MSPA e MFR de feijoeiro e caupi.

Excetuando o sítio RM-GG da serra, não houve efeito das estratégias de reabilitação na matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria fresca de raízes (MFR) do feijoeiro, apesar do aumento de 10 e 14% na produção de MSPA em relação à referência, para os sítios E16 e E3 (com eucalipto de 16 e 3 anos). As diferenças de resultados dos experimentos da primeira e segunda coleta podem ter sido ocasionadas pela correção da fertilidade do solo, época de amostragem e, ou, pelo próprio efeito da reabilitação, já que diferentes espécies vegetais utilizadas como estratégias de reabilitação atuam diferentemente na melhoria da fertilidade do solo (Franco et al., 1992; Maschio, Scalzo e Gaiad, 1992; Dias, Franco e Campello, 1994). A menor produção de MSPA de feijoeiro na serra ocorreu no sítio recém-minerado e reabilitado com capim-gordura e guandu 6 meses (RM-GG) (menor teor de matéria orgânica, conforme tabela 4), os demais não diferindo entre si. Para MFR, os maiores valores foram obtidos quando cultivado em amostras de solos dos sítios RF e E3 do campo.

TABELA 12. Matéria seca da parte aérea (MSPA), índice relativo de produção de MSPA (IR-MSPA) e matéria fresca de raízes (MFR) de feijoeiro e caupi, cultivados em amostras de solo dos diferentes sítios de estudo, coletadas no verão.

Sítios	MSPA		IR-MSPA		MFR	
	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi
	g planta ⁻¹				g planta ⁻¹	
Campo						
RM-BG	1,16a	2,03c	79	63	8,14bc	6,47bc
E3	1,67a	2,29bc	114	71	11,71ab	11,87a
CA4	1,00a	1,90c	68	59	6,72c	5,89c
BCG10	0,99a	2,63abc	67	81	4,24c	6,10c
E16	1,62a	1,95c	110	60	7,85bc	6,18c
BCG19	1,38a	3,01ab	94	93	6,05c	8,60b
RF	1,47a	3,23a	100	100	15,45a	11,15a
Serra						
RM-GG	0,95b	2,2c	44	71	8,25a	4,41d
BG2	1,93a	2,54bc	89	82	6,17a	8,55c
BCG6	2,31a	2,34c	106	76	4,83a	7,85c
M10	2,01a	2,42c	92	79	5,35a	12,59b
B14	1,90a	3,46a	87	112	10,32a	9,30c
E16	1,87a	3,4ab	86	110	11,08a	6,87cd
M18	2,35a	3,5a	108	114	11,83a	14,69ab
RF	2,18a	3,08abc	100	100	11,45a	16,13a

IR-MSPA: produção de MSPA em relação à produção na área-referência (considerada 100). Campo: RM-BG reabilitado com braquiária e guandu 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG reabilitado com capim-gordura e guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

As variáveis de crescimento de caupi permitiram melhor discriminação dos sítios de estudo que as do feijoeiro. As maiores produções de MSPA de

caupi no campo ocorreram nos sítios RF, BCG19 e BCG10, sendo o primeiro também com a maior MFR, indicando o efeito positivo das estratégias de reabilitação utilizando bracatinga e gramíneas, e da cronossequência nestas variáveis (Tabela 12). As menores produções de MSPA desta espécie ocorreram nos solos dos sítios RM-BG, CA4, E16 e E3, os quais compõem os sítios recém-minerados, gramíneas recém-plantadas e eucaliptos com 16 e 3 anos de idade, respectivamente, indicando o efeito negativo da mineração e das estratégias de reabilitação com eucalipto nestas variáveis. Por outro lado, na serra, os sítios E16, RF, B14 e M18 foram os que promoveram maior produção de MSPA de caupi, com aumento de até 14% na produção de MSPA em relação à referência, sendo que somente o último apresentou maior desenvolvimento também da parte radicular.

Os sítios RM-BG e RM-GG do campo e serra, respectivamente, em relação às áreas-referência (RF) e outras, apresentaram os menores valores de MSPA e MFR (Tabela 12), indicando perda ou redução de funcionalidade desses solos, possivelmente devido aos baixos teores de matéria orgânica e ausência de uma comunidade microbiana funcional.

No entanto, estratégias de reabilitação, utilizando principalmente bracatinga e gramíneas, contribuem para melhoria das condições do solo, permitindo maior crescimento de espécies vegetais. As variáveis de crescimento de caupi permitiram discriminar o efeito das diferentes estratégias e ainda o efeito positivo da cronossequência de reabilitação nos solos estudados.

3.2.2 Nodulação e atividade da nitrogenase

A tabela 13 mostra o efeito das estratégias de reabilitação no número, matéria fresca e atividade de nódulos de feijoeiro e caupi. Com exceção do número de nódulos de caupi cultivado em amostras de solo do campo, houve efeito das estratégias nas demais variáveis de nodulação.

TABELA 13. Número, matéria fresca (MF) e atividade de nódulos coletados de feijoeiro e caupi, cultivados em amostras de solos dos diferentes sítios de estudo, coletadas no verão (médias de 3 repetições).

Sítios	Nódulos		MF nódulos		Atividade de nódulos	
	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi	Feijoeiro	Caupi
	n° planta ⁻¹		mg planta ⁻¹		nmol C ₂ H ₄ h ⁻¹ planta ⁻¹	
Campo						
RM-BG	16,27ab	39,64a	227abc	758abc	413b	386bcd
E3	39,30a	61,64a	281ab	712bc	2400a	719b
CA4	4,70bc	37,61a	79bc	762abc	685b	468bcd
BCG10	28,32a	61,72a	325ab	902a	420b	567bc
E16	0,00c	34,04a	0c	687c	0b	249cd
BCG19	41,84a	55,09a	311ab	828abc	521b	164d
RF	47,87a	61,44a	427a	884ab	812b	1304a
Serra						
RM-GG	7,51d	31,77b	189c	650ab	0c	929ab
BG2	55,09bc	53,47ab	606a	189ab	324ab	613ab
BCG6	124,84a	56,65ab	682a	1086a	450a	659ab
M10	70,24bc	47,66ab	411b	802ab	466a	447ab
B14	36,70c	38,76ab	49d	508b	0c	924ab
E16	86,38ab	53,48ab	717a	468b	68bc	249b
M18	122,99a	46,67ab	598a	653ab	0c	566ab
RF	0,00d	70,55a	0d	633b	0c	1371a

Campo: RM-BG reabilitado com braquiária e guandu 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG reabilitado com capim-gordura e guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

Verificaram-se maiores valores de número e matéria fresca de nódulos nas duas espécies de plantas iscas cultivadas em amostras de solo dos sítios RF, BCG19 e BCG10 do campo, áreas essas principalmente cobertas com bracatingas e gramíneas e, possivelmente, com maiores densidades de rizóbio.

Amostras de solo do sítio E16 do campo não possibilitaram nodulação de feijoeiro e promoveram também os menores valores de matéria fresca e atividade da nitrogenase em nódulos de caupi. Este resultado evidencia o impacto negativo da cultura de eucalipto, quando em plantio adensado e homogêneo, na densidade de rizóbio e no processo de nodulação. Não se verificou o mesmo efeito do sítio E16 da serra, também com eucalipto, possivelmente devido à presença de um sub-bosque bem desenvolvido, com maior diversidade vegetal e menor quantidade de serapilheira em comparação com o sítio do campo. Sugere-se que quanto maior a quantidade de serapilheira no solo, maior seja a quantidade de N orgânico mineralizado, o qual afeta negativamente a nodulação (Carroll e Gresshoff, 1983). No entanto, não se obtiveram correlações significativas entre teor de matéria orgânica do solo e as variáveis de nodulação de feijoeiro e caupi, no campo e serra.

Para a serra, amostras de solo dos sítios BCG6 e M18 (bracatingas e outras espécies nativas) promoveram os maiores valores de número e matéria fresca de nódulos das plantas iscas testadas, enquanto os menores valores destas variáveis foram obtidos nos sítios B14 e RM-GG. O resultado contraditório apresentado pelo sítio B14 (bracatinga de 14 anos), com relação à nodulação, também foi obtido para MSPA e MFR de caupi no sítio BCG19 do campo (Tabela 12), indicando que outras variáveis (diversidade vegetal, ciclos vegetativos, diferenças na produção e decomposição de serapilheira, atividade microbiana, etc) poderiam estar atuando na microbiota e processos microbiológicos desses solos.

A correção da fertilidade das amostras de solo dos sítios de estudo, antes da instalação destes experimentos, possibilitou um aumento médio de 2,1 vezes no número de nódulos de feijoeiro e 3,9 vezes no número de nódulos de caupi (Tabelas 7 e 13). Esta correção promoveu nodulação de plantas em amostras de solos de sítios que anteriormente não possibilitaram este processo (sítios RF,

CA4, E16 e E3 do campo e RF e M18 da serra), indicando que havia fatores limitantes ao estabelecimento da simbiose. Com a correção da fertilidade, Andrade, Murphy e Giller (2000), Denton et al. (2000), Hungria e Vargas (2000), entre outros, obtiveram maior sobrevivência e número de isolados de rizóbios (e, conseqüentemente, maior nodulação), comprovando os resultados obtidos no presente trabalho. Apesar disso, ainda não se obtiveram nódulos de feijoeiro cultivado em amostras de solo dos sítios E16 do campo e RF da serra, os quais continham grande quantidade de serapilheira e matéria orgânica.

Assim, os resultados obtidos confirmam a necessidade das práticas de calagem e fertilização dos solos minerados para a recuperação das populações de rizóbio e, por conseguinte, sustentabilidade do ecossistema impactado (Franco et al., 1992; Andrade, Murphy e Giller, 2000; Denton et al., 2000; Hungria e Vargas, 2000).

Não houve correlações significativas entre as variáveis de nodulação (número, matéria fresca e atividade de nódulos) para nenhuma espécie de planta-isca utilizada, mostrando que em alguns sítios, apesar de possibilitarem nodulação, os nódulos eram inefetivos. São exemplos os sítios E16, B14, M18 e RM-GG da serra, com o feijoeiro apresentando nódulos inefetivos, e o sítio BCG19 do campo, com grande número de nódulos de caupi de baixa atividade da nitrogenase. Portanto, a avaliação isolada de número e peso de nódulos pode sub ou superestimar a real capacidade de fixação de nitrogênio pelas populações de rizóbio.

Encontraram-se correlações significativas somente para caupi entre MSPA e número ($r=0,78^*$) e peso de nódulos ($r=0,78^*$) de plantas cultivadas em amostras de solo dos sítios do campo, e entre MSPA e peso de nódulos ($r=0,71^*$) de plantas cultivadas em amostras de solo da serra, mostrando eficiência das populações de rizóbios somente para esta espécie.

Portanto, assim como verificado para as amostras de solo coletas no inverno, as estratégias de reabilitação atuaram de forma diferenciada na nodulação, destacando-se o efeito positivo de solos com bractingas (BCG10 e BCG19 do campo e BCG6 e M18 da serra) e negativo naqueles com eucalipto em plantio homogêneo (E16 do campo), sem efeito evidente da cronossequência de reabilitação.

3.2.3 Caracterização cultural de isolados de rizóbio

A tabela 14 mostra o número de isolados de rizóbio obtidos de caupi e feijoeiro cultivados em amostras de solo dos diferentes sítios de estudo. Não foram obtidos nódulos de feijoeiro e, portanto, isolados, quando cultivado em amostras de solo dos sítios E16 do campo e RF da serra, demonstrando a menor promiscuidade em formar simbiose, quando comparado ao caupi. Em feijoeiro, foram encontrados nódulos em 87% das plantas, obtendo-se 328 isolados, enquanto, em caupi, foram encontrados nódulos em 100% das plantas, obtendo-se 420 isolados, num total de 748 isolados.

Deve-se salientar que através da correção da fertilidade dos solos recém-minerados (sítios RM-BG e RM-GG do campo e serra, respectivamente), obteve-se nodulação das espécies de plantas iscas utilizadas e, assim, isolados de rizóbio, indicando que, apesar do impacto negativo da mineração nesta comunidade, células de rizóbio puderam se manter viáveis e com capacidade de desenvolver simbiose com plantas, em condições favoráveis. Segundo Hirsch (1996), células de rizóbio apresentam grânulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), os quais podem ser catabolizados (Wong e Evans, 1971) e utilizados como fonte de carbono e energia e contribuindo para a sobrevivência e atividade desses microrganismos por longos períodos, independentemente da planta hospedeira.

TABELA 14. Número de isolados de rizóbio obtidos de caupi e feijoeiro, cultivados em amostras de solo dos diferentes sítios de estudo, coletadas no verão.

Sítios	Planta-isca		Total de isolados de rizóbio
	Caupi	Feijoeiro	
Campo			
RM-BG	28	21	49
E3	28	14	42
CA4	32	19	51
BCG10	29	29	58
E16	25	0	25
BCG19	31	26	57
RF	27	24	51
Serra			
RM-GG	26	18	44
BG2	30	30	60
BCG6	25	20	45
M10	28	26	54
B14	28	30	58
E16	30	49	79
M18	29	22	51
RF	24	0	24

Campo: RM-BG reabilitado com braquiária e guandu 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG reabilitado com capim-gordura e guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Os 328 isolados de feijoeiro foram agrupados em 12 grupos fenotípicos culturais, cujas características se encontram na tabela 15.

TABELA 15. Grupos fenotípicos culturais de rizóbio e número de isolados de rizóbio de feijoeiro, classificados por grupo, no campo e serra.

Grupos	Características culturais*					Total de isolados	
	1	2	3	4	5	C**	S
A	2-3	1-4	ácido	baixa/alta	amarelada	111	127
B	3	<1-3	ácido	seca	branca	4	7
C	6	2	alcalino	seca	branca	2	5
D	3	<1-3	neutro	seca	branca	2	30
E	3	2-4	ácido	baixa/alta	branca	11	0
F	2	2	neutro/ácido	baixa/média	branca	2	0
G	2-3	2-3	neutro	baixa/média	branca	1	4
H	3-4	1-2	ácido	seca	amarelada	0	14
I	3	4	neutro/ácido	média	amarelada	0	1
J	3	3-4	neutro	alta	amarelada	0	3
L	6	<1	neutro/alcalino	seca	amarelada	0	2
M	6	1	neutro/alcalino	seca	branca	0	2

* 1 (taxa de crescimento, em dias), 2 (diâmetro médio das colônias, em mm), 3 (modificação do pH do meio YMA), 4 (produção de goma) e 5 (coloração das colônias). ** C (campo) e S (serra).

Com as características culturais dos isolados de rizóbio e das estirpes-tipo das espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium* (Tabela 10), construiu-se um dendograma de similaridade, que pode ser visto na figura 19. A 60% de similaridade, 6 grandes grupos foram formados, sendo o grupo 1 com 258 isolados (79%) pertencentes aos grupos morfológicos A, E, G, I e J e a maioria das estirpes-tipo de espécies do gênero *Rhizobium*, *S. medicae* e *S. teranga*, grupo 2 com 13 isolados (4%) dos grupos morfológicos B e F e a maioria das estirpes-tipo de espécies do gênero *Sinorhizobium* e *Allorhizobium undicola*, grupo 3 com 14 isolados (4%) pertencentes ao grupo morfológico H e a maioria das estirpes-tipo de espécies do gênero *Mesorhizobium*, grupo 5 com 11 isolados (3%) dos grupos morfológicos C, L e M e estirpes-tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium* e grupo 6 com 32 isolados (10%) do grupo

morfológico D e estirpe-tipo *Azorhizobium caulinodans*. O grupo 4 conteve apenas a estirpe-tipo *M. huakuii*. Assim como para a coleta de solo no inverno, a grande maioria dos isolados de feijoeiro apresentou maior similaridade às estirpes-tipo pertencentes a espécies dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*.

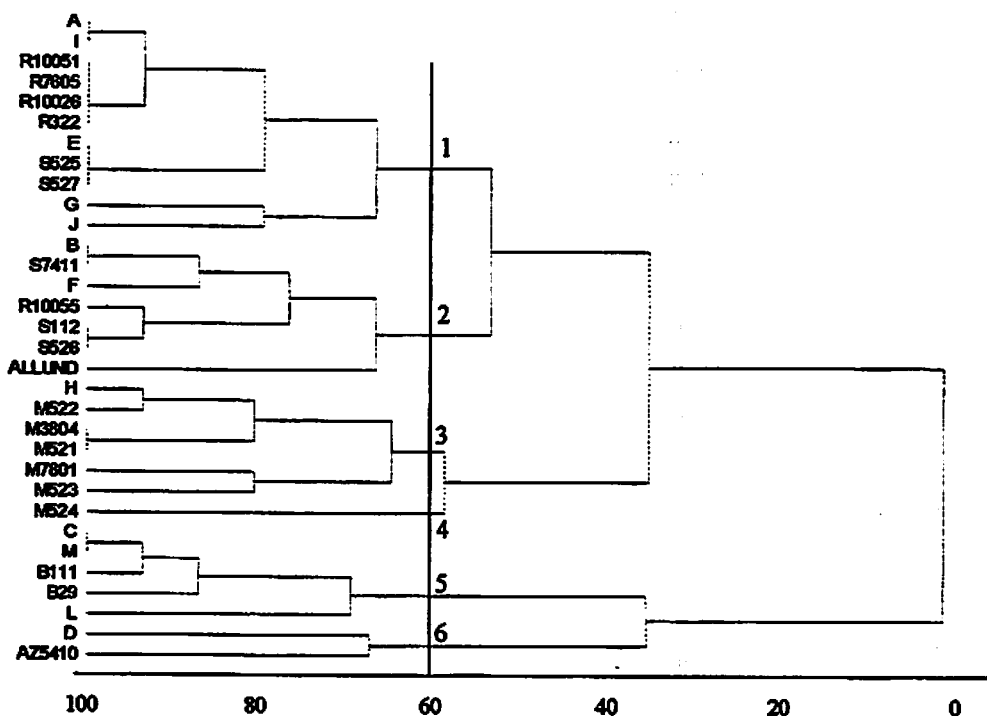


FIGURA 19. Dendrograma de similaridade construído de acordo com os grupos fenotípicos culturais (A, B, C, ... M) de isolados de rizóbio de feijoeiro cultivado em amostras de solos de áreas de mineração, e as estirpes-tipo: R10051 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*), R7605 (*R. l. trifolii*), R10026 (*R. etli*), R322 (*R. tropici*), R10055 (*R. galegae* bv. *orientalis*), S7411 (*Sinorhizobium meliloti*), S112 (*S. fredii* cv. *fredii*), S525 (*S. medicae*), S526 (*S. sahelii*), S527 (*S. terangaee*), M7801 (*Mesorhizobium loti*), M3804 (*M. plurifarium*), M521 (*M. ciceri*), M524 (*M. huakuii*), M523 (*M. tianshinense*), M522 (*M. mediterraneum*), B111 (*Bradyrhizobium japonicum*), B29 (*B. elkanii*), AZ5410 (*Azorhizobium caulinodans*), ALLUND (*Allorhizobium undicola*). Descrição dos grupos fenotípicos culturais na tabela 15.

Os 420 isolados de caupi foram agrupados em 24 grupos fenotípicos culturais, cujas características se encontram na tabela 16.

TABELA 16. Grupos fenotípicos culturais de rizóbio e número de isolados de rizóbio de caupi, classificados por grupo, no campo e serra.

Grupos	Características culturais*		Total de isolados
	1	2	3

A	6-10	<1-2	alcalino	8	9	branca	seca
B	6-10	<1-3	alcalino	8	9	branca	seca
C	6-10	<1-4	neutro	109	118	branca	baixa-alta
D	6-10	>4	alcalino	23	10	branca	baixa-alta
E	2-3	1-3	ácido	2	7	branca	média-alta
F	2-3	>4	ácido	18	6	amarelada	média-alta
G	2-3	1-3	neutro-ácido	5	15	amarelada	alta
H	4-6	<1-2	alcalino	2	8	amarelada	média-alta
I	4-6	4	neutro-álcalino	2	2	branca	seca
J	4-6	>4	ácido	0	4	amarelada	alta
L	6-10	1	ácido	0	1	amarelada	alta
M	4-6	3-4	neutro	0	4	branca	média-alta
N	6-10	1-3	neutro	1	1	amarelada	média-alta
O	6-10	<1	neutro-ácido	3	4	amarelada	média-alta
P	6-10	<1-3	neutro-álcalino	11	2	amarelada	seca
Q	6-10	1->4	alcalino	13	2	branca	média-alta
R	6-10	1	neutro-álcalino	0	7	amarelada	baixa-média
S	6-10	2	neutro-ácido	0	0	branca	média
T	4-6	4	neutro-ácido	8	0	branca	alta
U	4-6	2	alcalino	5	0	amarelada	baixa-média
V	4-6	4	neutro-álcalino	2	0	branca	média
X	4-6	1	ácido	2	0	amarelada	seca
Z	4-6	2	ácido	2	0	branca	média
ZI	4-6	1-2	alcalino	1	0	branca	seca

* 1 (taxa de crescimento, em dias), 2 (diâmetro médio das colônias, em mm), 3 (modificação do pH do meio YMA), 4 (produção de goma) e 5 (coloração das colônias). ** C (campo) e S (serra).

Com as características culturais dos isolados de rizóbio e das estirpes- tipo de espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*,

A 60% de similaridade, formaram-se 8 grandes grupos, sendo o grupo 1 com 293 isolados (70%) pertencentes aos grupos morfológicos A, B, D, H, P, Q, R, V e Z1 e estirpes-tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium*, o grupo 2 com 11 isolados (3%) pertencentes aos grupos morfológicos I, U e M e estirpe tipo de *M. huakuii*, o grupo 3 com a estirpe-tipo de *A. caulinodans*, o grupo 4 formando um grupo à parte com 46 isolados (11%) dos grupos morfológicos C, L, N e S, o grupo 5 com 3 isolados (<1%) exclusivamente do grupo morfológico O, o grupo 6 com 4 isolados (1%) dos grupos morfológicos X e Z e estirpes tipo na maioria de espécies do gênero *Mesorhizobium*, o grupo 7 com 34 isolados (8%) pertencentes aos grupos morfológicos E e G e estirpes-tipo da maioria de espécies do gênero *Sinorhizobium* e *Allorhizobium undicola*, e o grupo 8 com 29 isolados (7%) pertencentes aos grupos morfológicos F, J e T e estirpes-tipo na maioria de espécies do gênero *Rhizobium*.

Assim como obtido com as amostras de solo do inverno, a grande maioria dos isolados de caupi apresentou maior similaridade às estirpes tipo de espécies do gênero *Bradyrhizobium*, embora os isolados estivessem mais uniformemente distribuídos nos demais gêneros, quando comparadas ao feijoeiro. Este resultado confirma a menor especificidade do caupi e concorda com aqueles encontrados por Lewin et al. (1987), Martins, Neves e Rumjaneck (1997) e Pereira (2000), os últimos avaliando a diversidade fenotípica de rizóbio em outros ecossistemas, utilizando o caupi como planta-isca.

3.2.4 Índice de diversidade de rizóbio

O índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'), construído de acordo com os grupos fenotípicos culturais dos isolados de feijoeiro e caupi (Tabelas 15 e 16), nos diferentes sítios, são mostrados na tabela 17. Houve efeito das estratégias de reabilitação na diversidade fenotípica de rizóbio, com comportamentos diferenciados entre as espécies de plantas-isca utilizadas.

TABELA 17. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') para isolados de rizóbio obtidos de caupi e feijoeiro cultivados em amostras de solo dos diferentes sítios de estudo, coletadas no verão.

Sítios	H'	
	Caupi	Feijoeiro
Campo		
RM-BG	0,88	0
E3	0,80	0,41
CA4	1,28	1,46
BCG10	1,90	0
E16	1,07	a.i.
BCG19	1,45	0,94
RF	0,90	0
Serra		
RM-GG	0,32	1,65
BG2	1,90	0
BCG6	1,43	0,20
M10	1,50	0
B14	1,72	1,31
E16	1,33	1,42
M18	1,49	0
RF	1,18	a.i.

a.i. = ausência de isolado. O valor 0 significa isolados com as mesmas características culturais em meio YMA. Campo: RM-BG reabilitado com braquiária e guandu 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG reabilitado com capim-gordura e guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

O caupi foi mais discriminatório das estratégias de reabilitação que o feijoeiro. Verificou-se ausência de diversidade de rizóbio de feijoeiro nos sítios RM-BG, RF e BCG10 do campo e M10, BG2 e M18 da serra, mostrando menor promiscuidade em formar simbiose com rizóbios nativos destes solos em relação

ao caupi. A diferença de comportamento da espécie vegetal utilizada como planta-isca de rizóbio foi demonstrada por Handley, Hedges e Beringer (1997) e Pereira (2000). Os primeiros sugerem a utilização de grande número de plantas iscas e poucos nódulos por planta em estudos de diversidade destes microrganismos.

Com exceção dos sítios CA4 do campo, e E16 e RM-GG da serra, o caupi proporcionou a obtenção de maior diversidade de isolados de rizóbio do que o feijoeiro nos demais sítios (Tabela 17), assim como nos experimentos das amostras de solo coletadas no inverno. Para o caupi, os maiores valores do índice de diversidade de Shannon-Weaver foram obtidos nos sítios BCG19, CA4 e BCG10 do campo, e nos sítios B14 e BG2 da serra. Apesar do baixo índice na área-referência do campo, os menores valores foram para os sítios recém-minerados do campo (RM-BG) e serra (RM-GG), mostrando o efeito negativo da mineração na diversidade de rizóbios.

Portanto, a utilização de bracatingas como estratégia de reabilitação contribui positivamente na nodulação e, por conseguinte, na densidade de rizóbio no solo, com surgimento de populações de diversidade fenotípica cultural e eficiência simbiótica (principalmente em caupi) superiores àquelas de áreas-referência.

4 CONCLUSÕES

A mineração reduz a densidade e diversidade fenotípica cultural de populações de rizóbio, enquanto estratégias de reabilitação com bracatingas, sem efeito evidente de sua cronossequência, proporcionam aumentos nestas variáveis, em intensidade semelhante ou superior às áreas-referência não mineradas.

Estratégias de reabilitação envolvendo plantio homogêneo e adensado de eucalipto contribuem negativamente para as populações de rizóbio, reduzindo a sua densidade, diversidade fenotípica cultural, nodulação e eficiência simbiótica, avaliadas através do caupi.

O caupi é mais indicado que o feijoeiro para detectar densidade e diversidade fenotípica de populações de rizóbio nos sítios de estudo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-94.
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. Diversity and abundance of populations of bean-nodulating rhizobia as a function of liming and cropping history in acidic Brazilian soils. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds). Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000. p.546.
- BIRO, B.; VOROS, I.; KOVESPECHY, K.; SZEGI, J. Symbiont effect of rhizobium-bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on *Pisum sativum* in recultivated mine spoils. *Geomicrobiology Journal*, Hants, v.11, n.3/4, p.275-284, July/Dec. 1993.
- BODDEY, R.M.; SÁ, J.C.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.787-799, May/June 1997.
- BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral. Projeto Sapucaí: Estado de Minas Gerais e São Paulo. Brasília, 1979. 299p. (Relatório Geologia, 4).
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J.; THIES, J.E. Manipulation of rhizobia microflora for imposing legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant and Soil*, The Hague, v.174, n.1/2, p.143-180, July 1995.

- CARROLL, B.J.; GRESSHOFF, P.M. Nitrate inhibition of nodulation and nitrogen fixation in white clover *Trifolium repens*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, v.110, p.77-88, 1983.
- DENTON, M.D.; CONVENTRY, D.R.; BELLOTTI, W.D.; HOWIESON, J.G. Distribution, abundance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* from alkaline pasture soils in South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Victoria, v.40, n.1, p.25-35, Jan. 2000.
- DIAS, L.E.; FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C. Dinâmica de matéria orgânica e de nutrientes em solo degradado pela extração de bauxita e cultivado com *Eucalyptus pellita* e *Acacia mangium*. SIMPÓSIO SUL AMERICANO, 1.; SIMPÓSIO NACIONAL: recuperação de áreas degradadas, 2., 1994, Foz do Iguaçu. Anais... Curitiba: FUPEF, 1994. p.515-525.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing from *Clostridium pasteurium*. *Biochemistry Biophica Acta*, Amsterdam, v.127, p.285-294, 1966.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solos. 2.ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212p.
- EVERITT, B.S. Cluster analysis. New York: J. Wiley, 1993. 170p.
- FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F.C. Fixação biológica de nitrogênio: alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: UFLA/DCS, 1999. p.577-596.
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.; SILVA, E.M.R.; FARIA, S.M. Revegetação de solos degradados. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1992. 11p. (Comunicado Técnico, 9).
- FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. de. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.897-903, May/June 1997.
- GISLER, C.V.T. O uso da serapilheira na recomposição vegetal em áreas mineradas de bauxita, Poços de Caldas, MG. São Paulo:USP, 1995. 147p. (Tese - Mestrado em Ecologia).
- HANDLEY, B.A.; HEDGES, A.J.; BERINGER, J.E. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar

- viciae* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.30, n.2, p.241-249, Feb. 1997.
- HIRSCH, P.R. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *The New Phytologist*, Oxford, v.133, n.1, p.159-171, May 1996.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, v.65, p.151-164, 2000.
- LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, Z.A.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v.8, p.447-459, 1987.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east Region of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.1005-1010, May/June 1997.
- MASCHIO, L.M.A.; SCALZO, M.S.; GAIAD, S. Bracatinga (*Mimosa scabrella*), eucalipto (*Eucalyptus viminalis*) e pinus (*Pinus taeda*) na recuperação da biodiversidade a nível microbiológico, de solos degradados. In: CONGRESSO NACIONAL DE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, Manaus. Anais... Manaus: INPA, 1992. p.457-462.
- PEREIRA, E.G. Diversidade de rizóbios de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. Lavras: UFLA, 2000. 93p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas).
- SALMINEN, S.O. Effect of ammonium ion on nitrogenase activity in nodule breis and bacteroids from *Pisum sativum* cultivar Trapper. *Biochemistry Biophysics Acta*, Amsterdam, v.658, p.1-9, 1981.
- SENGUPTA, M. Environmental impacts of mining: monitoring, restoration, and control. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 494p.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois Press, 1949.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA, 1994. 142p.

- SOUZA, J.A.** Avaliação das estratégias de recuperação de áreas degradadas pela mineração de bauxita em Poços de Caldas (MG). Lavras: UFLA, 1997. 104p. (Tese - Doutorado em Agronomia).
- STATISTICA.** Statistic Analysis. Versão 5.0. 1995.
- VETTORI, L.** Métodos de análises do solo. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 24p. (Boletim Técnico, 7).
- VINCENT, J.M.** Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.
- WONG, P.P.; EVANS, H.J.** Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiology*, Rockville, v.47, n.6, p.750-755, June 1971.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P.** Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas: UFPel. Departamento de Matemática e Estatística, 1984. 151p.

CAPÍTULO 3

DENSIDADE E DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFITICAS EM SOLOS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA EM REABILITAÇÃO

RESUMO

MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. Lavras: UFLA, 2001. Cap. 3. 19p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*

Não há estudos relacionados a microrganismos diazotróficos endofíticos em solos ou plantas de áreas de mineração. No entanto, estes microrganismos desempenham importante papel na sustentabilidade desses sistemas pois, além de atuarem na fixação biológica do nitrogênio, produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal, melhorando a nutrição e utilização de água pelas plantas utilizadas na revegetação. Objetivando avaliar o efeito de diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação de solos de mineração de bauxita na densidade e diversidade fenotípica destes microrganismos, realizaram-se amostragens de solo em diferentes áreas pertencentes à Alcoa Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG), em três épocas (agosto de 1998, março e dezembro de 1999). A densidade foi avaliada através do número mais provável (NMP) em meios seletivos (NFb, JNFb e Fam, para *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *A. amazonense*, respectivamente), e a diversidade fenotípica através da caracterização cultural dos isolados em meio-batata. Enquanto a mineração reduz a densidade e diversidade destes microrganismos, a utilização de gramíneas como estratégia de reabilitação promove aumento destas variáveis. Não há efeito da cronosseqüência de reabilitação na ocorrência, densidade e diversidade destes microrganismos no solo. A maioria dos isolados apresentou características culturais com maior similaridade às estirpes-tipo de espécies do gênero *Azospirillum*, comprovando seu endofitismo facultativo e capacidade de sobrevivência em solos minerados.

* Comitê de Orientação: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Orientadora), José Oswaldo Siqueira - UFLA

DENSITY AND PHENOTYPIC DIVERSITY OF ENDOPHYTIC NITROGEN FIXING BACTERIA IN BAUXITE MINED SOILS UNDER REHABILITATION

ABSTRACT

MELLONI, R. Density and phenotypic diversity of endophytic nitrogen fixing bacteria in bauxite mined soils under rehabilitation. Lavras: UFLA, 2001. Chap. 3. 19p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)*

There are no studies related to endophytic nitrogen fixing bacteria on soils and plants of mining areas. However, these bacteria have important role on sustainability of these areas because they have the capacity of fixing nitrogen and produce and liberate plant growth regulating hormones. In order to evaluate the effect of different rehabilitation strategies and chronossequences on bauxite mined soils on density and phenotypic diversity of these bacteria, soil samples were collected from mining areas belonging to Alcoa Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG, Brazil), in August 1998, and March and December 1999. The density was evaluated by the most probable number (MPN) technique in selective media ((NFb, JNFb and Fam, for *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. and *A. amazonense*, respectively), and the phenotypic diversity by cultural characterization of isolates on potato-medium. While mining decreases bacteria density and diversity, the utilization of graminous plants as rehabilitation strategies promotes an increase of them. There is no effect of rehabilitation chronossequence on occurrence, density and diversity of these bacteria. Most of these isolates presented cultural characteristics with high similarity to bacteria of genus *Azospirillum*, proving its facultative endophytism and capacity to survive in bauxite mined soil.

* Guidance Committee: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Major Professor), José Oswaldo Siqueira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O conceito de microrganismos diazotróficos endofíticos foi introduzido na área de fixação biológica de N₂ (FBN) por Döbereiner (1992b) para definir bactérias que colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças. Bactérias do gênero *Azospirillum* são consideradas endofíticas facultativas, as quais, além de colonizarem os hospedeiros, podem sobreviver no solo, diferentemente daquelas consideradas obrigatórias, como as do gênero *Herbaspirillum*, que não sobrevivem bem no solo (Baldani et al., 1997). Apesar da baixa especificidade com relação a seus hospedeiros (Magalhães e Döbereiner, 1984; Baldani et al., 1997), as maiores ocorrências de bactérias fixadoras de nitrogênio, principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (Okon e Labandera-Gonzales, 1994; Bashan e Holguin, 1997; Baldani et al., 1999), são com gramíneas, comumente utilizadas como estratégia de reabilitação de solos minerados, cuja FBN pode ser responsável por 30 a 45 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ em *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens*, respectivamente (Boddey e Victoria, 1986).

Não há estudos destes microrganismos em solos ou espécies vegetais de áreas de mineração ou em processo de reabilitação. No entanto, segundo Bashan e Holguin (1997) e Baldani et al. (1999), a ocorrência e atividade dessas bactérias no solo e planta são fortemente influenciadas por fatores de estresse físico (ex. baixa umidade e alta temperatura), químico (ex. acidez e baixos teores de nutrientes e carbono) e biológico (ex. espécie vegetal não hospedeira), os quais são comuns em solos de mineração. Nestes ecossistemas, podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade, uma vez que incorporam nitrogênio através da fixação biológica, produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citoquininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização

de água pelas plantas (Bazzicalupo e Okon, 2000) utilizadas como estratégias de reabilitação.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a densidade e diversidade fenotípica destes microrganismos diazotróficos endofíticos em solos de mineração de bauxita submetidos a diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A descrição das áreas, metodologia de obtenção e caracterização química das amostras de solo estão no capítulo 2.

Para avaliação da densidade e diversidade de microrganismos diazotróficos endofíticos, foram obtidas amostras de solo nas seguintes épocas: agosto de 1998 (final do inverno), março de 1999 (final do verão) e dezembro de 1999 (final da primavera).

2.1 Avaliação semiquantitativa-inverno (agosto de 1998)

Após três amostragens de solo por sítio, pesaram-se 15 g de amostra de solo e transferiram-se para erlenmeyer contendo 75 mL de água destilada esterilizada (proporção 1:5). Homogeneizou-se por aproximadamente 30 min, antes da retirada de uma alíquota de 0,1 mL e inoculação em meios de cultura semi-sólidos específicos para *Azospirillum* spp.: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (NFb), *A. amazonense* (Fam) e *Herbaspirillum* spp. (JNFb), preparado conforme Döbereiner (1980), Magalhães (1983) e Baldani et al. (1992), respectivamente, com três repetições por amostra. Manteve-se sob incubação a 28°C por 5 dias, antes da avaliação da presença ou ausência do microrganismo no meio. Esta verificação é facilitada pelo crescimento característico destas bactérias, com

formação de película na superfície do meio de cultura, quando presentes na amostra. Calculou-se, posteriormente, a ocorrência desses microrganismos nas amostras de solo através da porcentagem de tubos considerados positivos para o crescimento (método semiquantitativo).

2.2 Densidade-verão (março de 1999) e primavera (dezembro de 1999)

Utilizaram-se três amostras de solo por sítio de estudo. Prepararam-se diluições de 10^{-1} a 10^{-5} da seguinte forma: a) Pesaram-se 10 g de amostra de solo, transferindo-as para erlenmeyer com 90 mL de água destilada esterilizada (10^{-1}). b) Homogeneizou-se por 30 min, retirou-se uma alíquota de 1 mL e transferiu-se para tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada (10^{-2}). Este procedimento foi repetido até a diluição 10^{-5} . c) Dos tubos com as diluições obtidas, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL para meios semi-sólidos específicos (NFb, JNFb e Fam), em três repetições por diluição. Manteve-se sob incubação por 5 dias a 28°C , avaliando-se posteriormente a presença ou ausência de crescimento bacteriano pela formação de película superficial no meio de cultura. De posse desses resultados, utilizou-se o programa MPNES (Woomer, Singleton e Bohlool, 1988) para determinação do número mais provável (NMP) desses microrganismos por grama de amostra de solo.

A análise dos resultados foi feita pelo programa estatístico SANEST (Zonta, Machado e Silveira Júnior, 1984), utilizando-se a transformação raiz quadrada de $x+0,5$ para o número de tubos positivos das amostras de solo coletadas no inverno, e log do NMP das amostras coletadas no verão e primavera. A comparação dos sítios foi feita pelo teste Duncan a 5% de significância.

2.3 Diversidade fenotípica dos isolados

Para obtenção dos isolados, utilizaram-se repicagens das culturas com película em meios semi-sólidos e sólidos específicos (NFb, JNFb e Fam), antes da repicagem final em meio-batata (Döbereiner, Baldani e Baldani, 1995) e incubação por 3 dias a 28°C, para confirmação da pureza e caracterização cultural através da cor, diâmetro e consistência das colônias.

Oitenta e cinco isolados foram caracterizados em meio-batata para estudo da diversidade fenotípica-cultural. Atribuíram-se valores às características destes isolados e de estirpes-tipo de *Azospirillum lipoferum*, *A. amazonense* e de um isolado pertencente ao gênero *Herbaspirillum*, da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo, da UFLA, para possibilitar o agrupamento em dendograma de similaridade através do método Complete Linkage e Distância Euclidiana (Everitt, 1993), pelo programa STATISTICA 5.0. Com as características culturais dos isolados, foi também calculado o índice de diversidade de Shannon-Weaver - H' (Shannon e Weaver, 1949), pela seguinte equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i, \text{ onde:}$$

k = igual ao número de grupos formados com as diferentes características culturais, e

p_i = abundância relativa dos isolados em cada grupo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ocorrência e densidade

Houve efeito das diferentes estratégias de reabilitação na densidade dos microrganismos diazotróficos endofíticos, avaliados nas três épocas de amostragens de solo, cujo resultado pode ser visto na tabela 1.

No inverno, somente nas amostras de solo dos sítios CA4 do campo e BCG6 e BG2 da serra foi verificado crescimento de microrganismos nos três meios de cultura (NFb para *Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp. e Fam para *A. amazonense*), indicando o efeito positivo das estratégias de reabilitação empregando gramíneas (CA4-capim-azevém, BG2-braquiária e BCG6-capim-gordura) na ocorrência destes microrganismos, quando comparado com as áreas-referência (RF). No entanto, não se obteve crescimento nos meios inoculados com amostras de solo dos sítios RF, B14, M18 e RM da serra, os quais, excetuando o sítio RM da serra (recém-minerado e não reabilitado), apresentam espécies arbóreas, com ausência ou limitação de gramíneas, consideradas plantas hospedeiras comuns destes microrganismos, segundo Magalhães e Döbereiner (1984), Döbereiner (1992a), Baldani et al. (1997) e Bashan e Holguin (1997). Ainda, a baixa densidade destes microrganismos em sistemas florestais pode estar relacionada à baixa demanda de nitrogênio, a qual pode ser suprida por ciclagem eficiente, com pouco ou nenhum estímulo à fixação biológica de nitrogênio (Boddey et al., 1997). Contrariamente, Florence e Cook (1984) encontraram alta densidade de *Azospirillum* spp. em floresta de coníferas, embora não tenham sido provadas sua especificidade e contribuição à manutenção deste ecossistema. Estas contradições indicam que pesquisas ligadas principalmente à ecologia destes microrganismos são ainda necessárias e fundamentais para o melhor entendimento e utilização destas relações endofíticas.

TABELA 1. Ocorrência e densidade de microrganismos diazotróficos endofíticos em amostras de solo coletadas no inverno, verão e primavera, avaliadas através dos meios de cultura NFb (para *Azospirillum* spp.), JNFb (para *Herbaspirillum* spp.) e Fam (para *A. amazonense*).

Sítios	inverno			verão			primavera		
	NFb	JNFb	Fam	NFb	JNFb	Fam	NFb	JNFb	Fam
	% de tubos positivos			log NMP g ⁻¹ de solo					
Campo									
RM-BG	0b	0b	77,40a	2,16a	0b	2,24b	2,76a	2,05a	1,73b
E3	5,40b	0b	21,40a	0b	0b	0c	1,96ab	0b	2,03ab
CA4	33,20a	49,40a	54,80a	2,51a	2,87a	4,30a	2,42ab	2,05a	2,51ab
BCG10	32,80a	12,20ab	0a	2,60a	2,37a	0c	2,26ab	2,60a	2,85a
E16	0b	0b	21,40a	0b	0b	0c	0c	1,76a	0c
BCG19	0b	5,40ab	5,40a	2,29a	0b	0c	2,50ab	2,51a	1,96ab
RF	0b	5,40b	0a	0b	2,26a	0c	1,92b	0b	0c
Serra									
RM-GG	0b	0d	0b	3,03b	2,85a	3,13a	0c	2,53ab	3,09a
BG2	64,60a	100a	22,20ab	3,78a	3,52a	2,97a	2,36a	3,32a	2,18b
BCG6	71,20a	49,40ab	37,80a	2,69b	3,56a	3,06a	0c	0c	3,23a
M10	37,80a	39,00bc	0b	0c	0b	0b	1,92b	1,76bc	1,83bc
B14	0b	0d	0b	0c	0b	0b	0c	0c	1,76bc
E16	0b	5,40cd	0b	0c	0b	0b	0c	0c	1,53c
M18	0b	0d	0b	0c	0b	0b	1,73b	0c	1,93bc
RF	0b	0d	0b	0c	0b	0b	0c	0c	0d

Considerar RM recém-minerado e não reabilitado para amostras coletadas no inverno. Campo: RM-BG reabilitado com braquiária e guandu 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos. RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG reabilitado com capim-gordura e guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos. RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

Apesar de ausência de cobertura vegetal, *A. amazonense* ocorreu (Tabela 1) nas amostras de solo do sítio RM do campo (recém-minerado e não reabilitado), indicando que esta espécie pode sobreviver às condições físicas,

químicas e biológicas estressantes dos solos minerados. Bashan e Holguin (1997) discutiram que sob condições de estresses (metais tóxicos, baixa umidade, etc), bactérias do gênero *Azospirillum* (*A. brasilense*) são capazes de sobreviver na forma de cistos, os quais, segundo Okon e Itzigsohn (1992), são fisiologicamente ativos e com capacidade de fixar nitrogênio na ausência de fonte exógena de carbono. Estudos têm mostrado ainda que bactérias deste gênero são capazes de acumular poli- β -hidroxibutirato (PHB), um material de reserva que lhes permite resistir a condições de estresses ambientais (Tal e Okon, 1985; Baldani et al., 1999). Crescimento desta espécie foi obtido também nos meios com amostras de solo dos sítios reabilitados com eucalipto do campo (E3 e E16). No entanto, verificou-se que a utilização de eucalipto como estratégia de reabilitação possibilitou menor ocorrência destes microrganismos em todas as épocas de amostragem, evidenciando o menor estímulo ao crescimento desta espécie na densidade dos microrganismos endofíticos estudados.

Pela tabela 1, verificou-se que no verão houve crescimento bacteriano nos três meios de cultura somente com amostras de solo dos sítios CA4 do campo, BCG6, BG2 e RM-GG da serra, indicando novamente o favorecimento do crescimento destes microrganismos em solos reabilitados com gramíneas. A mesma discussão é válida para o crescimento obtido com as amostras dos sítios RM-BG e BCG10 do campo. Os sítios RM-BG do campo e RM-GG da serra apresentavam aproximadamente 6 meses de reabilitação com gramíneas quando da amostragem no verão, indicando a rápida multiplicação destes microrganismos no solo, já que, excetuando-se o sítio RM do campo (onde se obteve crescimento de *A. amazonense*), não se verificou ocorrência de outros microrganismos estudados, na primeira época de amostragem.

Pela impossibilidade de comparação das densidades entre as três amostragens, verifica-se que as maiores densidades dos sítios CA4 do campo e

RM-GG, BG2 e BCG6 da serra ocorreram no verão, enquanto as dos demais sítios ocorreram na primavera. Nesta última época de amostragem, os microrganismos ocorreram em praticamente todos os sítios de estudo, cuja densidade foi maior que a das áreas-referência na maioria dos sítios. Este resultado indica o efeito do tempo de reabilitação nos sítios e, ou, das condições climáticas favoráveis (maiores valores de temperatura e umidade, quando da amostragem na primavera), conforme tabela 1 do capítulo 2.

Utilizando o meio NFb, as densidades de microrganismos alcançaram $6,0 \times 10^3$ (sítio BG2 da serra) no verão, e $5,7 \times 10^2$ células por grama de solo (RM-BG do campo) na primavera. Com o meio JNFb, chegaram a $3,6 \times 10^3$ (BCG6 da serra) no verão, e $2,1 \times 10^3$ células por grama de solo (BG2 da serra) na primavera; e utilizando o meio Fam, obtiveram-se densidades máximas de $1,99 \times 10^4$ (CA4 do campo) no verão, e $1,7 \times 10^3$ células por grama de solo (BCG6 da serra) na primavera. Densidades de 10^6 células de *Azospirillum* spp. por grama de raízes e solo foram obtidas em cultura de milho e sorgo nos trópicos (Döbereiner, 1978 citado por Döbereiner, Baldani e Baldani, 1995) e outras plantas nas áreas temperadas (Reynders e Vlassak, 1976), e até 10^5 em raízes não lavadas de pupunha e braquiária na Amazônia (Magalhães e Döbereiner, 1984).

Pelos resultados obtidos em todas as épocas de amostragem de solo, pode-se verificar que houve efeito positivo das estratégias de reabilitação empregando gramíneas (braquiária, capim-gordura e azevém), embora não de sua cronossequência, na população dos microrganismos diazotróficos estudados.

3.2 Diversidade fenotípica-cultural dos isolados

Vinte e três grupos fenotípicos culturais foram formados (Tabela 2), sendo a maioria dos isolados pertencentes aos grupos D, R, A, L e I. O número total de isolados obtidos por época de amostragem de solo em função dos grupos

fenotípicos culturais se encontra na figura 1, num total de 20, 32 e 33 isolados, respectivamente, em amostras de solo coletadas no inverno, verão e primavera. Menor número de isolados foi obtido no inverno, possivelmente pelo fato dos sítios recém-minerados (RM) do campo e da serra não terem ainda entrado em processo de reabilitação.

TABELA 2. Descrição dos grupos fenotípicos culturais e número total de isolados de microrganismos diazotróficos endofíticos por grupo, obtidos de amostras de solo coletadas no inverno, verão e primavera.

Grupos fenotípicos	Características culturais			Número total de isolados
	Cor apresentada	Tamanho (mm)	Consistência	
A	creme	2-3	dura	7
B	branco rosado	1-2	dura	2
C	creme claro	<1	dura	3
D	rosa claro	2-3	dura	11
E	creme	3-4	dura	1
F	creme claro	1-2	dura	1
G	creme	1-1,5	dura	2
H	creme transparente	1-2	mole	6
I	branco	1-2	dura	7
J	branco	<2	mole	1
K	branco	<1	dura	6
L	rosa	2-3,5	dura	7
M	rosa	1-2	dura	2
N	creme/laranja	<3	dura	2
O	creme	<1,5	mole	3
P	creme	1,5-2	dura	2
Q	creme	1	dura	2
R	branco transparente	<1	dura	9
S	branco	2-3	dura	6
T	rosa claro	1-2	mole	1
U	creme rosado	<4	dura	2
V	creme	1,5-3	mole	1
X	rosa	<1	dura	1

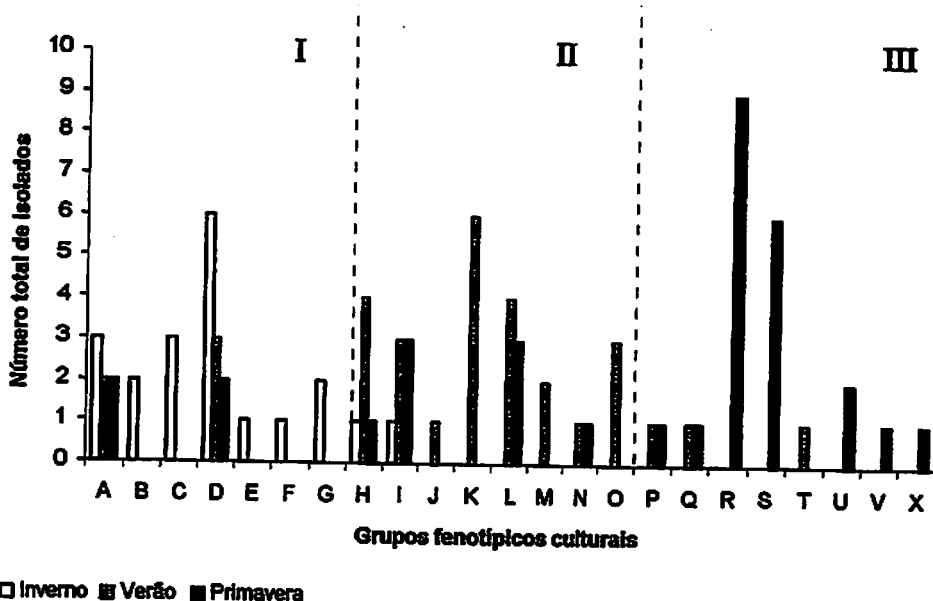


FIGURA 1. Número total de isolados por época de amostragem, em função dos grupos fenotípicos culturais. As linhas tracejadas separam os grupos fenotípicos culturais mais freqüentes nas diferentes épocas de amostragem de solo (I: aqueles que predominam no inverno, II: no verão e III: na primavera).

Foi evidente a obtenção de grupos fenotípicos distintos por época de amostragem, indicando que, possivelmente, houve efeito diferenciado das condições ambientais de temperatura e umidade (tabela 1 do capítulo 2) na seleção de microrganismos, na qual os mais adaptados foram também os mais freqüentes. Nas amostras de solo do inverno (menor temperatura e umidade), a maioria dos isolados foi distribuída nos grupos de A a I, no verão (maior temperatura e umidade) de H a Q, e na primavera (temperatura e umidade superiores às do verão), principalmente entre P e X, embora nesta época os isolados tenham se distribuído em maior número de grupos fenotípicos culturais.

O número total de isolados por sítio de estudo se encontra na tabela 3.

TABELA 3. Número total de isolados de diazotróficos endofíticos por sítio de estudo, obtidos de amostras de solo coletadas no inverno, verão e primavera, utilizando os meios específicos NFb, JNFb e Fam.

Sítios	Número de isolados			Total de isolados
	NFb para <i>Azospirillum</i> spp.	JNFb para <i>Herbaspirillum</i> spp.	Fam para <i>A. amazonense</i>	
Campo				
RM-BG	3	2	5	10
E3	0	0	0	0
CA4	0	0	4	4
BCG10	1	8	7	16
E16	0	0	0	0
BCG19	5	1	3	9
RF	1	3	0	4
Serra				
RM-GG	1	3	3	7
BG2	5	10	0	15
BCG6	4	4	3	11
M10	1	5	0	6
B14	2	0	0	2
E16	0	0	0	0
M18	0	0	0	0
RF	1	0	0	1

Campo: RM-BG reabilitado com braquiária e guandu 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG reabilitado com capim-gordura e guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Assim como observado para a densidade de endofíticos, os sítios nos quais se obteve maior número de isolados de diazotróficos endofíticos foram, na ordem decrescente, BCG10, RM-BG e BCG19 do campo e BG2, BCG6 e RM-GG da serra, com valores acima dos obtidos nas áreas-referência (RF). Estes sítios apresentavam cobertura do solo com gramíneas do tipo capim-gordura e braquiária, as quais possivelmente contribuíram para maior multiplicação destes microrganismos no solo e maior facilidade de isolamento. Embora tenha sido registrada a ocorrência (Tabela 1) destes microrganismos nos sítios com plantio

de eucalipto (E16 e E3 do campo e E16 da serra), não se obtiveram isolados nestas áreas.

Pela tabela 3, obteve-se grande número de isolados (42% do total) utilizando o meio JNFb para *Herbaspirillum* spp. No entanto, segundo Baldani et al. (1999), deve-se atentar ao fato de que a formação de película no meio JNFb não necessariamente indica a presença de bactérias deste gênero. Os autores discutem que o isolamento destas bactérias é dificultado, uma vez que pode ser confundido com *Azospirillum*, principalmente com aquelas bactérias capazes de tolerar a maior acidez inicial do meio JNFb. Döbereiner, Baldani e Baldani (1995) relataram que a diferença entre os gêneros está no menor tamanho das células bastonetes de *Herbaspirillum* (0,6 a 0,7 μm x 3 a 5 μm), ligeiramente curvadas e com movimento espiralóide apenas quando próximas de bolhas de ar. Em meio-batata, as colônias de *Herbaspirillum* spp. são úmidas e pequenas, com centro marrom, produzindo um cheiro característico, enquanto aquelas de *Azospirillum* spp. formam colônias maiores, bem distintas, achatadas e com bordas elevadas. No presente estudo, apesar de todos os isolados serem Gram negativos, em forma de bastonetes curvos e móveis, não se obtiveram isolados com características culturais descritas e específicas de *Herbaspirillum* spp

Com os grupos fenotípicos culturais dos isolados, foi possível calcular o índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') em cada época de amostragem de solo. Os valores encontrados foram 1,99, 2,18 e 2,32, respectivamente para os isolados obtidos nas amostragens de solo realizadas no inverno, verão e primavera, com alta correlação com o número de isolados obtidos ($r=0,99$). O incremento na diversidade pode estar relacionado à sucessão vegetal e ao processo de reabilitação ocorridos nos sítios entre as épocas de amostragem, ou mesmo em função das condições ambientais (maior temperatura e umidade).

A figura 2 mostra o dendograma de similaridade entre os isolados e as estirpes-tipo *Azospirillum lipoferum*, *A. amazonense* e um isolado do gênero *Herbaspirillum*, pertencente ao Laboratório de Microbiologia do Solo, da UFLA, construído de acordo com suas características culturais.

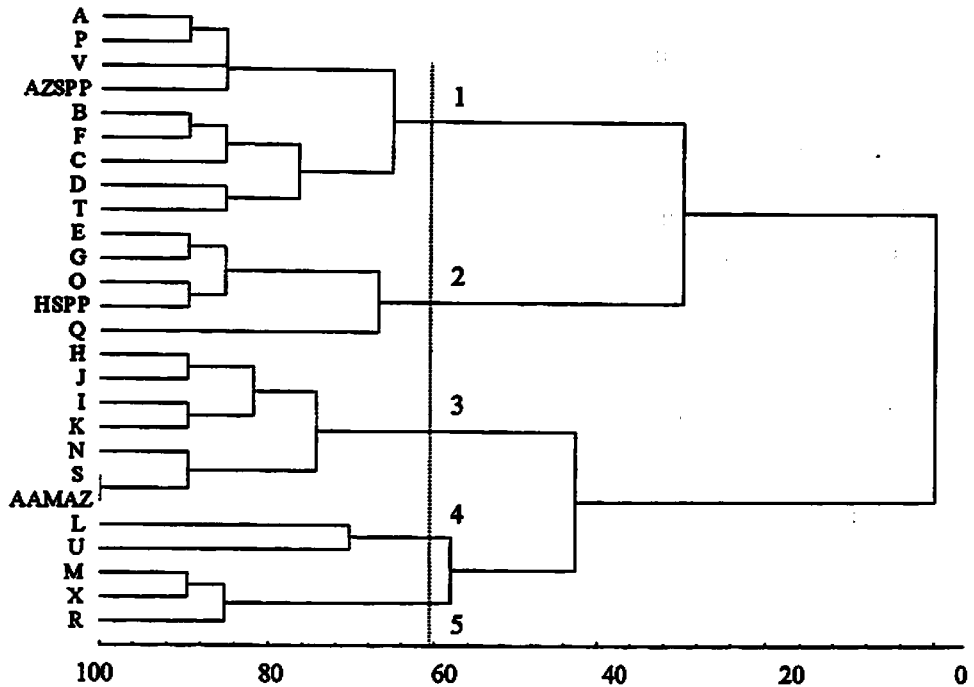


FIGURA 2. Dendograma de similaridade entre isolados de microrganismos diazotróficos endofíticos, construído de acordo com os grupos fenotípicos culturais (A, B, ... X). AZSPP, AAMAZ e HSSP correspondem às estirpes-tipo *Azospirillum lipoferum*, *A. amazonense* e do isolado do gênero *Herbaspirillum*, respectivamente. Os grupos fenotípicos culturais estão descritos na tabela 2.

A 60% de similaridade, houve formação de 5 grandes grupos. O grupo 1 reuniu 8 grupos fenotípicos culturais (28 isolados ou 32,9% do total) com a estirpe-tipo *Azospirillum lipoferum*, o grupo 2 reuniu 4 grupos fenotípicos (8 isolados ou 9,4% do total) com o isolado do gênero *Herbaspirillum*, o grupo 3 reuniu 6 grupos fenotípicos (28 isolados ou 32,9% do total) com a estirpe-tipo *A. amazonense*, enquanto os outros dois grandes grupos (21 isolados ou 24,7% do total) apresentaram maior similaridade (40%) à estirpe-tipo *A. amazonense*.

Assim, pelo dendograma de similaridade construído com base nas características culturais dos isolados, obtiveram-se aproximadamente 91% dos isolados com maior similaridade a estirpes-tipo de espécies do gênero *Azospirillum*. Este resultado pode confirmar a característica de endofitismo facultativo de bactérias do gênero *Azospirillum* e a de endofitismo obrigatório de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, sendo o último com baixa ou nenhuma sobrevivência no solo (Olivares et al., 1996; Baldani et al., 1997).

4 CONCLUSÕES

Enquanto a mineração reduz a densidade e diversidade de microrganismos diazotróficos endofíticos, a utilização de gramíneas (capim-gordura, azevém e braquiária) como estratégia de reabilitação promove aumento destas variáveis, em valores superiores aos das áreas-referência.

Não há efeito da cronossequência de reabilitação na ocorrência, densidade e diversidade de microrganismos diazotróficos endofíticos, utilizando-se amostras de solo e meios de cultura NFb, JNFb e Fam.

Pelas características culturais (cor, tamanho e consistência das colônias), 91% dos isolados apresentaram maior similaridade com o gênero *Azospirillum*, indicando o seu endofitismo facultativo, com capacidade de sobrevivência nos solos minerados, em reabilitação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, Rehovot, v.13, p.65-73, 1992.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.69, n.1, p.116, 1997.
- BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S. de; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa: UFLA/DCS, 1999. p.621-666.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.2, p.103-121, Feb. 1997.
- BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds). *Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-410.
- BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.90, n.1/3, p.265-292, 1986.
- BODDEY, R.M.; SÁ, J.C.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.787-799, May/June 1997.
- DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J. (ed.) *Methods for evaluating biological nitrogen-fixation*. New York: J. Wiley, 1980. p.535-555.
- DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, Rehovot, v.13, p.1-13, 1992a.

- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.44, n.5, p.310-313, set./out. 1992b.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI, Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- EVERITT, B.S. Cluster analysis. New York: J. Wiley, 1993. 170p.
- FLORENCE, L.Z.; COOK, F.D. Asymbiotic N₂-fixing bacteria associated with three boreal conifers. *Canadian Journal of Forestry Research*, Ohawa, v.14, n.4, Aug. 1984.
- MAGALHÃES, F.M.M. Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio. Manaus: Universidade do Amazonas, 1983. 89p. (Tese - Mestrado em Botânica).
- MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.15, n.4, p.246-252, out./dez. 1984.
- OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.26, n.12, p. 1591-1601, Dec. 1994.
- OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v.103, p.131-139, 1992.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.21, n.3, p.197-200, Feb. 1996.
- REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Nitrogen fixing *Spirillum* species in Belgian soils. *Agricultura*, Piracicaba, v.24, p.329-336, 1976.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois, 1949.
- STATISTICA. Statistic Analysis. Versão 5.0. 1995.
- TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly-beta-dihydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.31, n.7, p.608-613, July 1985.

WOOMER, P.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1112-1116, July 1988.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas: UFPel. Departamento de Matemática e Estatística, 1984. 151p.

CAPÍTULO 4

POTENCIAL DE INÓCULO, DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE FUNGOS MAs EM SOLOS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA EM REABILITAÇÃO

RESUMO

MELLONI, R. Potencial de inóculo, diversidade e eficiência de fungos MAs em solos de mineração de bauxita em reabilitação. Lavras: UFLA, 2001. Cap. 4. 37p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*

A mineração proporciona grandes alterações físicas, químicas e microbiológicas no solo, com efeitos negativos na população de fungos MAs. No entanto, não há trabalhos mostrando o efeito de diferentes estratégias e cronosseqüências de reabilitação de solos minerados na recuperação destes microrganismos. Utilizando-se amostras de solos em reabilitação pertencentes à Alcoa Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG), coletadas em 1998 e 1999, determinaram-se, em laboratório e casa-de-vegetação, o potencial de inóculo, diversidade e eficiência de populações de fungos MAs. A mineração de bauxita exerceu efeito negativo nestas populações, as quais podem ser recuperadas por diferentes estratégias de reabilitação, principalmente utilizando gramíneas e bracatingas. A seguinte ordem decrescente de freqüência de fungos MAs foi encontrada nos solos das áreas mineradas: *Glomus* sp. > *Acaulospora scrobiculata* > *Entrophospora colombiana* > *Gigaspora* sp. O efeito da cronosseqüência de reabilitação na população de fungos MAs somente ocorreu para micélio extrarradicular total, indicando que as estratégias de reabilitação dos solos são mais importantes que a idade de reabilitação na população destes microrganismos.

* Comitê de Orientação: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Orientadora), José Oswaldo Siqueira - UFLA

INOCULUM POTENTIAL, DIVERSITY, AND EFFICIENCY OF AM FUNGI IN BAUXITE MINED SOILS

ABSTRACT

MELLONI, R. Inoculum potential, diversity, and efficiency of AM fungi in bauxite mined soils. Lavras: UFLA, 2001. Chap. 4. 37p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)*

The mining activity has shown to promote great physical, chemical and microbiological changes in soils, with negative effect on arbuscular mycorrhizal (AM) fungal populations. However, there are no reports showing the effect of different rehabilitation strategies and chronosequences of bauxite mined soils in these populations. Using soil samples collected from bauxite mining areas belonging to Alcoa Alumínio S/A (Poços de Caldas, MG, Brazil) in 1998 and 1999, the inoculum potential, diversity, and efficiency of AM fungi were evaluated under laboratory and greenhouse conditions. The bauxite mining has negative effect on these populations, but they were recuperated with different rehabilitation strategies, mainly by graminous plants and "bracatingas" (*Mimosa scabrella*). The frequency of AM fungi founded in those soils was: *Glomus* sp. > *Acaulospora scrobiculata* > *Entrophospora colombiana* > *Gigaspora* sp. The effect of rehabilitation chronosequence on AM fungi occurred only for total extraradical mycelium, indicating that rehabilitation strategies are more important than rehabilitation age on these populations.

* Guidance Committee: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Major Professor), José Oswaldo Siqueira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A atividade de mineração, além de causar degradação física e química de solos, promove significativos efeitos negativos na microbiota do solo. Vários estudos ligados à microbiota de solos de mineração relacionam o impacto desta atividade nas populações de fungos micorrízicos arbusculares (MAs). Estes microrganismos, em simbiose com plantas, otimizam a utilização de nutrientes e possibilitam maior vantagem competitiva destas plantas quando do processo de sucessão, incrementam a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas (Franco e Faria, 1997) e contribuem para a agregação do solo (Miller e Jastrow, 1992a,b), estabilidade e sustentabilidade destes ecossistemas impactados (Johnson e Pfieger, 1992; Smith e Read, 1997).

Vários autores têm relatado a redução do número de propágulos de fungos MAs pela mineração (Walland e Allen, 1987; Diaz e Honrubia, 1993), a qual poderia comprometer a revegetação e reabilitação destes sistemas. Em solos de mineração de carvão nos EUA, (Kieman, Hendrix e Maronek, 1983), de magnetita na Índia (Raman et al., 1993), de bauxita no Brasil (Souza, 1997) e de carvão na Índia (Mehrotra, 1998), foi registrada baixa diversidade destes microrganismos. Estas reduções no número de propágulos e diversidade de fungos MAs pela atividade de mineração podem estar relacionadas à eliminação de plantas hospedeiras (Bécard e Piché, 1989; Bécard, Doude e Pfeffer, 1992), exposição a extremos de temperatura (McGonigle e Miller, 1999) e umidade (Jasper, Abbott e Robson, 1993; Braunberg, Abbott e Robson, 1996), baixos valores de pH (Mehrotra, 1998), entre outros fatores.

Não há relatos sobre o efeito da reabilitação no número de propágulos e diversidade destes microrganismos em solos de mineração de bauxita. No entanto, a sucessão e estrutura das comunidades vegetais, decorrentes do processo de revegetação e reabilitação, exercem grande impacto na ocorrência e

diversidade de fungos MAs, sendo a última considerada essencial à estrutura, desenvolvimento e sustentabilidade da comunidade vegetal e reabilitação dos solos minerados (Gould, Hendrix e Ferriss, 1996; Mehrotra, 1998). Por outro lado, a ocorrência e diversidade destes microrganismos podem também interferir no processo de sucessão vegetal, alterando sua estrutura e desenvolvimento (Janos, 1980; Pflieger, Stewart e Noyd, 1994; Francis e Read, 1994; Siqueira et al., 1998; Van der Heijden et al., 1998).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes estratégias e cronosséquências de reabilitação no potencial de inóculo, diversidade e eficiência de fungos MAs, em solos de mineração de bauxita.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A descrição das áreas, metodologia de obtenção e caracterização química das amostras de solo estão no capítulo 2.

O fluxograma das etapas do estudo de fungos MAs está representado na figura 1. Para quantificação da população de fungos MAs nos sítios de estudo, avaliaram-se micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET) de fungos do solo, número total de esporos e tipos, utilizando-se amostras de solo coletadas em agosto de 1998 (inverno) e março de 1999 (verão), e número mais provável de propágulos em amostras de solo coletadas em dezembro de 1999 (primavera). Para avaliação da eficiência de populações de fungos MAs, utilizaram-se esporos coletados das amostras de inverno. Os estudos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo e casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo, da Universidade Federal de Lavras.

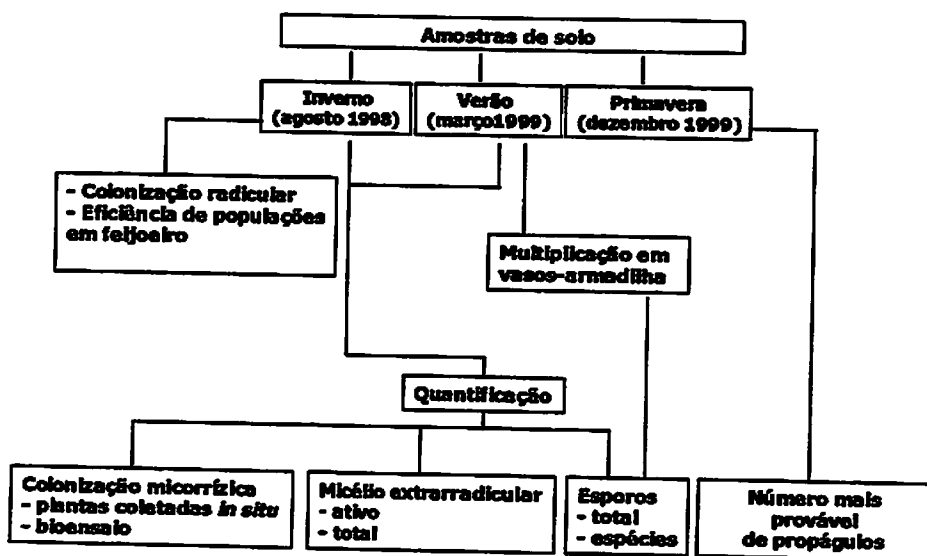


FIGURA 1. Fluxograma das etapas do estudo das populações de fungos MAs.

2.1 Micélio extrarradicular

Fez-se uma suspensão com 10 g de amostra de solo (umidade conhecida) em 1500 mL de água de torneira, utilizando-se posteriormente um jogo de peneiras de 0,71 mm e 0,25 mm. Agitou-se em liquidificador por 30 s na menor rotação, deixando-se posteriormente em repouso por 2 min, antes do peneiramento (0,045 mm) de uma alíquota de 500 mL e transferência de 11 mL desta suspensão para frasco de penicilina. Retiraram-se 5 mL desta suspensão e adicionaram-se 5 mL de uma solução com diacetato de fluoresceína - FDA (5 mg de FDA em 1 mL de acetona e completar a 100 mL com solução tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4), incubando-se por 5 min antes da filtração em conjunto de filtração e membrana quadriculada de triacetato de celulose Millipore de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. Acoplou-se uma ocular reticulada (10x10 campos) ao microscópio de epifluorescência Nikon Optiphot-2 e, através

do método de contagem da intersecção das hifas com as linhas horizontais da membrana, avaliou-se o MEA sob luz ultravioleta (MEA) e MET sob luz comum, empregando a seguinte equação: $MEA \text{ ou } MET = 0,21387 \cdot n / 10 - U$, sendo n o número de intersecções avaliado e U a quantidade de água na amostra em gramas (Melloni e Cardoso, 1999). O resultado é dado em metros de hifa por grama de solo seco.

2.2 Número total de esporos e espécies

Utilizou-se o método do peneiramento úmido descrito por Gerdemann e Nicolson (1963). Para isso, amostrou-se um volume de 50 mL de solo e fizeram-se três lavagens com água de torneira em peneiras de 0,71 e 0,053 mm. O retido nessa última peneira foi transferido para tubo de centrífuga e centrifugado a 3000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado, acrescentando-se posteriormente uma solução com sacarose 50% e agitando-se a 2000 rpm por 2 min. O sobrenadante foi peneirado em peneira de 0,045 mm e o retido foi transferido para placa concêntrica para contagem do número total de esporos e número de esporos por espécie. Para a classificação dos esporos, utilizaram-se lupa microscópica e microscópio comum Nikon, com montagem de lâminas em PVLG (polivinil álcool-lactoglicerol) ou PVLG/reagente de Melzer (4:1, v.v), e descrições morfológicas do manual do INVAM (Morton, Bentivenga e Wheeler, 1993). Posteriormente, calculou-se a riqueza de espécies por sítio, que é o próprio número de espécies por sítio, e o índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'), conforme Shannon e Weaver (1949), pela equação:

$$H' = - \sum_{i=1}^k p_i \ln p_i, \text{ onde:}$$

k = igual ao número de esporos de fungos MAs por espécie, e
 p_i = abundância relativa dos esporos em cada espécie.

2.3 Colonização micorrízica de espécies coletadas *in situ* e de feijoeiro e caupi em vasos (bioensaio)

Aproximadamente 1 g de amostras de raízes de espécies coletadas *in situ*, obtidas da camada superficial quando da coleta de amostras de solo no verão, foram clarificadas com KOH 0,05 mol L⁻¹ a 90°C, em banho-maria por 60 min, enxaguadas em água e posteriormente imersas em HCl 0,05 mol L⁻¹ por 30 min. Depois de acidificadas, as raízes foram coradas em solução 0,05% de azul de tripano em banho-maria por 30 min a 90°C (Phillips e Haymann, 1970). A porcentagem de colonização foi estimada pelo método da interseção em placa quadriculada (Giovanetti e Mosse, 1980) e lupa microscópica Nikon SMZ-U.

Dos experimentos de nodulação das espécies de plantas-isca (feijoeiro e caupi) descritos no capítulo 2, avaliou-se a porcentagem de colonização radicular, seguindo metodologia descrita anteriormente.

2.4 Multiplicação de fungos MAs em vasos-armadilha

As repetições das amostras de solo coletadas no verão, previamente utilizadas nos experimentos de nodulação (capítulo 2) com as espécies de plantas-isca (feijoeiro cv. Carioca e caupi cv. Mulato), foram reunidas, de acordo com o sítio correspondente, em vasos plásticos de 3 L, antes da semeadura de *Brachiaria ruziziensis* (capim-congo) e *Neonotonia wightii* (soja perene comum) para multiplicação dos esporos (Brundrett et al., 1996). Procederam-se avaliações do número de esporos de fungos MAs (Gerdemann e Nicolson, 1963) e por espécie (Morton et al., 1993) aos 13 meses da semeadura, com posterior cálculo do índice de diversidade de Shannon e Weaver (1949).

2.5 Número mais provável (NMP) de propágulos de fungos MAs

Em fevereiro de 2000, instalou-se um experimento em casa-de-vegetação para determinação do número mais provável (NMP) de propágulos de

fungos MAs, com amostras de solo coletadas na primavera (dezembro de 1999), segundo metodologia descrita em Souza e Guerra (1998). Para isto, utilizaram-se copos plásticos de 200 mL de capacidade e 120 g de substrato. O substrato diluente das amostras de solo dos sítios de estudo foi preparado da seguinte forma: misturou-se uma parte de amostra de solo LV para uma parte de areia de rio lavada, esterilizando-se em autoclave por duas vezes, em dias alternados, antes da secagem em estufa a 105°C. Fez-se caracterização química do substrato diluente, com os seguintes valores encontrados, antes e após esterilização, respectivamente: pH (6,2 para 5,7), P (1 mg dm⁻³), P resina (2,6 para 3,2 mg dm⁻³), K (25 para 27 mg dm⁻³), Ca (1,6 para 1,3 cmol_c dm⁻³), Mg (1,1 cmol_c dm⁻³), Al (0 cmol_c dm⁻³), Zn (0,6 mg kg⁻¹), Cu (0,6 mg kg⁻¹), Mn (9,0 para 22,0 mg kg⁻¹), Fe (13,1 para 10,8 mg kg⁻¹), S (3,8 para 4,3 mg kg⁻¹) e V (60 para 55%). A diluição das amostras de solo (sem repetição por área) (amostra-teste ou amostras dos sítios de estudo) foi feita utilizando base 4 de diluição, ou seja, 220 g de amostra de solo teste para 660 g de substrato diluente (1:4), até a diluição 4⁷ para cada amostra, com 4 repetições por diluição. Semearam-se cerca de 20 sementes de painço (*Panicum miliaceum*) desinfectadas (álcool 70% por 3 min e hipoclorito de sódio 1% por 3 min) em cada vaso, mantendo-se cerca de 6 plantas por vaso através de podas constantes.

Seguiram-se adubações quinzenais e mensais com macro e micronutrientes, conforme metodologias descritas em Souza e Guerra (1998), sendo a solução com P fornecida mensalmente e os demais nutrientes quinzenalmente.

Aos 52 dias da semeadura, coletaram-se as plantas, separando-se uma pequena porção do sistema radicular para determinação da colonização radicular (metodologia descrita no item 2.3), assinalando-se ausência ou presença de estruturas fúngicas nas raízes para cálculo do NMP de propágulos de fungos MAs pelo programa MPNES (Woomer, Singleton e Bohlool, 1988).

2.6 Eficiência de populações em feijoeiro

No final de agosto de 1999, utilizando-se amostras de solo coletadas em março de 1999 (verão), conduziu-se um experimento, cujo substrato foi preparado da seguinte forma: a) peneiramento (2,0 mm) de amostra de solo LV distrófico, argiloso, coletado na camada de 0-20 cm, do Distrito de Jaguará (MG); b) calagem empregando calcário dolomítico PRNT 100% até saturação por bases de 60%; c) fumigação com brometo de metila (98%) na dose de $263 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-3}$; d) arejamento do substrato e colocação de 1,5 kg de amostra de solo em vasos plásticos, para posterior fertilização com macro (50 mg kg^{-1} de $\text{P-KH}_2\text{PO}_4$, 20 g kg^{-1} de $\text{S-(NH}_4)_2\text{SO}_4$, 18 mg kg^{-1} de $\text{N-(NH}_4)_2\text{SO}_4$, 63 mg kg^{-1} de $\text{K-KH}_2\text{PO}_4$) e micronutrientes ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de $\text{Mo-HMoO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 5 mg kg^{-1} de $\text{Zn-ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de $\text{Cu-CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de $\text{B-H}_3\text{BO}_3$); e) incubação por 7 dias, antes do transplante do feijoeiro cv. Carioca (uma planta por vaso). Essas plântulas foram obtidas após germinação das sementes desinfetadas (3 min em álcool 70% e 3 min em solução de hipoclorito de sódio 1%, conforme Andrade e Hamakawa, 1994), em papel de filtro a 28°C por 24 horas.

O inóculo de fungo MA foi preparado coletando-se esporos das amostras de solo dos diferentes sítios de estudo, pelo método do peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963). Desta suspensão, separaram-se 200 esporos por amostra, os quais foram aplicados abaixo das raízes das plântulas de feijoeiro. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente ao acaso, com aplicação de 15 tratamentos com as amostras de solo dos sítios de estudo (7 da região de campo e 8 da região de serra), mais um tratamento controle, sem adição de esporos, com três repetições por tratamento. Em vasos adicionais, foram aplicados 200 esporos de *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann obtidos de vasos de cultivo com *Brachiaria decumbens*, para servir como referência de eficiência. Após três dias, aplicou-se 1 mL de inóculo de rizóbio

($1,7 \times 10^{10}$ células de rizóbio BR322/CIAT899, *R. tropici*) por vaso, em todos os tratamentos. Este inóculo foi preparado após cultivo das células em meio TY sob agitação por três dias a 28°C.

Realizou-se uma adubação foliar com 1 g L⁻¹ de sulfato ferroso amoniacal e coletaram-se as plantas após 51 dias do transplântio, quando no início do florescimento das plantas. Determinaram-se a matéria seca da parte aérea, matéria fresca das raízes e porcentagem de colonização radicular.

Poucos nódulos foram obtidos, a maioria em plantas inoculadas com esporos de *G. etunicatum*, sem atividade da nitrogenase. Um ensaio comparando a eficiência da estirpe tipo de *R. tropici* BR322/CIAT899 com o isolado de rizóbio UFLA127, eficiente para feijoeiro (Pereira et al., 2000), não mostrou diferença na produção de matéria seca da parte aérea e na nodulação, indicando que a baixa nodulação obtida pode estar relacionada ao emprego de substrato previamente fumigado com brometo de metila, o qual pode reduzir ou inibir a nodulação (Kishinevsky et al., 1992) e, ou, à dose de aproximadamente 36 kg ha⁻¹ de N acrescentada via solo (Hungria, Vargas e Araújo, 1997). Apesar disto, o substrato utilizado não prejudicou o efeito dos fungos MAs na simbiose com o feijoeiro, permitindo os estudos de eficiência destas populações.

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com comparação de médias por Duncan a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico SANEST (Zonta, Machado e Silveira Júnior, 1984). Porcentagem de colonização radicular foi submetida à transformação arc sen (raiz quadrada de x/100) e número de esporos à transformação raiz quadrada de x, antes das análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação da população de fungos MAs

Micélio extrarradicular

Os valores de MEA e MET obtidos das amostras de solo coletadas no inverno e verão, indicam efeitos das estratégias de reabilitação (Tabela 1). Para as amostras coletadas no inverno, os maiores valores de MEA foram obtidos no sítio E3 do campo e nos sítios B14 e BG2 da serra, cujos valores não diferiram estatisticamente daqueles apresentados pelas áreas-referência (RF) do campo e serra. O MEA está diretamente relacionado à capacidade de absorção e translocação de nutrientes para a planta (Beever e Burns, 1980), enquanto o MET pode estar mais envolvido com a agregação do solo, visto os resultados obtidos por Miller e Jastrow (1992a,b). A análise do MEA destacou o efeito negativo da mineração (menores valores encontrados nos sítios recém-minerados do campo e serra (RM)) e discriminou o efeito das diferentes estratégias de reabilitação. Os menores valores de MET foram obtidos nos sítios RM, CA4 e BCG10 do campo e RM da serra, confirmando o efeito negativo da mineração no crescimento de micélio fúngico, e concordando com Kabir et al. (1997, 1998), os quais verificaram redução no MEA e MET de fungos MAs em solos revolvidos. Os maiores valores foram obtidos nos sítios RF, BCG19, E16 e E3 do campo e sítio M18 da serra, com valores semelhantes (campo) ou superiores àqueles das áreas-referência (serra). Estes resultados mostram o efeito positivo do tempo de reabilitação, principalmente nos sítios do campo, no aumento de micélio fúngico no inverno.

TABELA 1. Comprimento de micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET) de fungos das amostras de solo coletadas no inverno e verão.

Sítios	Inverno		Verão	
	MEA	MET	MEA	MET
	m g ⁻¹ de solo			
Campo				
RM-BG*	0,03b	0,48c	0,71a	13,05c
E3	0,17a	10,76ab	0,08b	15,82c
CA4	0,06ab	7,01bc	0,59ab	25,31bc
BCG10	0,12ab	7,64bc	0,47ab	47,09a
E16	0,07ab	11,81ab	0,07b	14,59c
BCG19	0,09ab	11,47ab	0,46ab	41,17ab
RF	0,10ab	17,68a	0,61a	25,42bc
Serra				
RM-GG*	0,01b	0,27c	0,20b	9,85c
BG2	0,11a	10,68b	0,53b	32,39b
BCG6	0,08ab	10,46b	1,87a	60,10a
M10	0,08ab	18,87b	0,32b	39,64b
B14	0,11a	20,34b	1,04ab	43,69ab
E16	0,01b	11,37b	0,26b	46,07ab
M18	0,04ab	32,88a	0,12b	35,92b
RF	0,06ab	18,21b	0,14b	32,53b

* Para o inverno, considerar RM no lugar de RM-BG ou RM-GG. Campo: RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos. RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos. RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

Os valores de MEA e MET nas amostras de solo coletadas no verão foram bem superiores àqueles das amostras coletadas no inverno. Este resultado pode ser devido ao efeito das maiores temperaturas e umidades registradas no

verão (Tabela 1 do capítulo 2) e, ou, ao próprio efeito da reabilitação, estimulando o desenvolvimento destes propágulos no solo (Braunberg, Abbott e Robson, 1996; McGonigle e Miller, 1999). A última hipótese pode ser confirmada principalmente pelos maiores valores de MEA e MET dos sítios RM-BG do campo e RM-GG da serra (sítios recém-minerados) no verão, em início do processo de reabilitação, com aproximadamente 6 meses da semeadura de braquiária e feijão-guandu, quando comparados aos dos sítios RM no inverno.

No entanto, para as amostras coletadas no verão, o MEA foi pouco discriminatório dos sítios do campo e serra (Tabela 1), com maior valor para o sítio BCG6 da serra. Resultados do MET indicaram novamente o efeito negativo da mineração, visto os menores valores para os sítios recém-minerados (RM-BG e RM-GG) e aqueles sítios do campo com eucalipto. Os maiores valores foram obtidos nos sítios em reabilitação BCG19 e BCG10 do campo e E16, B14 e BCG6 da serra, com valores superiores aos apresentados pelas áreas-referência (RF). Este resultado mostra o efeito positivo da utilização de bracing como estratégia de reabilitação, a qual contribuiu para os maiores valores de MET nas duas épocas de amostragem de solo.

A diferença de comportamento da variável MET entre os sítios E16 do campo e E16 da serra, ambas com eucalipto de aproximadamente 16 anos de idade, pode estar relacionada ao manejo diferenciado aplicado no campo e serra, onde na serra, pela presença de um sub-bosque desenvolvido e maior diversidade vegetal, poderia haver maior variabilidade de exsudatos radiculares, estimulando o crescimento micelial (Bécard e Piché, 1989; Bécard, Douds e Pfeffer, 1992).

Número total de esporos e número mais provável de propágulos

A tabela 2 mostra o número total de esporos em amostras de solo coletadas no inverno e verão e em vasos-armadilha após multiplicação por 13 meses em casa-de-vegetação, e o número mais provável de propágulos de fungos MAs nestas amostras. Houve efeito das estratégias de reabilitação no número total de esporos de fungos MAs nas amostras de solo coletadas em ambas as estações, cujos resultados se encontram na tabela 2.

Com exceção dos sítios RF e E16 do campo e B14 e M18 da serra, a maioria dos sítios apresentou número igual ou maior de esporos no verão do que no inverno, fato também observado para MEA e MET. Menores valores de número de esporos no verão, em alguns sítios, podem estar relacionados à sucessão vegetal, com o crescimento de espécies menos micotróficas (Francis e Read, 1994), contrariando as proposições de Janos (1980) e, ou, às condições climáticas desfavoráveis para algumas espécies de fungos MAs.

Para as amostras coletadas no inverno, o número total de esporos apresentou baixa capacidade discriminatória das estratégias de reabilitação no campo, indicando somente o efeito negativo da mineração no sítio recém-minerado. Para a serra, o menor valor foi também para o sítio recém-minerado (RM), enquanto alguns sítios (BCG6 e M18) atingiram valores significativamente iguais aos da área referência (RF), mostrando o efeito positivo da reabilitação nesta variável.

TABELA 2. Número total de esporos e número mais provável (NMP) de propágulos de fungos MAs em amostras de solo dos sítios de estudo e após multiplicação em vasos-armadilha (VA).

Sítios	Esporos 50 mL ⁻¹ de amostra de solo		VA*	NMP n ^o g ⁻¹ solo
	Inverno	Verão		
Campo				
RM	15,3b	-	327	7,5
RM-BG	-	67,0cd	280	313,3
E3	125,9a	120,7bc	218	11,4
CA4	120,6a	239,9a	546	106,3
BCG10	225,3a	217,8ab	225	240,4
E16	95,1a	40,8d	1708	4,5
BCG19	136,9a	261,3a	983	621,7
RF	150,9a	76,5cd	101	42,5
Serra				
RM	4,1d	-	952	0
RM-GG	-	75,1b	2979	39,3
BG2	128,5c	225,9ab	112	157,9
BCG6	298,7ab	383,7a	230	115,4
M10	125,4c	208,0ab	236	102,6
B14	212,4bc	149,3b	303	25,1
E16	161,7c	178,2ab	222	50,6
M18	405,0a	181,2ab	486	22,7
RF	412,3a	391,3a	419	11,2

Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância. * Sem repetição.

No verão, os maiores valores foram obtidos nos sítios BCG19, CA4 e BCG10 do campo e RF e BCG6 da serra, embora estes últimos só diferissem dos

sítios B14 e RM-GG. Portanto, houve efeito positivo da reabilitação no número de esporos, principalmente das estratégias que envolvem a utilização de cobertura vegetal com gramíneas e bracatingas em estágio avançado de desenvolvimento. Os menores valores foram dos sítios RM-BG, RF, E16 e E3 do campo e B14 e RM-GG da serra, confirmando o efeito negativo da mineração e do plantio de eucalipto nas áreas do campo. Embora não se possa generalizar, baixo número de propágulos de fungos MAs em solos com eucalipto foi também verificado por Malajczuk et al. (1981), Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira (1989), Souza (1997) e Mehrotra (1998), indicando o efeito diferenciado de espécies vegetais na esporulação destes microrganismos.

A redução dos propágulos de fungos MAs (micélio extrarradicular e esporos) devido à mineração e revolvimento do solo pode ser devido à substituição da camada superficial do solo original por material de solo de horizontes com baixo potencial de inóculo (White, Munn e Williams, 1989); à duração do armazenamento da camada superficial do solo retirada antes da mineração (White, Munn e Williams, 1989; Jasper, 1994); à exposição dos propágulos a altas temperaturas e baixa umidade através do revolvimento (Douds et al., 1995; Braumberg, Abbott e Robson, 1996); à destruição física dos propágulos, principalmente da rede micelial (Jasper, Abbott e Robson, 1992); à remoção da cobertura vegetal (Bécard e Piché, 1989; Bécard, Douds e Pfeffer, 1992), entre outros. A redução do potencial de inóculo de fungos MAs pode comprometer a revegetação nesses solos, os quais apresentam sérias limitações para o desenvolvimento das plantas.

Com relação ao número total de esporos obtidos dos vasos-armadilha após multiplicação, verificou-se que, com exceção das amostras de solo dos sítios BCG6 e BG2 da serra, nos quais houve uma pequena redução, os demais sítios apresentaram números iguais ou superiores às amostras originais. Destacaram-se as amostras dos sítios RM (não reabilitado) e E16 do campo, RM

(não reabilitado) e RM-GG da serra, nas quais se observou esporulação abundante. Este resultado é importante por mostrar que mesmo com a atividade de mineração, os esporos se mantêm viáveis e com potencial de multiplicação caso as condições sejam adequadas. A mesma explicação poderia ser usada para o sítio E16 do campo (eucalipto 16 anos), o qual apresentou baixo número de esporos e micélio, e no qual poderia haver esporulação *in situ* caso houvesse condições adequadas, principalmente através do desenvolvimento de gramíneas no sub-bosque.

Para o NMP de propágulos de fungos MAs, os maiores valores foram obtidos nos sítios RM-BG, BCG19 e BCG10 do campo e sítios RM-GG, BCG6 e BG2 da serra, e os menores nos sítios RF, E16 e E3 do campo e RF, B14, M18 e RM-GG da serra. Verificou-se, portanto, efeito positivo de várias estratégias de reabilitação na produção de propágulos de fungos MAs, principalmente aquelas utilizando braquiária, capim-gordura e bracatinga, embora não tenha sido registrado efeito do tempo de reabilitação.

Colonização micorrízica de amostras de raízes coletadas *in situ* e de feijoeiro e caupi em vasos (bioensaio)

Houve efeito significativo das estratégias de reabilitação nesta variável, cujo comportamento pode ser visto na tabela 3.

Os valores obtidos para colonização micorrízica de espécies *in situ* foram semelhantes aos encontrados por Souza (1997). Diferentemente do observado por Walland e Allen (1987) em solos de mineração de carvão, no presente estudo esta variável discriminou os sítios de estudo no campo e serra, com os menores valores para plantas coletadas nos sítios RF e E16 do campo e sítio RM-GG da serra.

TABELA 3. Porcentagem de colonização micorrizica de raízes de espécies coletadas *in situ* e de feijoeiro e caupi (bioensaio) cultivados em amostras de solo dos sítios de estudo, coletadas no verão.

Sítios	Colonização radicular		
	Espécies <i>in situ</i>	Feijoeiro	Caupi
		%	
Campo			
RM-BG	4	58ab	23c
E3	4	25e	26c
CA4	21	64a	69a
BCG10	10	55ab	45b
E16	1	45bc	21c
BCG19	9	40cd	39b
RF	2	28de	38b
Serra			
RM-GG	2	25e	40b
BG2	5	59abc	35b
BCG6	11	54bcd	31b
M10	26	75a	63a
B14	21	40cde	31b
E16	8	35de	34b
M18	11	61ab	48ab
RF	7	46bcd	44b

Campo: RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses. E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência. Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

Várias estratégias de reabilitação contribuíram para que plantas coletadas *in situ* apresentassem colonização micorrizica maior que àquelas das áreas-referência (sítio CA4, BCG10 e BCG19 do campo e M10 e B14 da serra), principalmente aqueles sítios reabilitados com bracatinga. No entanto, a

reabilitação com eucalipto no campo (E16) mostrou efeito negativo nesta variável, apresentando também menor número total de esporos e MET, como discutidos anteriormente. Isto concorda com as observações feitas por Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira (1989) em diferentes agro e ecossistemas, no estado de Minas Gerais, por Souza (1997) em solos minerados de Poços de Caldas (MG) e por Mehrotra (1998) em solos minerados da Índia cobertos com eucalipto. Este resultado indica que o eucalipto (*E. saligna*) não é um bom hospedeiro para fungos MAs e sua utilização na revegetação de solos minerados pode reduzir a população destes microrganismos, em manejo inadequado (ex. plantio adensado e homogêneo).

Os valores de colonização micorrízica obtidos nos experimentos com espécies de feijoeiro e caupi (bioensaio) foram bem superiores àqueles apresentados pelas plantas coletadas *in situ*, provavelmente devido à remoção de fatores supressivos do solo pela correção de sua fertilidade antes da semeadura das plantas (Smith e Read, 1997) ou devido às diferenças de micotrofismo entre as espécies vegetais utilizadas. Esta correção da fertilidade do solo fez com que se obtivesse correlação significativa somente entre colonização radicular de plantas coletadas *in situ* e caupi cultivado em amostras de solo do campo ($r=0,93^{**}$). Para o campo, a maior porcentagem de colonização micorrízica das espécies de plantas-isca foi obtida quando cultivadas em amostras de solo do sítio CA4, e as menores nos sítios com eucalipto (E16 e E3). Na serra, os maiores valores foram obtidos nos sítios M10 e M18, e os menores nos sítios E16, B14 e RM-GG, confirmando novamente o efeito negativo da estratégia de reabilitação com eucalipto (*E. saligna*) nas populações de fungos MAs.

Não se obtiveram correlações significativas entre NMP e MEA, MET, número total de esporos e colonização das espécies coletadas *in situ*, concordando com os resultados obtidos por Allen e Allen (1980) em solos de mineração de carvão nos EUA e por Diaz e Honrubia (1993) em solos

minerados da Espanha. Incluindo o número de esporos presentes, o potencial de inóculo de fungos MAs pode depender de vários outros fatores como genótipo da planta hospedeira (grau de micotrofia), fatores edáficos (como teor de argila, o qual interfere negativamente na esporulação, segundo Allen e Allen, 1980) e atividade microbiana nos solos (competição). A influência do hospedeiro pôde ser confirmada nos sítios do campo com eucalipto, nos quais os baixos valores do NMP concordaram com os valores de MET, número total de esporos de fungos MAs e porcentagem de colonização radicular. Esse resultado confirma o efeito negativo do eucalipto (*E. saligna*) nos propágulos de fungos MA, cujo emprego deve ser feito com manejo adequado (ex. utilização de maior espaçamento, enriquecimento vegetal do sub-bosque, etc.), quando se objetiva reabilitação da parte microbiológica desses sistemas.

Espécies de fungos MA

A figura 2 mostra as espécies encontradas nos sítios de estudo. Foram obtidas 6 espécies de fungos: *Gigaspora* sp.1, *Gigaspora* sp.2, *Glomus occultum* Walker, *Entrophospora colombiana* Spain & Schenck, *Acaulospora scrobiculata* Trappe e *Glomus* sp.1. Este número de espécies foi semelhante ao encontrado por Kiemann, Hendrix e Maronek (1983) em solos minerados dos EUA (8 espécies), igual ao obtido por Mehrotra (1998) em solos de mineração de carvão na Índia e inferior àqueles obtidos por Souza (1997) em solos de mineração de bauxita em Poços de Caldas (11 espécies) e por Raman et al. (1993) em solos de mineração de magnesita na Índia (13 espécies), reflexo de diferentes condições edáficas, climáticas e cobertura vegetal.

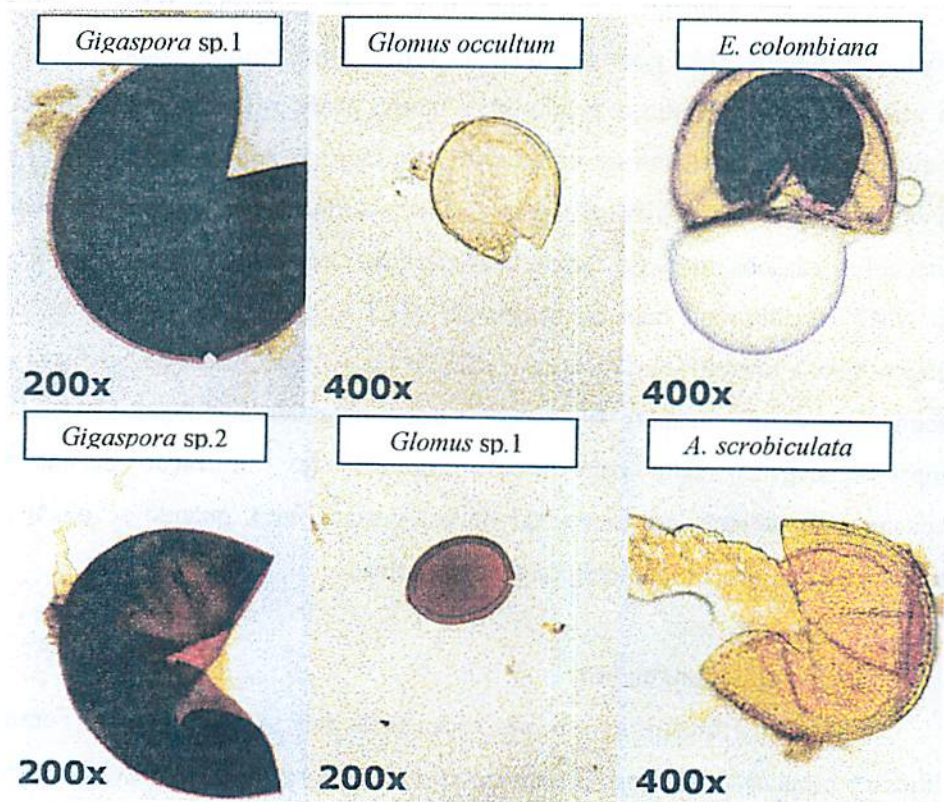


FIGURA 2. Espécies de fungos MAs obtidos das amostras de solo dos sítios de estudo. Observações em aumento de 200 ou 400x.

O efeito das estratégias de reabilitação nas espécies de fungos MAs obtidas de amostras de solo coletadas no inverno, verão e, após multiplicação em vasos-armadilha, pode ser visto nas figuras 3 e 4, respectivamente para amostras de campo e serra.

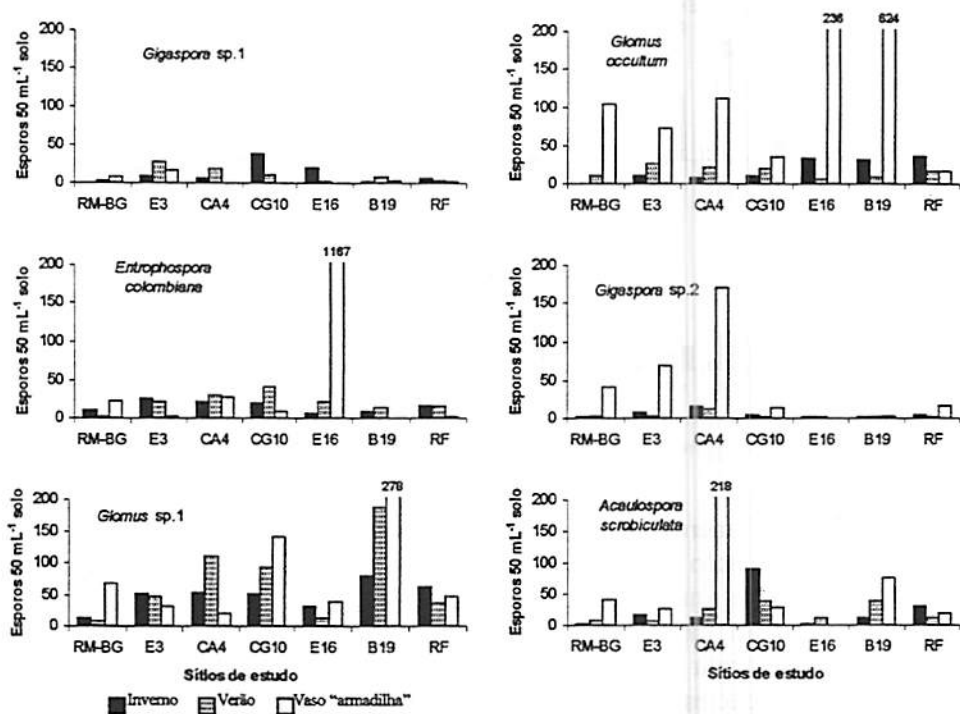


FIGURA 3. Número de esporos de fungos MAs por espécie, obtido de amostras de solo dos sítios de estudo do campo, coletadas no inverno, verão e após multiplicação em vasos-armadilha. RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas.

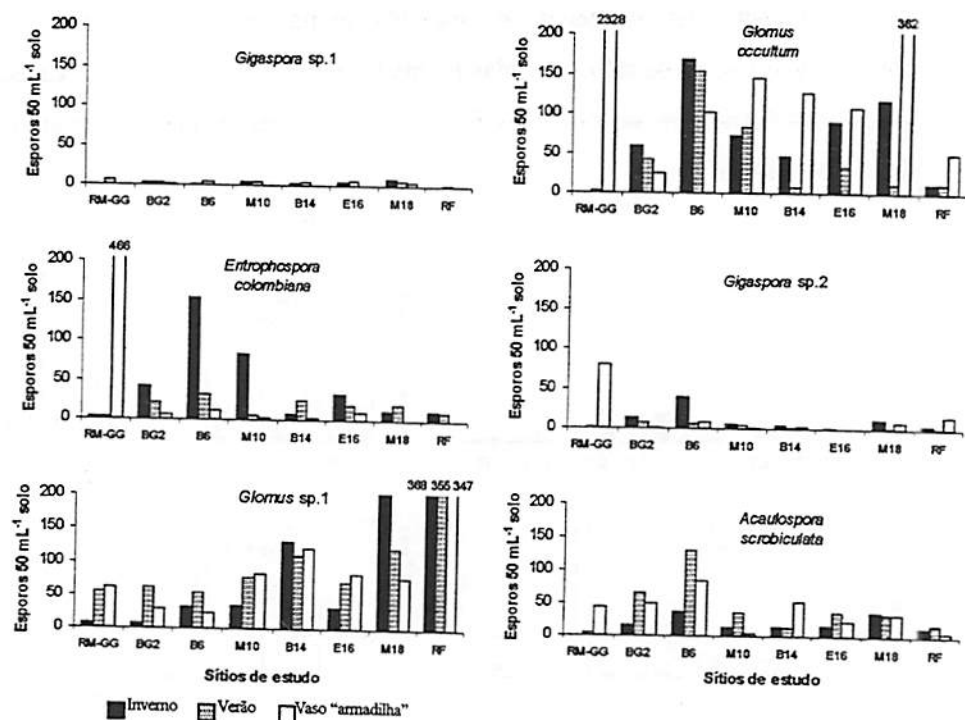


FIGURA 4. Número de esporos de fungos MAs por espécie, obtido de amostras de solo dos sítios de estudo da serra, coletadas no inverno, verão e após multiplicação em vasos-armadilha. RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; B6G6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Excetuando-se *Glomus* sp.1, em amostras de solo da serra coletadas no verão, não se verificou efeito do tempo de reabilitação nos demais tipos. Isto indica que o efeito das diferentes estratégias de reabilitação é maior na população de fungos MAs dos solos minerados do que o tempo de reabilitação. Para as amostras coletadas no inverno, somente os sítios recém-minerados (RM) do campo apresentaram perda das espécies (redução da riqueza) *Gigaspora* sp.1

e *Glomus occultum*, enquanto no verão, verificou-se menor riqueza nos sítios recém-minerados (RM-GG) e E16 da serra (eucalipto 16 anos). As espécies perdidas no verão foram *Gigaspora* sp.2 no sítio E16 e sítio recém-minerado (RM) da serra, *Gigaspora* sp.1, *Glomus occultum* e *Entrophospora colombiana* nos sítios recém-minerados do campo e serra (RM). Este resultado indica o efeito negativo da mineração na diversidade de fungos MAs e concorda com o obtido por Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira (1989) estudando o efeito do cultivo do solo na seleção de espécies de fungos MAs, e por Douds et al. (1995), avaliando o impacto do revolvimento nos propágulos de fungos MAs no solo.

Não houve perda de riqueza ou espécies nos demais sítios quando comparado às áreas-referência, indicando que os sítios estão em processo de reabilitação. No entanto, em todos estes sítios, inclusive nas áreas-referência, verificou-se dominância de espécies em ambas as épocas. No inverno, 69,8% do total de esporos coletados dos sítios de estudo pertenceram ao gênero *Glomus* Tulasne & Tulasne, 8,4% ao *Gigaspora* Gerdemann & Trappe emend. Walker & Sanders, 10,5% ao *Entrophospora* (*E. colombiana* Spain & Schenck) e 11,3% ao *Acaulospora* (*A. scrobiculata* Trappe). No verão, observou-se a mesma tendência: 66,5% pertencentes ao *Glomus*, 5,1% ao *Gigaspora*, 11,5% ao *Entrophospora* e 16,9% ao *Acaulospora*. Portanto, a seguinte ordem decrescente de dominância ou frequência foi verificada nos solos estudados para ambas as épocas: *Glomus* > *Acaulospora* > *Entrophospora* > *Gigaspora*. O gênero *Glomus* é considerado um dos mais frequentes nos ecossistemas (Stahl e Christensen, 1982; Vestberg, 1995) e solos minerados (Souza, 1997; Mehrotra, 1998; Brundrett, Abbott e Jasper, 1999), apresentando baixa especificidade ambiental.

A dominância de espécies de fungos MAs foi estudada por vários pesquisadores, sendo verificada dominância de espécies de *Acaulospora* *scrobiculata* e *Entrophospora colombiana* em solos com pH menor que 6,5 e

dos gêneros *Gigaspora* e *Glomus* em solos com maiores valores de pH (Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira, 1989; Mehrotra, 1998). Ainda, Douds et al. (1995) verificaram maior frequência de *G. occultum* em solos com pequeno revolvimento ou não cultivado (oposto ao obtido neste trabalho e em Souza, 1997), e *G. etunicatum* e *Glomus* spp. em solos revolvidos e cultivados, confirmando o efeito diferenciado dessas práticas nas populações de fungos MAs do solo.

Em resultados obtidos por Siqueira, Colozzi-Filho e Oliveira (1989) em diversos ecossistemas naturais no estado de Minas Gerais, e por Mehrotra (1998) em solos minerados e revegetados da Índia, mostram que *A. scrobiculata* e *E. colombiana* são espécies freqüentemente encontradas, indicando que estes fungos possuem mecanismos especiais de adaptação para sobreviverem às variações nos fatores bióticos e abióticos, com baixa especificidade quanto ao *habitat*. No entanto, a menor frequência de fungos do gênero *Gigaspora* nestes solos possivelmente pode indicar que os mesmos apresentam exigências mais específicas de hospedeiro-ambiente.

Para os vasos-armadilha, verificou-se dominância de *Glomus occultum* na maioria dos sítios de estudo, diferindo da dominância do ecotipo *Glomus* sp.1 nas condições originais (verão). Contrariamente, o comportamento dos tipos *Gigaspora* sp.1, *Entrophospora colombiana* e *Gigaspora* sp.2 foi diferenciado dos outros tipos, apresentando baixa esporulação nos vasos-armadilha e redução da riqueza na maioria dos sítios estudados. A utilização de amostras de solo dos sítios de estudo para multiplicação de esporos de fungos MAs nativos é considerada um dos métodos mais eficientes, segundo Brundrett, Abbott e Jasper (1999). No entanto, aparentemente, houve seleção dos fungos MAs mais competitivos presentes nas amostras de solo (ex. *Glomus*), ou daqueles mais adaptados às condições de crescimento utilizadas. As diferenças de esporulação entre os grupos de fungos MAs podem ainda refletir grandes diferenças nas suas

estratégias de sobrevivência, cujos estudos são importantes na sobrevivência e formas de dispersão nos solos minerados em reabilitação.

Com o número de esporos classificados por espécie, calculou-se o índice de diversidade de Shannon-Weaver, cujos resultados estão na tabela 4.

TABELA 4. Índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') calculado pelas espécies de fungos MAs por sítio de estudo, no inverno, verão e após multiplicação em vasos-armadilha (VA).

	Índice de diversidade (H')		
	Inverno	Verão	VA
Campo			
RM	0,9	0,5	0,9
RM-BG	-	1,6	1,6
E3	1,6	1,5	1,5
CA4	1,5	1,4	1,3
BCG10	1,5	1,4	1,1
E16	1,4	1,5	0,6
BCG19	1,2	0,8	0,9
RF	1,5	1,4	1,4
Serra			
RM	1,2	1,0	0,2
RM-GG	-	0,9	0,7
BG2	1,4	1,5	1,3
BCG6	1,3	1,4	1,2
M10	1,3	1,3	0,8
B14	1,2	0,9	1,1
E16	1,3	1,4	1,1
M18	1,2	1,1	0,8
RF	0,4	0,5	0,6

Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Houve efeito positivo das estratégias de reabilitação na diversidade de fungos MAs, com valores semelhantes ou superiores aos apresentados pelas áreas-referência. Com exceção dos sítios RM-BG e BCG19 do campo (maior e menor valor de diversidade, respectivamente no verão em relação ao inverno) e B14 e RM-GG da serra (menor valor no verão em relação ao inverno), praticamente não se verificaram diferenças nos valores dos índices nas duas épocas de amostragem de solo. O aumento do índice no sítio RM-BG do campo é devido ao fato do mesmo ter sido cultivado com braquiária e feijão-guandu, entrando em processo de reabilitação quando da segunda amostragem. A presença de plantas estimula a esporulação de fungos MAs e contribui para o aumento de sua diversidade em solos minerados (Mehrotra, 1998). Este comportamento não foi obtido no sítio recém-minerado da serra (RM) possivelmente pela menor fertilidade destes solos (Tabela 4 do capítulo 2), a qual atua direta (Siqueira, Hubbell e Mahmud, 1984) ou indiretamente sobre os propágulos dos fungos através do menor desenvolvimento das plantas (Bécard, Douds e Pfeffer, 1992; Mehrotra, 1998).

Comparando os valores do índice de diversidade de Shannon-Weaver obtidos nas amostras de solo coletadas no verão com os valores das amostras após 13 meses de multiplicação em vasos-armadilha, verificou-se que, com exceção do sítio RM (recém-minerado e não reabilitado do campo), não houve aumento de diversidade em nenhum outro sítio com a utilização dos vasos-armadilha. Pelo contrário, nas condições de multiplicação, houve redução de diversidade nos sítios BCG10 e E16 do campo, RM (recém-minerado e não reabilitado da serra), M10, E16 e M18 da serra, com ausência de esporulação de alguns tipos (A, C, E e G) e dominância de outros (B e FH). Este resultado indica que, *in situ* e com condições semelhantes de esporulação, poderia não haver aumento da diversidade de fungos MAs. No entanto, através da utilização de vasos-armadilha, pôde-se verificar que se manteve o ganho de diversidade

proporcionado pela reabilitação dos solos, com a maioria dos sítios apresentando valores iguais ou superiores aos apresentados nas áreas-referência.

Para aumentar a sobrevivência, diversidade e funcionalidade de fungos MAs nos solos minerados pode-se optar pela inoculação (Silva, Souza e Franco, 1996; Saggin Júnior e Lovato, 1999) e, ou, melhoria das condições edáficas ou de vegetação (Fox et al., 1991; Jasper, 1994). Alguns pesquisadores avaliaram a eficiência simbiótica de fungos MAs nativos de solos minerados e, ou, exógenos, e verificaram que os resultados nem sempre são satisfatórios e que muitos estudos são ainda necessários para indicação dos simbiontes adequados para revegetação destes solos, como demonstrado por vários pesquisadores em diferentes situações (Tótola, 1994; Diaz e Honrubia, 1995; Enkhtuya, Rydlová e Vosátka, 2000).



3.2 Eficiência de populações de fungos MAs

A tabela 5 mostra a matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência de populações de fungos MAs em feijoeiro através do índice relativo de produção em relação à testemunha não inoculada (IR-MSPA), e sua respectiva colonização micorrízica. Houve efeito significativo da inoculação de fungos MAs nativos de cada sítio na produção de MSPA e colonização micorrízica do feijoeiro.

O efeito positivo das populações de fungos MAs na MSPA foi comprovado pelas correlações significativas entre esta variável e a colonização micorrízica do feijoeiro ($r=0,88^{**}$ para campo e $r=0,73^*$ para serra). Os maiores índices relativos de produção de MSPA de feijoeiro foram obtidos com a inoculação de esporos do sítio BG2 da serra e de sítios com bracatinga (BCG10 do campo e BCG6 da serra) e BG2 da serra, com valores acima dos observados em plantas inoculadas com esporos obtidos das áreas-referência (RF), e com eficiência simbiótica semelhante a do fungo MA *G. etunicatum* (Figura 5).

TABELA 5. Matéria seca da parte aérea (MSPA), índice relativo de produção de MSPA (IR-MSPA) por feijoeiro inoculado com esporos de fungos MAs nativos dos sítios de estudo e respectiva colonização micorrízica.

	MSPA	IR-MSPA	Colonização micorrízica
	g planta ⁻¹		%
Campo			
RM-BG	1,04b	122,4	26b
E3	0,85b	100	0d
CA4	0,59b	69,4	8c
BCG10	1,74a	204,71	47a
E16	0,85b	100	0d
BCG19	0,83b	97,6	11c
RF	0,82b	96,5	0d
Serra			
RM-GG	0,99c	116,5	0c
BG2	3,63a	427,1	45a
BCG6	2,54b	298,8	64a
M10	1,23c	144,7	48a
B14	0,99c	116,5	0c
E16	1,14c	134,1	0c
M18	1,35c	158,8	9b
RF	0,82c	96,5	0c
T	0,85	100	0
GE	3,47	408,2	22

IR-MSPA: produção de MSPA em relação à produção pela testemunha (T), considerada 100. Campo: RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

T (testemunha, sem inoculação) e GE (inoculado com *Glomus etunicatum*). Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem estatisticamente por Duncan a 5% de significância.

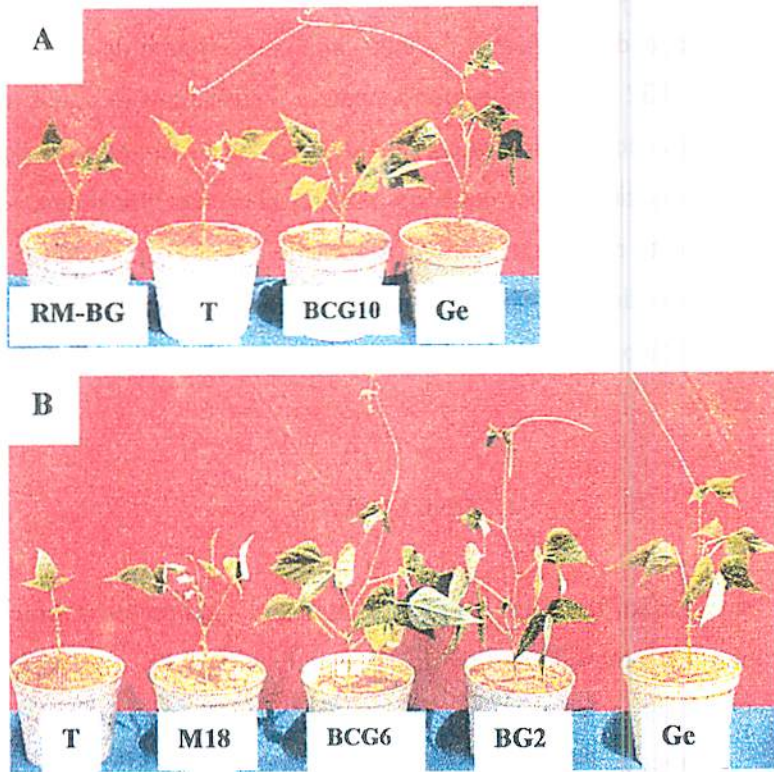


FIGURA 5. Feijoeiro inoculado com populações eficientes de fungos MAS nativos de sítios do campo (A) e serra (B), comparado com a inoculação de *Glomus etunicatum* (Ge) e testemunha sem inoculação (T). Campo: RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu 6 meses; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos. Serra: BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos.

Apesar das semelhanças de MSPA, através do IR-MSPA pôde-se discriminar os efeitos diferenciados das estratégias de reabilitação, sendo positivas na seleção de populações de fungos MAS eficientes para o feijoeiro aquelas que envolvem a utilização de gramíneas (BCG10-capim-gordura, RM-BG e BG2 braquiária) e bracatingas (BCG10, BCG6, M18, M10). Houve

incremento de 198,8 e 327,1% na produção de MSPA (em relação à testemunha não inoculada), quando o feijoeiro foi inoculado com esporos de fungos nativos dos sítios B6 e BG2 da serra, respectivamente. Verificaram-se ainda, maiores valores de colonização micorrízica em plantas inoculadas com esporos coletados em amostras destes sítios, com destaque para aqueles com bracatinga, a qual é considerada eficiente na recuperação da fertilidade e microbiota do solo, devido à grande produção de serapilheira e incorporação de N ao solo, quando em simbiose com rizóbio (Maschio, Maceda e Ramos, 1990; Maschio, Scalzo e Gaiad, 1992).

4 CONCLUSÕES

A reabilitação dos solos minerados utilizando gramíneas e bracatingas como estratégias promove aumento do potencial de inóculo e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares, com surgimento de populações de alta eficiência simbiótica em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). No entanto, a reabilitação utilizando eucalipto (*E. saligna*), em plantio adensado e homogêneo, tem efeito negativo nas populações de fungos MAs, com redução no número de esporos, micélio extrarradicular ativo e total e capacidade de colonização micorrízica.

A seguinte ordem decrescente de frequência de fungos MAs foi encontrada nos solos das áreas mineradas: *Glomus* sp. > *Acaulospora scrobiculata* > *Entrophospora colombiana* > *Gigaspora* sp.

O efeito da cronossequência de reabilitação na população de fungos MAs somente ocorreu para micélio extrarradicular total, indicando que as estratégias de reabilitação dos solos são mais importantes que a idade de reabilitação na população destes microrganismos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, E.B.; ALLEN, M.F. Natural re-establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizae following stripmine reclamation in Wyoming. *Journal of Applied Ecology*, Oxford, v.17, n.1, p.139-147, Apr. 1980.
- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.63-94.
- BÉCARD, G.; DOUDS, D.D.; PFEFFER, P.E. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.58, n.3, p.821-825. Mar. 1992.
- BÉCARD, G.; PICHE, Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.55, n.9, p.2320-2325. Sept. 1989.
- BEEVER, R.E.; BURNS, D.J.W. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. In: WOOLHOUSE, H.W. *Advances in botanical research*. London, Academic Press, 1980. 286p.
- BRAUNBERG, P.G.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi after wetting and drying. *The New Phytologist*, Oxford, v.134, n.4, p.673-684, Dec. 1996.
- BRUNDRETT, M.C.; ABBOTT, L.K.; JASPER, D.A. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. 1. Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. *Mycorrhiza*, Berlin, v.8, n.6, p.305-314, 1999.
- BRUNDRETT, M.C.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T.; MALAJCZUK, N. *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Canberra: ACIAR, 1996. 374p.
- DIAZ, G.; HONRUBIA, M. Effect of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. *Biologia Plantarum*, Dordrecht, v.37, n.1, p.121-129, 1995.

- DIAZ, G.; HONRUBIA, M. Infectivity of mine soils from southeast Spain. 2. Mycorrhizal population levels in spoilt sites. *Mycorrhiza*, Berlin, v.4, n.2, p.85-88, Dec. 1993.
- DOUDS, D.D.; GALVEZ, L.; JANKE, R.R.; WAGONER, P. Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v.52, n.2/3, p.111-118, Feb. 1995.
- ENKHTUYA, B.; RYDLOVÁ, J.; VOSÁTKA, M. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.14, n.3, p.201-211, May 2000.
- FOX, R.L.; DE LA PENA, R.S.; GAVENDA, R.T.; HABTE, M.; HUE, N.V.; IKAWA, H.; JONES, R.C.; PLUCKNETT, D.L.; SILVA, J.A.; SOLTANPOUR, P. Amelioration, revegetation, and subsequent soil formation in denuded bauxitic materials. *Allertonia*, Lawai, v.6, n.2, p.128-184, Jan. 1991
- FRANCIS, R.F.; READ, D.J. The contributions of mycorrhizal fungi on the determination of plant community structure. *Plant and Soil*, The Hague, v.159, n.1, p.11-25, Feb. 1994.
- FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. de. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.897-903, May/June 1997.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, Cambridge, v. 46, n.2, p.235-244, July 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, Oxford, v.84, n.3, p.484-500, Mar. 1980.
- GOULD, A.B.; HENDRIX, J.W.; FERRISS, R.S. Relationship of mycorrhizal activity to time following reclamation of surface mine land in western Kentucky. I. Propagule and spore population densities. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.74, n.2, p.247-261, Feb. 1996.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.187-294.
- JANOS, D.P. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotropica*, St. Louis, v.12, p.56-64, June 1980.

- JASPER, D.A. Management of mycorrhizas in revegetation. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (eds). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1994. p.211-219.
- JASPER, D.A.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Soil disturbance in native ecosystems-the decline and recovery of infectivity of VA mycorrhizal fungi. In: READ, D.J.; LEWIS, D.H.; FITTER, A.H.; ALEXANDER, L.J. (eds). Mycorrhizas in Ecosystems. Wallingford: CAB International, 1992. p.151-155.
- JASPER, D.A.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. The survival of infective hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in dry soil: an interaction with sporulation. *The New Phytologist*, Oxford, v.124, n.3, p.473-479, July 1993.
- JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (co-eds). Mycorrhizae in sustainable agriculture. Madison, 1992. p.71-99.
- KABIR, Z.; O'HALLORAN, I.P.; FYLES, J.W.; HAMEL, C. Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant and Soil*, The Hague, v. 192, n.2, p.285-293, May 1997.
- KABIR, Z.; O'HALLORAN, I.P.; WIDDEN, P.; HAMEL, C. Vertical distribution of arbuscular mycorrhizal fungi under corn (*Zea mays* L.) in no-till and conventional tillage systems. *Mycorrhiza*, Berlin, v.8, n.1, p.53-55, July 1998.
- KIERNAN, J.M.; HENDRIX, J.W.; MARONEK, D.M. Endomycorrhizal fungi occurring on orphan strip mines in Kentucky. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.61, n.6, p.1798-1803, June 1983.
- KISHINEVSKY, B.D.; LOBEL, R.; GURFEL, D.; NEMAS, C. Soil fumigation with methyl-bromide as a means of increasing the occurrence of the inoculum strain in peanut nodules. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.9, p.845-848, Sept. 1992.
- MALAJCZUK, N.; LINDERMAN, R.G.; KOUGH, J.; TRAPPE, J.M. Presence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Eucalyptus* spp. and *Acacia* sp. and their absence in *Banksia* sp. after inoculation with *Glomus fasciculatus*. *The New Phytologist*, Oxford, v.87, n.4, p.567-572, Apr. 1981.
- MASCHIO, L.M.A.; MACEDA, A.; RAMOS, A. Fungos em sementes de espécies florestais com potencial agrossilvicultural no Paraná. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão.

- Anais... Campos do Jordão: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. v.3, p.555-564.
- MASCHIO, L.M.A.; SCALZO, M.S.; GAIAD, S. Bracatinga (*Mimosa scabrella*), eucalipto (*Eucalyptus viminalis*) e pinus (*Pinus taeda*) na recuperação da biodiversidade a nível microbiológico, de solos degradados. In: CONGRESSO NACIONAL DE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, Manaus. Anais... Manaus: INPA, 1992. p.457-462.
- McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H. Winter survival of extraradical hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.12, n.1, p.41-50, Apr. 1999.
- MEHROTRA, V.S. Arbuscular mycorrhizal associations of plants colonizing coal mine spoil in India. *Journal of Agricultural Science*, Cambridge, v.130, n.2, p.125-133, Mar. 1998.
- MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. I. Método empregado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.23, n.1, p.53-58, jan./mar. 1999.
- MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. The application of VA Mycorrhizae to ecosystem restoration and reclamation. In: ALLEN, M.F. (ed). *Mycorrhizal functioning*. New York: Chapman and Hall, 1992a. p.438-467.
- MILLER, R.M.; JASTROW, J.D. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison: ASA, 1992b. p.29-44. (American Society of Agronomy, 54)
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P.; WHEELER, W.W. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon*, New York, v.48, p.491-528, 1993.
- PEREIRA, E.G.; LACERDA, A.M.; LIMA, A.S.; MOREIRA, F.M.S.; CARVALHO, D.; SIQUEIRA, J.O. Genotypic, phenotypic and symbiotic diversity amongst rhizobia isolates from *Phaseolus vulgaris* L. growing in the Amazon Region. In: PEDROSAS, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (eds) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000. p.199.
- PFLEGER, F.L.; STEWART, E.L.; NOYD, R.K. Role of VAM fungi in mine land revegetation. In: PFLEGER, F.L.; LINDERMAN, R.G. (eds). *Mycorrhizae and plant health*. MN: The American Phytopathological Society, 1994. p.47-82.

- PHILLIPS, J.M.; HAYMANN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of British Mycological Society*, Cambridge, v.55, p.158-61, 1970.
- RAMAN, N.; NAGARAJAN, N.; GOPINATHAN, S.; SAMBANDAN, K. Mycorrhizal status of plant species colonizing a magnesite mine spoil in India. *Biology and Fertility of Soils*, Heidelberg, v.16, n.1, p.76-78, 1993.
- SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; LOVATO, P.E. Aplicação de micorrizas arbusculares na produção de mudas e plantas micropropagadas. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa: UFLA/DCS, 1999. p.725-773.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. *The mathematical theory of communication*. Urbana: University of Illinois, 1949.
- SILVA, E.M.R.; SOUZA, F.A.; FRANCO, A.A. The establishment of arbuscular mycorrhizal fungi associated with nodulated legume trees in land reclamation in the Amazon and Atlantic forest regions of Brazil. In: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCORRHIZAE*, 1., 1996, Berkeley. *Program and Abstracts...* Berkeley: University of California, 1996. p.109.
- SIQUEIRA, J.O.; CARNEIRO, M.A.C.; ROSADO, S.C.S.; DAVIDE, A.C.; CURL, N. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v.107, n.1/3, p.241-252, Aug. 1998.
- * SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. de. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbuscular em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.24, n.12, p.1499-1506, dez. 1989.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; MAHMUD, A.W. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, The Hague, v.76, n.1/3, p.115-124, 1984.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd.ed. London: Academic Press, 1997. 605p.

- SOUZA, F.A. de; GUERRA, J.G.M. Emprego da técnica do número mais provável (NMP) no estudo de populações de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Seropédica: EMBRAPA/CNPAB, 1998. 34p. (Circular Técnica, 2).
- SOUZA, J.A. Avaliação das estratégias de recuperação de áreas degradadas pela mineração de bauxita em Poços de Caldas (MG). Lavras: UFLA, 1997. 104p. (Tese - Doutorado em Agronomia).
- STAHL, P.D.; CHRISTENSEN, M. Mycorrhizal fungi associated with *Boutelouma* and *Agropyron* in Wyoming sagebrush grasslands. *Mycologia*, New York, v.74, p.877-885, 1982.
- TÓTOLA, M.R. Eficiência de fungos MVA nas espécies cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e angico vermelho (*Piptadenia peregrina* Benth) em estéril de mineração de bauxita. Viçosa: UFV, 1994. 61p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola).
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology*, Washington, v.79, n.6, p.2082-2091, Sept. 1998.
- VESTBERG, M. Occurrence of some Glomales in Finland. *Mycorrhiza*, Berlin, v.5, p.329-336, 1995.
- WALLAND, M.E.; ALLEN, E.B. Relationships between VA mycorrhizal fungi and plant cover following surface mining in Wyoming. *Journal of Range Management*, v.40, n.3, p.271-276, May 1987.
- WHITE, J.A.; MUN, L.C.; WILLIAMS, S.E. Edaphic and reclamation aspects of vesicular-arbuscular mycorrhizal in Wyoming Red Desert soils. *Soil Science Society of America Journal*, Madison, v.53, n.1, p.86-90, Jan./Feb. 1989.
- WOOMER, P.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.54, n.7, p.1112-1116, July 1988.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas: UFPel. Departamento de Matemática e Estatística, 1984. 151p.

CAPÍTULO 5

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS MAs COMO INDICADORES DA REABILITAÇÃO DE SOLOS EM ÁREAS DE MINERAÇÃO DE BAUXITA

RESUMO

MELLONI, R. Bactérias diazotróficas e fungos MAs como indicadores da reabilitação de solos em áreas de mineração de bauxita. Lavras: UFLA, 2001. Cap. 5. 31p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)*

As avaliações do impacto da mineração e de diferentes estratégias de reabilitação têm sido feitas através do grau de cobertura do solo e diversidade florística. No entanto, a sua utilização é questionável, uma vez que a reabilitação ocorrida na superfície pode não ser acompanhada pela reabilitação do solo. Pela diversidade e dinâmica e por estarem continuamente mudando e se adaptando às alterações ambientais, os microrganismos do solo podem representar indicadores sensíveis de mudanças, apresentando grande potencial de utilização nestes estudos. Dentre os grupos de microrganismos-chave de ecossistemas, destacam-se os microrganismos diazotróficos e fungos micorrízicos arbusculares, os quais possibilitam a incorporação de N ao sistema, otimizam a absorção de nutrientes e água, e contribuem para a agregação do solo e sustentabilidade de ecossistemas. Apesar destes grupos apresentarem potencial de utilização como indicadores da qualidade do solo, não há estudos relacionando-os à reabilitação de solos minerados. No presente trabalho, discute-se a utilização destes microrganismos na avaliação de diferentes estratégias e cronossequências de reabilitação de solos de mineração de bauxita, através da caracterização *in situ* da reabilitação e análises de agrupamento por dendogramas de similaridade e componentes principais (PCA).

* Comitê de Orientação: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Orientadora), José Oswaldo Siqueira - UFLA

NITROGEN FIXING BACTERIA AND AM FUNGI AS INDICATORS OF SOIL REHABILITATION IN BAUXITE MINING AREAS

ABSTRACT

MELLONI, R. Nitrogen fixing bacteria and AM fungi as indicators of soil rehabilitation in bauxite mining areas. Lavras: UFLA, 2001. Chap. 5. 31p. (Thesis - Doctorate in Soil and Plant Nutrition)*

The evaluations of mining impact and of different rehabilitation strategies have been done through soil covering indexes and plant diversity. However, its utilization is uncertain, because the rehabilitation occurred on soil surface may not be followed by soil rehabilitation. The soil microorganisms are very changeable and adaptive to environmental alterations, so that they can be used as indicators of these changes, showing high potential for these studies. Among the key microbial groups in ecosystems, the diazotrophic bacteria and AM fungi are very important, because they are involved in nitrogen incorporation to systems, increase of nutrient and water absorption by plants, and contribution to soil aggregation and ecosystem sustainability. Despite these groups present high potential to be used as soil quality indicators, there are no studies related to rehabilitation of bauxite mining soils. In this work, the utilization of these microorganisms for the evaluation of different rehabilitation strategies and chronosequences was discussed, the evaluation being done through *in situ* characterization of rehabilitation, and similarity dendograms and principal component analysis (PCA) methodologies.

* Guidance Committee: Fátima M.S. Moreira - UFLA (Major Professor), José Oswaldo Siqueira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

A degradação causada pela mineração resulta do impacto do revolvimento e retirada do solo, da perda de vegetação e de formas de vida subterrânea, além da oxidação da matéria orgânica, alterações nas propriedades físicas do solo e perda da atividade biológica (Fresquez, Aldon e Lindermann, 1986; Franco et al., 1995).

A revegetação é a principal prática para recompor e proteger o solo, evitando a poluição das águas, promovendo o fluxo de energia e nutrientes no ecossistema (Siqueira et al., 1994) e o retorno da vida selvagem (Griffith, 1980). O grau de sucesso da reabilitação é extremamente variável em função das condições físicas, químicas e biológicas do local e das estratégias adotadas no processo. A porcentagem de cobertura vegetal e a diversidade florística, que são expressões da estrutura e organização biológica dos ecossistemas, como também a fauna silvestre, têm sido empregadas como indicadores do grau de reabilitação da área (Brower e Zar, 1977). Estes parâmetros, além de outros, são de fato indicadores da complexidade e estabilidade do novo ecossistema, mas a adequabilidade de sua utilização nos estudos de reabilitação de solos minerados é questionável, uma vez que pode não haver relação entre características da vegetação e a reabilitação do solo (Skouse, Johnson e Garbutt, 1994; Ruivo, 1998).

No entanto, variáveis microbiológicas do solo são sensíveis às alterações do ambiente subterrâneo, as quais são induzidas pelas alterações ocorridas acima da superfície, como a presença, tipo e diversidade de vegetação. Como a vegetação e seus efeitos sobre o solo alteram com a idade do ecossistema ou tempo de reabilitação, estas variáveis poderão constituir-se bons indicadores da reabilitação. Assim, pela diversidade e dinâmica e por estarem continuamente mudando e se adaptando às alterações ambientais, os microrganismos

representam indicadores sensíveis a mudanças no solo, oriundas de alterações no seu manejo (Doran e Zeiss, 2000; van Bruggen e Semenov, 2000), e também no tipo de cobertura vegetal (Prasad, Basu e Behera, 1994).

Dentre os grupos de microrganismos considerados chave para o desenvolvimento ecofuncional dos ecossistemas, destacam-se as bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares. Estes microrganismos podem aumentar a capacidade das plantas hospedeiras sobreviverem em condições adversas ou sub-ótimas, incorporando nitrogênio (Bashan e Holguin, 1997; Franco e Faria, 1997), otimizando a utilização de nutrientes e água (Abbott e Robson, 1991; Smith e Read, 1997), contribuindo para a estruturação do solo (Oades, 1993; Tisdall, 1994) e para a estabilização e sustentabilidade do ecossistema (Johnson e Pflieger, 1992; Franco e Faria, 1997).

Apesar destes grupos-chave de microrganismos apresentarem potencial de utilização como indicadores da qualidade do solo (Doran e Zeiss, 2000; van Bruggen e Semenov, 2000), não há estudos relacionando-os à qualidade ou reabilitação de solos minerados. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial de utilização de variáveis microbiológicas relacionadas a fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas como indicadores de reabilitação na avaliação de áreas de mineração de bauxita, submetidas a diferentes estratégias e idades de reabilitação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os sítios de estudo pertencem à empresa de mineração ALCOA Alumínio S/A, localizada no município de Poços de Caldas (MG). A descrição dos sítios e forma de amostragem dos solos sob diferentes estratégias e cronossesquências de reabilitação se encontram no capítulo 2. As amostragens de

solo para estudo das populações de rizóbios, fungos MAs e diazotróficos endofíticos foram realizadas em março de 1999 (verão), excetuando-se aquelas para estudos do número mais provável de propágulos de fungos MAs, as quais foram realizadas em dezembro de 1999 (primavera).

Neste capítulo, as seguintes variáveis microbiológicas foram estudadas, com resultados discutidos nos capítulos 2, 3 e 4, respectivamente:

a) Rizóbios: utilização de caupi cv. Mulato (*Vigna unguiculata* L. Walp) como espécie de planta-isca para estudos de nodulação (número, matéria fresca e atividade de nódulos radiculares, segundo Dilworth, 1966); índice de diversidade de Shannon-Weaver (Shannon e Weaver, 1949) dos isolados obtidos.

b) Diazotróficos endofíticos: densidade de *Azospirillum* spp., *A. amazonense* e *Herbaspirillum* spp. obtida através da diluição de amostras de solo e meios semi-sólidos NFb (Döbereiner, 1980), Fam (Magalhães, 1983) e JNFb (Baldani et al., 1992).

c) Fungos MAs: comprimento de micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET) de fungos (Melloni e Cardoso, 1999); número total de esporos (Gerdemann e Nicolson, 1963); de espécies (Morton, Bentivenga e Wheeler, 1993); índice de diversidade de Shannon-Weaver (Shannon e Weaver, 1949) das espécies obtidas; número mais provável de propágulos (Souza e Guerra, 1998) e colonização micorrízica de plantas coletadas *in situ* e de caupi, no bioensaio (Phillips e Haymann, 1970; Giovanetti e Mosse, 1980).

Para avaliação da reabilitação *in situ* e cálculo de um índice de reabilitação dos sítios de estudo, utilizou-se uma planilha desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Solo da UFLA e cinco avaliadores, com base em características de solo e vegetação discutidas em Romig, Garlynd e Harris (1996). As notas foram calibradas com as áreas-referência, sendo para estas atribuídos os maiores valores. Assim, este índice foi calculado posteriormente à

atribuição de notas de 0 (pior) a 5 (melhor ou referência) para as seguintes características: a) solo (erosão, pedregosidade e fauna), b) vegetação (índice de cobertura, índice de diversidade, porte/estratificação, vigor da vegetação, quantidade, estado de decomposição e incorporação da serapilheira, sucessão da vegetação) e c) outros (presença de fauna silvestre). Os valores foram ponderados em função da importância atribuída à reabilitação e à condição da área-referência (erosão 100% da nota atribuída, pedregosidade 50%, fauna 50%, índice de cobertura 100%, índice de diversidade 80%, porte/estratificação 50%, vigor da vegetação 100%, quantidade de serapilheira 100%, estado de decomposição da serapilheira 100%, incorporação da serapilheira 70%, sucessão na vegetação 100%, presença de fauna silvestre 50%), sendo posteriormente recalculados e, finalmente, considerando os valores obtidos nas áreas-referência iguais a 100.

Os atributos físicos (areia, silte e argila) e químicos (C, N, P, Al, pH, SB e t) foram obtidos segundo EMBRAPA (1997). Utilizando-se as médias dos atributos físicos, químicos e microbiológicos (número e atividade de nódulos de caupi, diversidade de isolados de rizóbio, colonização micorrízica de caupi, MEA, MET, número total de esporos, diversidade de fungos MAs, NMP de propágulos de fungos MAs e densidade de microrganismos diazotróficos endofíticos) das amostras de solo sob diferentes estratégias de reabilitação, procedeu-se à análise de componentes principais (PCA) através do programa PC-ORD 3.12 (McCune e Mefford, 1997). Esta técnica é freqüentemente utilizada para reduzir o número de variáveis totais, tomando a análise dos dados mais eficiente e mantendo a maioria ou todas as informações originais (Reyment e Jöreskog, 1993).

Os sítios estudados e as variáveis foram transformados em coordenadas que correspondem a sua projeção nos eixos de ordenação, ou autovetores. Esta projeção representa o peso de cada sítio ou variável sobre o eixo, o qual é

equivalente ao grau de correlação do sítio ou variável com o eixo em questão. Nos diagramas, os sítios do presente estudo foram representados por triângulos, que indicam sua correlação com os eixos, enquanto as variáveis foram representadas por segmentos, indicando a direção do gradiente máximo das mesmas. Um ponto qualquer plotado no diagrama pode ser relacionado a cada segmento através do tracejamento de uma perpendicular partindo do final do segmento até o eixo, e a extensão do eixo a que o segmento se refere dá uma indicação do estreitamento da correlação. Os sítios com projeção perpendicular próxima ou acima da ponta do segmento são mais positivamente correlacionados e influenciados pela variável considerada, enquanto aqueles opostos são influenciados em menor intensidade.

As variáveis microbiológicas obtidas com as amostras de solo coletadas no verão e o índice de reabilitação avaliado *in situ* foram agrupados através de dendogramas de similaridade, utilizando o método Complete Linkage e Distância Euclidiana (Everitt, 1993), pelo programa STATISTICA 5.0.

NTSYS 9.01

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos índices de reabilitação (IR), calculados pela avaliação *in situ* de aspectos ligados ao solo e vegetação dos sítios do campo e serra, estão na tabela 1.

Na avaliação *in situ* da reabilitação dos sítios de estudo, verificou-se que no campo alguns sítios (BCG19, BCG10, E16 e E3) apresentaram maior grau de reabilitação do que a área-referência (RF), que possui baixa diversidade vegetal, baixa porcentagem de cobertura vegetal (susceptível a processos erosivos) e baixa produção primária. Ao contrário, a referência da serra apresentava diversidade vegetal mais elevada e alto índice de cobertura do solo (redução de

processos erosivos) e maior produção primária. Os sítios da serra que apresentaram índices de reabilitação mais elevados seguiram uma cronossequência de reabilitação, como segue: 92, 86, 77 e 73% para M10, E16, B14 e M18, em relação à referência (100%).

TABELA 1. Índice médio de reabilitação (IR), obtido conforme características de solo e vegetação *in situ*.

Sítios	IR	Sítios	IR
Campo		Serra	
RM	0	RM	0
RM-BG	83	RM-GG	47
E3	111	BG2	52
CA4	77	BCG6	53
BCG10	107	M10	92
E16	104	B14	77
BCG19	129	E16	86
RF	100	M18	73
		RF	100

Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Os dendogramas de similaridade construídos de acordo com as características de solo e vegetação utilizadas para a avaliação *in situ* da reabilitação são mostrados na figura 1.

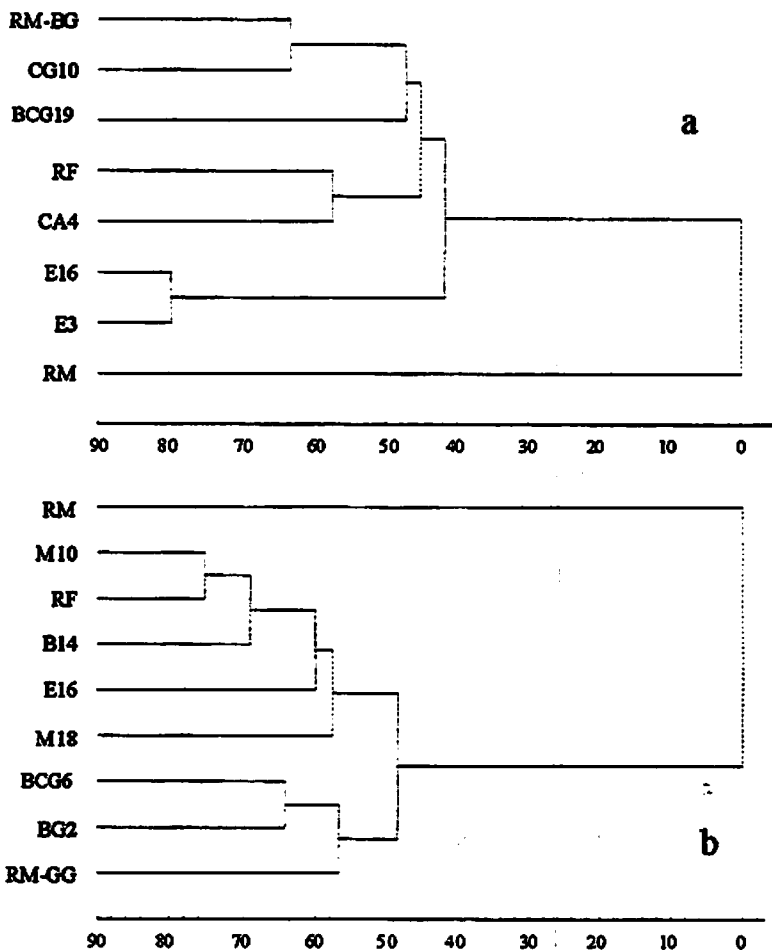


FIGURA 1. Dendrogramas de similaridade construídos conforme o índice de reabilitação, avaliado com características de solo e vegetação *in situ*, no campo (a) e serra (b). Campo: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-BG recém-minerado e com braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas. Serra: RM recém-minerado e não reabilitado; RM-GG recém-minerado e com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Para o campo, houve alta similaridade (80%) entre os sítios com eucalipto (E16 e E3), indicando não haver relação entre o grau de reabilitação e a idade do sítio. Houve agrupamento de sítios em diferentes tempos de reabilitação, como o sítio RM-BG com 6 meses e sítio BCG10 com 10 anos, e o sítio RF (referência) com o sítio CA4 (4 anos de reabilitação). Este resultado indica que as estratégias de reabilitação foram mais importantes nas características avaliadas do que a própria cronosequência de reabilitação dos solos minerados. Estudos realizados por Skouse, Johnson e Garbutt (1994), em solos de mineração de carvão nos EUA, e por Ruivo (1998), em solos de mineração de bauxita no Brasil (Amazônia Oriental), também mostraram não haver relação entre idade de reabilitação e características da vegetação. Para os sítios da serra, houve a formação de dois grandes grupos a 50% de similaridade, sendo um grupo contendo sítios em maior tempo de reabilitação (M10, RF, B14, E16 e M18) e outro contendo aqueles em reabilitação há menos tempo (BCG6, BG2 e RM-GG), indicando, de certa forma, efeito da cronosequência de reabilitação dos solos da serra.

As figuras 2 e 3 mostram os dendogramas de similaridade dos sítios do campo e serra, respectivamente, construídos de acordo com as variáveis microbiológicas (número, matéria fresca e atividade de nódulos de caupi, diversidade de isolados de rizóbio de caupi, colonização radicular de caupi e plantas *in situ*, MEA, MET, número total de esporos e ecotipos, diversidade de ecotipos, NMP de propágulos de fungos MAs e densidade de diazotróficos endofíticos).

Para o campo (Figura 2), nenhum sítio apresentou similaridade com a área-referência, sendo que todos foram aproximadamente 35% similares entre si. Os sítios RM-BG, CA4, BCG10 e E3 apresentaram-se 65% similares, enquanto aproximadamente 85% de similaridade foi registrada entre os sítios E16 (eucalipto com 16 anos) e o sítio recém-minerado (RM). No entanto, deve-se

atentar ao fato de que as amostras do sítio RM receberam calcário e fertilizantes, antes da instalação dos experimentos em casa de vegetação para determinação do número, matéria fresca e atividade de nódulos de caupi, diversidade de isolados de rizóbio de caupi e colonização radicular de caupi. Isto certamente influenciou o agrupamento, podendo-se afirmar que o mesmo ocorreu devido à fertilidade do solo e não às variáveis microbiológicas estudadas. Pelo agrupamento, verificou-se que os sítios estão em processo de reabilitação, mas apresentam características microbiológicas diferentes daquelas apresentadas pelas áreas-referência (RF). Não se verificou efeito da cronossequência da reabilitação em sítios do campo, visto o agrupamento de sítios em diferentes tempos de reabilitação. Assim como observado para o dendograma construído com base nas características de vegetação e solo *in situ* (Figura 1) do campo, pode-se verificar que as estratégias de reabilitação foram mais importantes na recuperação das características microbiológicas do que a própria cronossequência de reabilitação desses solos.

Para a serra (Figura 3), cerca de 60% de similaridade foi registrada para os sítios M10, M18, BCG6, BG2 e E16, enquanto os demais sítios, inclusive a referência, foram aproximadamente 50% similares entre si e 100% dissimilares com o grupo anterior. Novamente o efeito da correção da fertilidade do solo das amostras do sítio RM, assim como observado para o campo, pode ter afetado o agrupamento. No entanto, verificou-se que através das variáveis microbiológicas, 60% de similaridade foi registrada entre os sítios reabilitados há cerca de 2 anos (BG2) com aqueles de 6, 10, 16 e 18 anos (sítios BCG6, M10, E16 e M18, respectivamente), indicando o efeito positivo das diferentes estratégias de reabilitação na microbiota do solo, independentemente da sua cronossequência, e contrário ao observado para o agrupamento pelo índice de reabilitação.

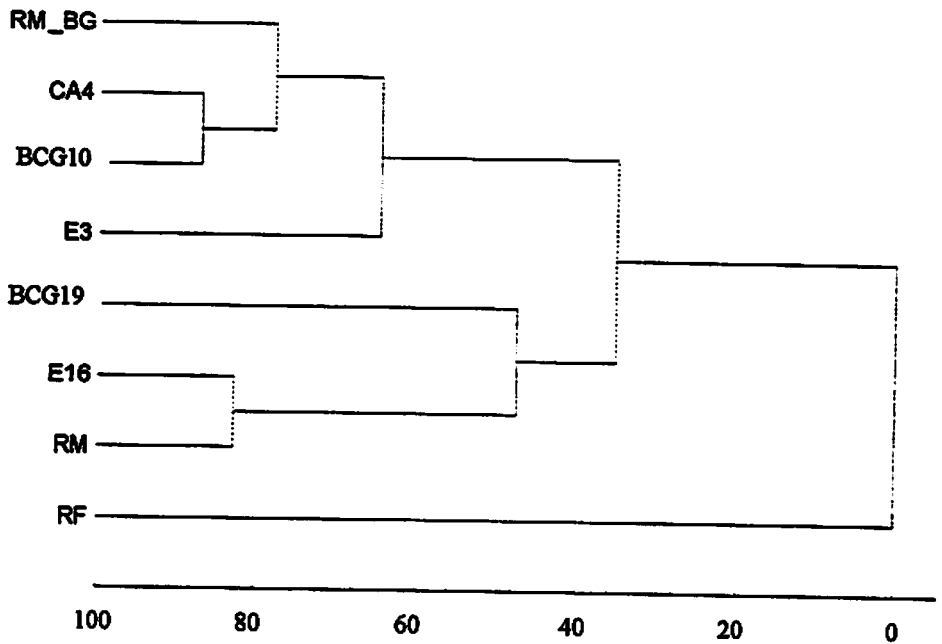


FIGURA 2. Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características microbiológicas (número, matéria fresca e atividade de nódulos de caupi, diversidade de isolados de rizóbio de caupi, colonização micorrízica de caupi e plantas coletadas *in situ*, MEA, MET, número total de esporos e espécies, diversidade de ecotipos, NMP propágulos de fungos MAs, densidade de diazotróficos endofíticos), com amostras de solo do campo, coletadas no verão. RM recém-minerado e não reabilitado; RM-BG braquiária e feijão-guandu com 6 meses; E3 eucalipto 3 anos; CA4 capim-azevém 4 anos; BCG10 bracatinga e capim-gordura 10 anos; E16 eucalipto 16 anos; BCG19 bracatinga e capim-gordura 19 anos; RF referência, sem alterações antrópicas.

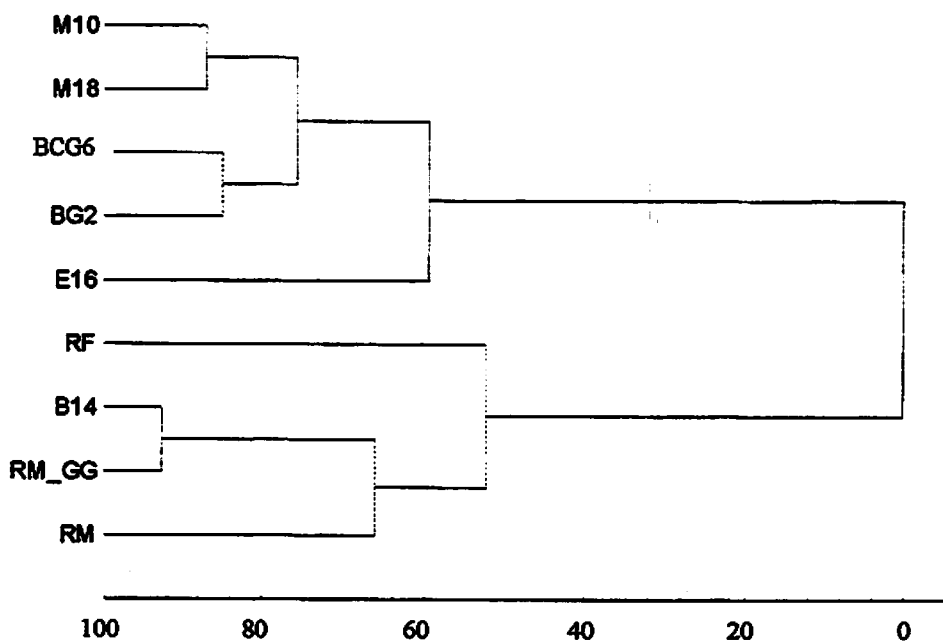


FIGURA 3. Dendrograma de similaridade construído de acordo com as características microbiológicas (número, matéria fresca e atividade de nódulos de caupi, diversidade de isolados de rizóbio de caupi, colonização micorrízica de caupi e plantas coletadas *in situ*, MEA, MET, número total de esporos e espécies, diversidade de ecotipos, NMP propágulos de fungos MAs, densidade de diazotróficos endofíticos), com amostras de solo da serra, coletadas no verão. RM recém-minerado e não reabilitado; RM-GG capim-gordura e feijão-guandu 6 meses; BG2 braquiária e guandu 2 anos; BCG6 bracatinga e capim-gordura 6 anos; M10 espécies nativas 10 anos; B14 bracatinga 14 anos; E16 eucalipto 16 anos; M18 bracatinga e espécies nativas 18 anos; RF referência.

Assim, pelo agrupamento dos sítios em dendogramas de similaridade, pode-se afirmar que a “reabilitação visual” observada acima do solo, não pode ser considerada a mesma daquela determinada pelas variáveis microbiológicas,

abaixo da superfície. Estes resultados indicam que a avaliação da reabilitação através da porcentagem de cobertura vegetal, diversidade florística e fauna silvestre (características da vegetação e fauna *in situ*), como propostos por Brower e Zar (1977), não reflete a funcionalidade dos solos minerados em reabilitação. Como já discutido no agrupamento de sítios do campo pelo índice de reabilitação, a não relação entre tempo de reabilitação e características da vegetação concorda com os resultados obtidos por Skouse, Johnson e Garbutt (1994), em solos de mineração de carvão nos EUA, e por Ruivo (1998), em solos de mineração de bauxita no Brasil.

Da análise de componentes principais (PCA), três PC foram extraídos dos atributos físicos, químicos e microbiológicos das amostras de solo (Tabela 2), sendo a análise destes componentes representada graficamente nas figuras 4 e 5 para sítios do campo e serra, respectivamente.

Para os dados referentes aos sítios do campo (Tabela 2), o PC1 apresentou 32,0% da variância total, e as variáveis que mais correlacionaram foram colonização micorrízica, MEA, MET, número total de esporos de fungos MAs, densidade de bactérias diazotróficas endofíticas e areia. Assim, o PC1 foi denominado de “componente micorrízico” pela maioria destas variáveis estar relacionada a este grupo de microrganismos. As demais variáveis ou não se correlacionaram ou não foram fortemente correlacionadas com o PC1, podendo ser consideradas menos importantes para explicar este PC. No entanto, as demais variáveis apresentaram correlação não somente com o PC1 mas também com o PC2 ou PC3. O PC2 (25,1% da variância total) foi descrito como “fertilidade e textura”, pelo fato dos atributos pH, soma de bases (SB), CTC efetiva (t), teor de Al, silte (Sl) e argila (Ag) apresentarem maiores correlações com este PC. O PC3 (16,3% da variância total) foi caracterizado por variáveis tanto microbiológicas quanto químicas (atividade da nitrogenase em nódulos de caupi (aN), índice de diversidade de isolados de rizóbio (Hr), densidade de

bactérias diazotróficas endofíticas (dE), C orgânico, N, pH, P e Al). As baixas correlações de número de nódulos de caupi (nN), índice de diversidade de fungos MAs (He) e NMP de propágulos de fungos MAs (NMP) indicaram que estas variáveis não foram associadas com os PC ligados a fungos MAs, fertilidade e textura do solo, podendo ser considerados menos importantes nestes estudos de solos do campo.

Pela figura 4, verifica-se que os sítios RF, BCG10, CA4, E16 e RM do campo apresentaram maior correlação com o PC1 (componente micorrízico), sendo fortemente influenciados pelas variáveis microbiológicas, principalmente relacionadas a fungos MAs (MET, MEA, CM, SPt, NMP). No entanto, os sítios E16 e RM, apesar da alta correlação com o PC1, apresentaram correlações negativas com as variáveis microbiológicas estudadas e grandes limitações microbiológicas. Enquanto os sítios BCG19 e E3 foram influenciados tanto pelas variáveis microbiológicas, quanto pelos atributos físicos e químicos (PC1 e 2), o sítio RM-BG apresentou maior correlação com os atributos químicos e físicos (PC2), indicando que sua reabilitação é fortemente dependente destes atributos. Pelo fato dos sítios em maior tempo de reabilitação (BCG10, BCG19, CA4), excetuando o E16, apresentarem correlações positivas com as variáveis microbiológicas, pode-se indicar que as mesmas estão influenciando positivamente a sua reabilitação. Assim, os resultados sugerem o sentido crescente da reabilitação ocorrendo de RM, E16, E3 para RM-BG e BCG10, CA4, BCG19, sendo os primeiros fortemente dependentes e relacionados aos atributos físicos e químicos do solo e os últimos fortemente influenciados pelas suas características microbiológicas, inclusive a área-referência.

TABELA 2. Valores dos autovetores obtidos na análise de componentes para as variáveis físicas, químicas e microbiológicas de amostras de solo do campo e serra.

Variáveis*	Componentes principais					
	CAMPO			SERRA		
	1	2	3	1	2	3
nN	-0.2177	0.1616	0.2411	-0.1767	<u>0.2791</u>	-0.0747
aN	-0.1359	0.0372	<u>0.3450</u>	0.2292	-0.0183	<u>0.2912</u>
Hr	-0.1790	0.1366	<u>-0.2771</u>	-0.2354	0.1663	0.1211
CM	<u>-0.3177</u>	0.1660	-0.0608	-0.1344	0.1863	<u>-0.3550</u>
MEA	<u>-0.3487</u>	-0.1665	0.0338	-0.2491	0.0447	<u>0.2732</u>
MET	<u>-0.3132</u>	0.1685	0.0126	<u>-0.2663</u>	<u>0.2566</u>	0.0121
SPt	<u>-0.3046</u>	0.2341	-0.1479	-0.2206	<u>0.2596</u>	0.0509
He	-0.1375	-0.1310	0.2311	<u>-0.2637</u>	-0.1487	-0.0694
NMP	-0.2397	-0.0162	-0.0639	<u>-0.3373</u>	-0.1113	-0.0246
dE	<u>-0.3004</u>	-0.0251	-0.2266	-0.2269	-0.2481	-0.0650
C	-0.2203	0.1207	<u>0.3696</u>	0.0227	<u>0.3636</u>	<u>-0.2712</u>
N	-0.1843	-0.2212	<u>0.3080</u>	-0.0031	<u>0.3674</u>	<u>-0.2833</u>
PH	-0.0564	<u>-0.3157</u>	<u>-0.3102</u>	<u>-0.3231</u>	-0.1000	0.1609
P	-0.0574	-0.1575	<u>0.4228</u>	0.0198	<u>-0.2624</u>	<u>-0.3987</u>
SB	-0.1192	<u>-0.3984</u>	-0.0523	<u>-0.3459</u>	0.0042	0.1241
t	-0.1044	<u>-0.4013</u>	-0.0089	<u>-0.3399</u>	0.1189	-0.0320
Al	0.1694	<u>0.2627</u>	<u>0.2885</u>	0.1592	0.2194	<u>-0.3539</u>
Ar	<u>-0.3203</u>	0.1552	-0.0935	-0.1858	-0.1979	-0.2179
Si	0.2484	<u>0.2838</u>	-0.0122	-0.0310	<u>-0.2967</u>	<u>-0.2551</u>
Ag	0.1226	<u>-0.3404</u>	0.0947	0.1583	<u>0.3044</u>	<u>0.2983</u>

Valores sublinhados indicam aqueles que foram utilizados na interpretação dos componentes principais.

* nN (número de nódulos de caupi), aN (atividade de nódulos de caupi), Hr (índice de diversidade de isolados de rizóbio de caupi), CM (colonização micorrízica de caupi), MEA e MET (micélio extrarradicular ativo e total), SPt (número total de esporos de fungos MAs), He (índice de diversidade de fungos MAs), NMP (número mais provável de propágulos de fungos MAs), dE (densidade de bactérias diazotróficas endofíticas), C (teor de carbono orgânico no solo), N (teor de nitrogênio no solo), PH (pH do solo), P (teor de fósforo no solo), SB (soma de bases), t (CTC efetiva), Al (teor de alumínio no solo), Ar, Si e Ag (textura do solo: areia, silte e argila).

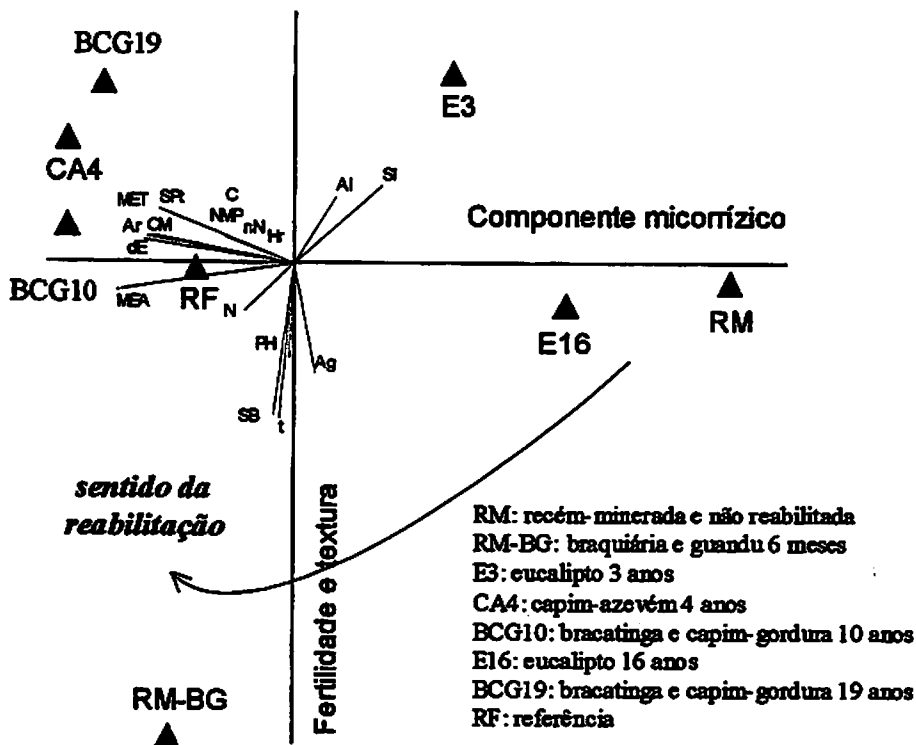


Figura 4. Análise de componentes principais para os atributos físicos, químicos e microbiológicos das amostras de solo dos sítios do campo. Atributos: nN (número de nódulos de caupi), aN (atividade de nódulos de caupi), Hr (índice de diversidade de isolados de rizóbio de caupi), CM (colonização micorrízica de caupi), MEA e MET (micélio extrarradicular ativo e total), SPt (número total de esporos de fungos MAs), He (índice de diversidade dos ecotipos de fungos MAs), NMP (número mais provável de propágulos de fungos MAs), dE (densidade de bactérias diazotróficas endofíticas), C (teor de carbono orgânico no solo), N (teor de nitrogênio no solo), PH (pH do solo), P (teor de fósforo no solo), SB (soma de bases), t (CTC efetiva), Al (teor de alumínio no solo), Ar, Si e Ag (textura do solo: areia, silte e argila).

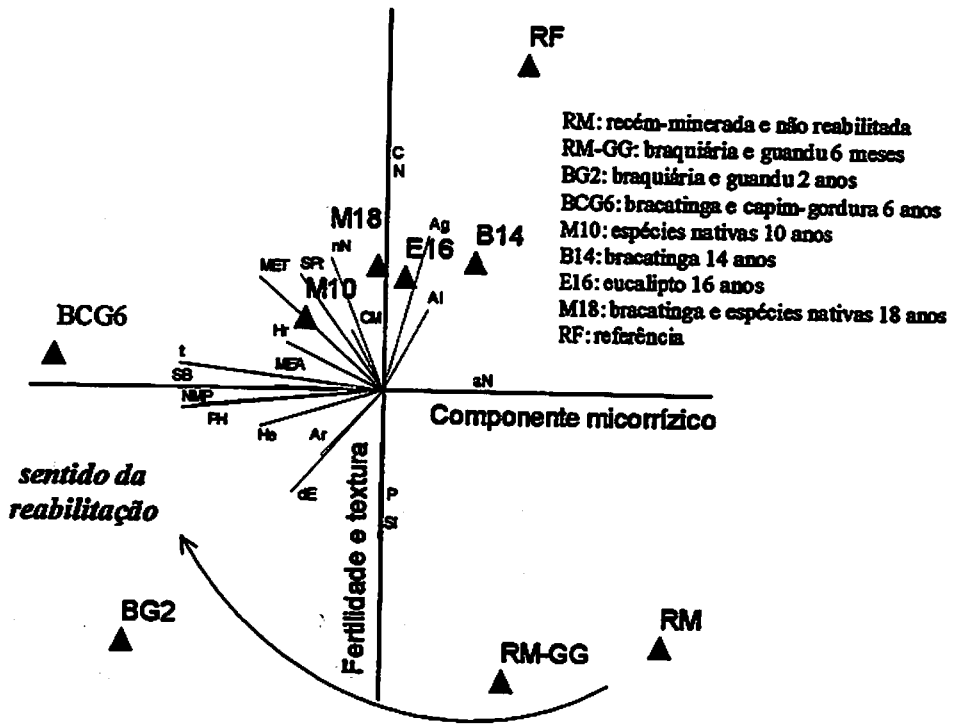


Figura 5. Análise de componentes principais para os atributos físicos, químicos e microbiológicos das amostras de solo dos sítios da serra. Atributos: nN (número de nódulos de caupi), aN (atividade de nódulos de caupi), Hr (índice de diversidade de isolados de rizóbio de caupi), CM (colonização micorrizica de caupi), MEA e MET (micélio extrarradicular ativo e total), SPT (número total de esporos de fungos MAs), He (índice de diversidade dos ecotipos de fungos MAs), NMP (número mais provável de propágulos de fungos MAs), dE (densidade de bactérias diazotróficas endofíticas), C (teor de carbono orgânico no solo), N (teor de nitrogênio no solo), PH (pH do solo), P (teor de fósforo no solo), SB (soma de bases), t (CTC efetiva), Al (teor de alumínio no solo), Ar, Si e Ag (textura do solo: areia, silte e argila).

Para os sítios da serra (Tabela 2), o PC1 apresentou 35,7% da variância total, e maiores correlações com as variáveis MEA, MET, He, NMP, pH, SB e t. Assim como para as amostras de campo, a maioria das variáveis relacionadas aos fungos MAs apresentou maior correlação com este PC, sendo denominado "componente micorrízico". O PC2 (29,2% da variância total) também foi descrito como "fertilidade e textura" devido às maiores correlações com o C orgânico, N, P, SI e Ag. O PC3 (12,8% da variância total) foi caracterizado pelas maiores correlações com aN, CM, MEA, C, N, P, Al, SI e Ag, reunindo atributos físicos, químicos e microbiológicos. O índice de diversidade de isolados de rizóbio (Hr) e densidade de bactérias diazotróficas endofíticas (dE) não apresentaram correlações com nenhum PC e não foram consideradas importantes para explicar as diferenças entre os sítios da serra.

A figura 5 mostra que o sítio BCG6 apresentou maior correlação com o PC1, e maiores influências das variáveis microbiológicas estudadas. Os sítios M10, RM e BG2 apresentaram correlação semelhante com o PC1 e PC2, embora os dois últimos tenham apresentado correlação negativa com o PC1 e limitações microbiológicas. Já os sítios M18, E16, B14 e a própria área referência (RF) apresentaram maior correlação com o PC2, sendo, portanto, mais influenciados pelas variáveis químicas e físicas do que as microbiológicas estudadas. Assim, enquanto no campo, a reabilitação da maioria dos sítios (inclusive a referência) apresentou maior influência das variáveis microbiológicas, na serra, a maioria deles (inclusive a referência) apresentou maior influência da fertilidade e textura do solo, mostrando que a reabilitação ocorre de maneira diferenciada nas duas regiões estudadas. Pelos resultados obtidos, a seguinte seqüência de reabilitação pode ser sugerida: RM para RM-GG e BG2, deste para BCG6 e M10, M18, E16, B14.

Através de relações entre os valores obtidos das variáveis microbiológicas (utilizadas no PCA) em áreas-referência (RF), sítios recém-

minerados e não reabilitados (RM) e os sítios sob diferentes estratégias e cronosssequências de reabilitação (valores mostrados nos capítulos 2, 3 e 4), estabeleceram-se índices que podem ser utilizados nos estudos de avaliação da sensibilidade relativa destas variáveis em indicar a recuperação da interferência ou o impacto da reabilitação (reabilitado/não reabilitado) e eficácia da reabilitação em relação à referência (reabilitado/referência). Estes índices são mostrados nas tabelas 3 e 4, para os sítios do campo e serra, respectivamente.

Para os sítios do campo, verifica-se que todos estão em reabilitação e, com exceção do índice de diversidade de fungos MAs, todas as variáveis microbiológicas apresentaram sensibilidade relativa diferenciada em indicar a recuperação da interferência (mineração) do solo. Para o sítio E16 (eucalipto com 16 anos), apesar do longo tempo de reabilitação, obtiveram-se baixos índices em praticamente todas as variáveis, mostrando que esta estratégia de reabilitação foi a que menos contribuiu à recuperação da microbiota dos solos minerados. Os sítios revegetados predominantemente com bracatingas e, com 10 (BCG10) e 19 anos de idade (BCG19), apresentaram índices maiores em praticamente todas as variáveis microbiológicas estudadas. Outro resultado interessante foi a sensibilidade da maioria das variáveis em indicar o início de recuperação da interferência ocorrida no sítio RM-BG, reabilitado há 6 meses com braquiária e feijão-guandu, com muitos valores superiores àqueles de sítios com eucalipto 16 anos (E16), por exemplo.

TABELA 3. Sensibilidade relativa das variáveis estudadas em amostras de solo do campo coletadas no verão.

Breve descrição dos sítios CAMPO	Recuperação da interferência RB/NR	Eficácia da reabilitação RB/RF
Número de nódulos de caupi		
Braquiária e guandu 6 meses	1,71	0,65
Eucalipto 3 anos	2,66	1,00
Capim-azevém 4 anos	1,62	0,61
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	2,66	1,00
Eucalipto 16 anos	1,47	0,55
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	2,37	0,90
Atividade da nitrogenase em nódulos de caupi		
Braquiária e guandu 6 meses	13,03	0,30
Eucalipto 3 anos	24,30	0,55
Capim-azevém 4 anos	15,80	0,36
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	19,15	0,43
Eucalipto 16 anos	8,42	0,19
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	5,55	0,13
Índice de diversidade de isolados de rizóbio de caupi		
Braquiária e guandu 6 meses	0,79	0,98
Eucalipto 3 anos	0,72	0,89
Capim-azevém 4 anos	1,15	1,42
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	1,71	2,11
Eucalipto 16 anos	0,96	1,19
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	1,31	1,61
MEA		
Braquiária e guandu 6 meses	23,67	1,16
Eucalipto 3 anos	2,67	0,13
Capim-azevém 4 anos	19,67	0,97
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	15,67	0,77
Eucalipto 16 anos	2,33	0,11
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	15,33	0,75
MET		
Braquiária e guandu 6 meses	27,19	0,51
Eucalipto 3 anos	32,96	0,62
Capim-azevém 4 anos	52,73	1,00
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	98,10	1,85
Eucalipto 16 anos	30,40	0,57
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	85,77	1,62

... continua ...

TABELA 3, Cont.

Breve descrição dos sítios CAMPO	Recuperação da interferência RB/NR	Eficácia da reabilitação RB/RF
Colonização micorrízica em caupi		
Braquiária e guandu 6 meses	3,15	0,60
Eucalipto 3 anos	3,55	0,68
Capim-azevém 4 anos	8,38	1,81
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	6,21	1,19
Eucalipto 16 anos	2,93	0,56
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	5,32	1,02
Número total de esporos de fungos MAs		
Braquiária e guandu 6 meses	4,38	0,88
Eucalipto 3 anos	7,89	1,58
Capim-azevém 4 anos	15,68	3,14
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	14,24	2,85
Eucalipto 16 anos	2,67	0,53
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	17,08	3,42
Índice de diversidade de fungos MAs		
Braquiária e guandu 6 meses	3,20	1,14
Eucalipto 3 anos	3,00	1,07
Capim-azevém 4 anos	2,80	4,00
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	2,80	1,00
Eucalipto 16 anos	3,00	1,07
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	1,60	0,57
NMP de propágulos de fungos MAs		
Braquiária e guandu 6 meses	41,77	7,37
Eucalipto 3 anos	1,52	0,27
Capim-azevém 4 anos	14,17	2,50
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	32,05	5,66
Eucalipto 16 anos	0,60	0,11
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	82,89	14,63
Densidade de diazotróficos endofíticos		
Braquiária e guandu 6 meses	1,00	1,95
Eucalipto 3 anos	0	0
Capim-azevém 4 anos	2,20	4,28
Bracatinga e cap.gordura 10 anos	1,13	2,20
Eucalipto 16 anos	0	0
Bracatinga e cap. gordura 19 anos	0,52	1,01

RB reabilitado, NR não reabilitado, RF referência. NR=considerado o sítio RM da amostragem de inverno. Para diazotróficos endofíticos, considerou-se o sítio RM-BG como NR.

TABELA 4. Sensibilidade relativa das variáveis estudadas em amostras de solo da serra, coletadas no verão.

Breve descrição dos sítios SERRA	Recuperação da interferência RB/NR	Eficácia da reabilitação RB/RF
Número de nódulos de caupi		
Capim-gordura e guandu 6 meses	0,29	0,45
Braquiária e guandu 2 anos	0,49	0,76
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	0,52	0,80
Mata com bracatinga 10 anos	0,44	0,68
Bracatinga 14 anos	0,35	0,55
Eucalipto 16 anos	0,49	0,76
Mata com bracatinga 18 anos	0,43	0,66
Atividade da nitrogenase em nódulos de caupi		
Capim-gordura e guandu 6 meses	0,73	0,68
Braquiária e guandu 2 anos	0,48	0,45
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	0,52	0,48
Mata com bracatinga 10 anos	0,35	0,33
Bracatinga 14 anos	0,72	0,67
Eucalipto 16 anos	0,19	0,18
Mata com bracatinga 18 anos	0,44	0,41
Índice de diversidade de isolados de rizóbio de caupi		
Capim-gordura e guandu 6 meses	0,46	0,27
Braquiária e guandu 2 anos	2,71	1,61
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	2,04	1,21
Mata com bracatinga 10 anos	2,14	1,27
Bracatinga 14 anos	2,50	1,46
Eucalipto 16 anos	1,90	1,13
Mata com bracatinga 18 anos	2,13	1,26
MEA		
Capim-gordura e guandu 6 meses	20,00	1,43
Braquiária e guandu 2 anos	53,00	3,79
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	187,00	13,36
Mata com bracatinga 10 anos	32,00	2,29
Bracatinga 14 anos	104,00	7,43
Eucalipto 16 anos	26,00	1,86
Mata com bracatinga 18 anos	12,00	0,86
MET		
Capim-gordura e guandu 6 meses	36,48	0,30
Braquiária e guandu 2 anos	119,96	1,00
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	222,59	1,85
Mata com bracatinga 10 anos	146,81	1,22
Bracatinga 14 anos	161,81	1,34
Eucalipto 16 anos	170,63	1,42
Mata com bracatinga 18 anos	133,04	1,10

...continua...

TABELA 4, Cont.

Breve descrição dos sítios	Recuperação da interferência	Eficácia da reabilitação
SERRA	RB/NR	RB/RF
Colonização micorrízica em caupi		
Capim-gordura e guandu 6 meses	98,85	0,90
Braquiária e guandu 2 anos	88,00	0,80
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	76,80	0,70
Mata com bracatinga 10 anos	158,58	1,45
Bracatinga 14 anos	76,68	0,70
Eucalipto 16 anos	85,03	0,78
Mata com bracatinga 18 anos	120,83	1,10
Número total de esporos de fungos MAs		
Capim-gordura e guandu 6 meses	18,32	0,19
Braquiária e guandu 2 anos	55,10	0,58
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	93,59	0,98
Mata com bracatinga 10 anos	50,73	0,53
Bracatinga 14 anos	36,41	0,38
Eucalipto 16 anos	43,46	0,46
Mata com bracatinga 18 anos	44,20	0,46
Índice de diversidade de fungos MAs		
Capim-gordura e guandu 6 meses	0,90	1,80
Braquiária e guandu 2 anos	1,50	3,00
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	1,40	2,80
Mata com bracatinga 10 anos	1,30	2,60
Bracatinga 14 anos	0,90	1,80
Eucalipto 16 anos	1,40	2,80
Mata com bracatinga 18 anos	1,10	2,20
NMP de propágulos de fungos MAs		
Capim-gordura e guandu 6 meses	-	3,51
Braquiária e guandu 2 anos	-	14,10
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	-	10,30
Mata com bracatinga 10 anos	-	9,16
Bracatinga 14 anos	-	2,24
Eucalipto 16 anos	-	4,52
Mata com bracatinga 18 anos	-	2,03
Densidade de diazotróficos endofíticos		
Capim-gordura e guandu 6 meses	1,00	-
Braquiária e guandu 2 anos	1,14	-
Bracatinga e capim-gordura 6 anos	1,03	-
Mata com bracatinga 10 anos	0	-
Bracatinga 14 anos	0	-
Eucalipto 16 anos	0	-
Mata com bracatinga 18 anos	0	-

RB reabilitado, NR não reabilitado, RF referência. NR=considerado o sítio RM da amostragem de inverno. Para diazotróficos endofíticos, considerou-se o sítio RM-BG como NR.

Quanto à eficácia de reabilitação, verificou-se que, apesar dos sítios estarem em processo de reabilitação, aquele com eucalipto 16 anos foi o que apresentou os menores índices pela maioria das variáveis, muitas vezes inferiores aos apresentados pelo sítio recém-minerado (RM) e reabilitado com braquiária e feijão-guandu por 6 meses (RM-BG). Contrariamente, assim como já discutido, sítios utilizando bracatingas como estratégia de reabilitação foram os que mais se destacaram, com os maiores índices na maioria das variáveis (número de nódulos, índice de diversidade de rizóbio, MET, colonização micorrízica, número total de esporos e NMP de propágulos de fungos MAs).

Também para os sítios da serra, verificou-se que todos estão em reabilitação, como indicado pela maioria das variáveis microbiológicas utilizadas. Houve variação da sensibilidade relativa destas variáveis em indicar a recuperação da interferência e eficácia da reabilitação dos sítios. No entanto, pode-se observar que, enquanto número de nódulos, índice de diversidade de rizóbio e densidade de diazotróficos endofíticos apresentaram baixa sensibilidade relativa em indicar o impacto da reabilitação, as demais variáveis, principalmente aquelas relacionadas a fungos MAs (MEA, MET, colonização micorrízica e número total de esporos), apresentaram grande potencial de utilização como indicadores microbiológicos da recuperação da microbiota dos solos minerados, assim como ocorreu nos sítios do campo. Variáveis relacionadas às populações de rizóbio e nodulação não possibilitaram discriminação dos sítios do campo pela cronossequência (capítulo 2), provavelmente devido às maiores relações com leguminosas (feijão-guandu e bracatingas) utilizadas como estratégias de reabilitação. Também variáveis como ocorrência e densidade de microrganismos diazotróficos endofíticos nos solos foram muito dependentes da presença de gramíneas utilizadas na reabilitação (capítulo 3), não discriminando os sítios pela sua cronossequência. Para a maioria das variáveis, os sítios que apresentaram os maiores índices de

recuperação da interferência foram aqueles com bracatingas de 6 (BCG6) e 14 anos (B14), e os reabilitados com braquiária e feijão-guandu 2 anos (BG2). No entanto, deve-se atentar que o comportamento do sítio com eucalipto 16 anos foi bem diferente daquele apresentado no sítio do campo, apresentando reabilitação semelhante àquela dos sítios com bracatingas. Este resultado indica que o eucalipto pode ser utilizado como estratégia de reabilitação, desde que o plantio seja feito em maior espaçamento e o sub-bosque enriquecido com maior número de espécies vegetais, como na serra.

A mesma discussão aplicada anteriormente às variáveis é válida na avaliação da sensibilidade relativa aplicada nos estudos da eficácia de reabilitação. Sítios com bracatingas de 6, 10 e 14 anos, e os reabilitados com braquiária e feijão-guandu 2 anos apresentaram os maiores índices na maioria das variáveis, enquanto os menores foram obtidos pelos sítios recém reabilitados com capim-gordura e feijão-guandu 6 meses e mata com espécies arbóreas nativas incluindo bracatingas de 18 anos. O resultado apresentado por este último sítio pode ser devido à morte de espécies como bracatingas (final do ciclo), com aberturas de clareiras e início de nova sucessão, interferindo na microbiota do solo.

Pela alta sensibilidade relativa das variáveis microbiológicas e ainda pela facilidade de determinação em laboratório da maioria delas, pode-se dizer que as mesmas apresentam grande potencialidade de utilização como indicadores microbiológicos da reabilitação de solos de mineração de bauxita.

4 CONCLUSÕES

Pela análise de dendogramas de similaridade, obtidos através do índice de reabilitação e variáveis microbiológicas, conclui-se que:

a) não houve relação entre cronosseqüência de reabilitação de solos minerados avaliada por características de solo e vegetação, *in situ*, daquela determinada utilizando-se variáveis microbiológicas.

b) as estratégias de reabilitação mostraram-se mais importantes que a cronosseqüência de reabilitação no agrupamento dos sítios minerados.

Pela análise de componentes principais dos atributos físicos, químicos e microbiológicos:

a) houve estratificação dos sítios minerados de acordo com a cronosseqüência de reabilitação;

b) a reabilitação dos sítios do campo e serra ocorre de maneira diferenciada, sendo a primeira fortemente influenciada pelas variáveis microbiológicas estudadas e a segunda pelos atributos físicos e químicos do solo.

c) o sentido crescente da reabilitação dos sítios do campo pode ser proposto como: sítios recém-minerados e não reabilitados (RM), eucalipto 16 anos (E16), eucalipto 3 anos (E3), braquiária e guandu 6 meses (RM-BG), (bracatinga e capim-gordura 19 anos (BCG19), capim-azevém 4 anos (CA4), bracatinga e capim-gordura 10 anos (BCG10) e referência (RF)), sendo os primeiros (RM, E16, E3 e RM-BG) fortemente influenciados pelos atributos físicos e químicos do solo, e os demais pelos microrganismos estudados e seus processos. O sentido crescente da reabilitação dos sítios da serra pode ser proposto como: sítios recém-minerados e não reabilitados (RM), capim-gordura e guandu 6 meses (RM-GG), braquiária e guandu 2 anos (BG2), bracatinga e capim-gordura 6 anos (BCG6), mata de espécies nativas 10 anos (M10), (mata de espécies nativas com bracatinga (M18), eucalipto 16 anos (E16), bracatinga 14 anos (B14) e referência (RF)), a maioria, com exceção do sítio BCG6, fortemente influenciada pelos atributos físicos e químicos do solo.

Pela sensibilidade relativa das variáveis microbiológicas:

a) populações de bactérias diazotróficas e fungos MAs podem ser utilizadas na avaliação da reabilitação e funcionalidade de solos de mineração de bauxita, com grande potencial de serem utilizadas como indicadores microbiológicos nestes estudos.

b) estratégias de reabilitação que utilizam bracatingas podem ser consideradas aquelas que contribuem para melhor recuperação da microbiota do solo, enquanto aquelas com eucalipto, em plantio adensado e homogêneo, podem ser consideradas inadequadas à reabilitação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v.35, p.121-150, 1991.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, Rehovot, v.13, p.65-73, 1992.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.43, n.2, p.103-121, Feb. 1997.
- BROWER, J.E.; ZAR, J.H. *Field & laboratory methods for general ecology*. Dubuque: Iowa Wm. C. Brown, 1977. p.8-20.
- CUENCA, G.; ANDRADE, Z. de; ESCALANTE, G. Diversity of glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.30, n.6, p.711-719, June 1998.
- DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing from *Clostridium pasteurinum*. *Biochemistry Biophica Acta*, Amsterdam, v.127, p.285-294, 1966.

- DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J. (ed.) *Methods for evaluating biological nitrogen-fixation*. New York: John Wiley & Sons, 1980. p.535-555.
- DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.15, n.1, p.3-11, Jan. 2000.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Manual de métodos de análise de solos*. 2.ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPS, 1997. 212p.
- EVERITT, B.S. *Cluster analysis*. New York: J. Wiley, 1993. 170p.
- FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C.; DIAS, L.E.; FARIA, S.M. Use of nodulated and mycorrhizal legume trees for revegetation of residues from bauxite mining. In: *INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS-NITROGEN FIXATION*, 1995, Angra dos Reis. Abstracts... Angra dos Reis: EMBRAPA-CNPAB/UFRRJ/ Brazilian Academy of Sciences, 1995. p.80.
- FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. de. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.897-903, May/June 1997.
- FRESQUEZ, R.R.; ALDON, A.A.; LINDERMANN, W.C. Microbial diversity of fungal genera in reclaimed coal mine spoils and soils. *Reclamation Revegetation Research*, v.4, n.3, p.245-258, 1986.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, Cambridge, v. 46, n.2, p.235-244, July 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, Oxford, v.84, n.3, p.484-500, Mar. 1980.
- GRIFFITH, J.J. *Recuperação conservacionista da superfície de áreas mineradas: uma revisão de literatura*. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1980. 106p. (Boletim Técnico, 79).
- JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and cultural stresses. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (co-eds.). *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison, 1992. p.71-99.
- MAGALHÃES, F.M.M. *Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio*. Manaus: Universidade do Amazonas, 1983. 89p. (Tese - Mestrado em Botânica).

- McCUNE, B.; MEFFORD, M.J. Multivariate analysis of ecological data. Version 3.12. Glenden Beach: MjM Software, 1997.
- MELONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. I. Método empregado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Vigosa, v.23, n.1, p.53-58, jan./mar. 1999.
- MORTON, J.B.; BENTWENGA, S.P.; WHEELER, W.W. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon*, New York, v.48, p.491-528, 1993.
- OADES, J.M. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma*, Amsterdam, v.56, n.1/4, p.377-400, Mar. 1993.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMANN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of British Mycological Society*, Cambridge, v.55, p.158-61, 1970.
- PRASAD, P.; BASU, S.; BEHERA, N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and cropland from Eastern India. *Plant and Soil*, The Hague, v.175, n.1, p.85-91, Aug. 1994.
- REYMENT, R.; JORESKOG, K.G. Applied factor analysis in the natural sciences. London: Cambridge University Press, 1993.
- RONIG, D.E.; GARLYND, M.J.; HARRIS, R.F. Farmer-based assessment of soil quality: a soil health scorecard. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds) *Methods for assessing soil quality*. Madison: Soil Science Society of America, 1996, p.39-60.
- RLTVO, M.L.P. Vegetação e características do solo como indicadores de reabilitação de áreas mineradas na Amazônia Oriental. Vigosa: UFV, 1998. 101p. (Tese - Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas).
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: University of Illinois, 1949.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; CRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA, 1994. 142p.

- SKOUSE, J.G.; JOHNSON, C.D.; GARBUTT, K.** Natural revegetation of 15 abandoned mine land sites in West Virginia. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.23, p.1224-1230, 1994.
- SMITH, S.E.; READ, D.J.** *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd.ed. London: Academic Press, 1997. 605p.
- SOUZA, F.A. de; GUERRA, J.G.M.** Emprego da técnica do número mais provável (NMP) no estudo de populações de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1998. 34p. (EMBRAPA-CNPAB. Circular Técnica, 2).
- STATISTICA.** *Statistic Analysis*. Versão 5.0. 1995.
- TISDALL, J.M.** Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil*, The Hague, v.159, n.1, p.115-121, Feb. 1994.
- VAN BRUGGEN, A.H.C.; SEMENOV, A.M.** In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v.15,n.1, p.13-24, Jan. 2000.