



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – ICE
FACULDADE DE QUÍMICA – FAQUIM

GLAUBE MATHEUS FONSECA COSTA

**DIVERSIDADE E ABUNDÂNCIA DE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS EM
ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE BAUXITA**

MARABÁ – PA

2022

GLAUBE MATHEUS FONSECA COSTA

**DIVERSIDADE E ABUNDÂNCIA DE MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS EM
ÁREAS DREGADADAS PELA MINERAÇÃO DE BAUXITA¹**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará como requisito para obtenção do grau de licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Dr. Ulisses Brigatto Albino

MARABÁ - PÁ

2022

¹ Trabalho apresentado no 7º Brazilian Conference on Natural Products no Rio de Janeiro

¹ Parte do trabalho apresentado no IV CONCINAT em Belém do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Biblioteca Setorial Campus do Tauarizinho

C837d Costa, Glaube Matheus Fonseca
Diversidade e abundância de microrganismos diazotróficos em áreas degradadas pela mineração de bauxita / Glaube Matheus Fonseca Costa. — 2022.

Orientador(a): Ulisses Brigatto Albino.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura Plena em Ciências Naturais, Marabá, 2022.

1. Micro-organismos do solo. 2. Bauxita. 3. Recuperação de terra. I. Albino, Ulisses Brigatto, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 631.46098115

GLAUBE MATHEUS FONSECA COSTA

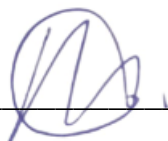
**DIVERSIDADE E ABUNDANCIA DE MICRORGANISMOS DIAZOTROFICOS EM
ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE BAUXITA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Faculdade de Química da Universidade
Federal do Sul e Sudeste do Pará como
requisito para obtenção do grau de licenciado
em Ciências Naturais.

Orientador: Dr. Ulisses Brigatto Albino

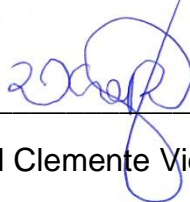
Data de aprovação: Marabá (PA), 04 de Março de 2022.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ulisses Brigatto Albino

Orientador



Prof. Dr. Daniel Clemente Vieira Rêgo Da Silva

Examinador Interno



Profa. Dra. Marilene Nunes Oliveira

Examinador Externo

Prof. Dr. Emerson Paulinho Boscheto

Examinador Suplente

Dedico este trabalho aos meus familiares mais próximos e a todas as pessoas que me ajudaram a conquistar esse objetivo tão almejado, a todos o meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e me abençoado em todas as etapas de minha vida, me acalentando no fundo do meu coração nos momentos de dificuldade mental e espiritual nessa minha jornada.

Minha mãe Rosilene, por ter sempre me incentivado a estudar para que eu construísse um futuro melhor para mim e para os meus demais, e sendo um exemplo para mim e meus irmãos nos estudos, mesmo com 3 filhos pra criar e um caminhão de problemas, ela nunca desistiu dos seus sonhos e através dos estudos alcançou o seu objetivo, obrigado por tudo mãe!

Ao meu irmão Reinan que me acompanhou durante todos esses anos na minha vida acadêmica, me orientando em coisas que eu não sabia e me acolhendo na minha primeira moradia fora da minha cidade, obrigado meu irmão, pode ter certeza que se precisar, eu farei o mesmo por você.

Agradeço ao meu pai Ângelo e ao meu irmão Jhonata que por mais que não falassem muita coisa pra mim, mas sentia em seus olhares que confiavam em meu potencial e sempre acreditaram em mim.

A minha amada Elaine, que não me deixou fraquejar um minuto sequer, sempre esteve do meu lado até nos momentos em que pensei que não fosse capaz de realizar certas coisas, ela sempre fazia eu acreditar em mim mesmo, sendo muito importante na maioria das coisas que conquistei na minha vida acadêmica e pessoal, me ajudando nos trabalhos em que não sabia por onde começar e me dando conforto e apoio quando mais precisei, obrigado por estar sempre do meu lado, lhe amo demais meu amor.

Ao meu professor, orientador e amigo Ulisses, que desde o primeiro dia de aula que tive com ele, sempre me ajudou e me incentivou na carreira acadêmica, saiba que tive um aprendizado excepcional com você tanto na vida acadêmica quanto na pessoal, levarei comigo todos os ensinamentos que tive e que o senhor é o meu exemplo de professor que quero ser quando eu ministrar minhas aulas, muito obrigado.

As minhas amigas improváveis Hellen e Camylle, que conviveram comigo no laboratório por 2 longos anos, aprendi muito com vocês por mais que vocês não gostassem muito do meu temperamento sorridente, obrigado. Ao meu amigo Alaécio Araújo que trabalhou comigo nesse projeto tão cansativo, mas sempre estava tirando

minhas dúvidas quando precisava e me fazendo rir nos momentos impróprios, apesar de eu não o ter treinado quase nada no laboratório, obrigado pela sua amizade nesses anos.

Agradeço também ao corpo docente da FAQUIM, que tive lições valiosíssimas ao longo desses anos e tive o prazer e a honra de conviver e participar de trocas de conhecimentos entre esses mestres e doutores excepcionais.

A Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará que me proporcionou uma experiência acadêmica magnífica, onde pude conhecer várias pessoas com culturas e pensamentos diferentes, levarei essa experiência para o resto da minha vida.

E agradeço a todos que me ajudaram e incentivaram direta ou indiretamente, por mais que seu nome esteja citado aqui, saiba que sou extremamente grato pela sua contribuição no meu crescimento intelectual e pessoal.

“Só se pode alcançar quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

A exploração de minérios como ferro, bauxita e manganês trazem benefícios sociais e econômicos aos estados brasileiros, principalmente na região Norte, mas gera danos ambientais difíceis de remediar apesar da legislação ambiental vigente. No estado do Pará, uma mineradora de bauxita está avaliando diferentes metodologias de restauração de áreas após a exploração. Dentre as metodologias praticadas, as principais são: Regeneração Natural, Plantio de mudas e Nucleação. Neste trabalho, as áreas submetidas a essas três metodologias, em diferentes estágios de desenvolvimento, estão sendo comparadas com áreas de floresta nativa e áreas recentemente desmatadas com base na microbiota do solo, especialmente o grupo dos microrganismos fixadores de nitrogênio. Para as análises, as amostras de solo foram coletadas em duas estações: no auge da seca (setembro de 2018) e no pico da chuva (abril de 2019). Utilizando meio de cultura seletivo para bactérias diazotróficas, as amostras foram diluídas, inoculadas e realizadas análises da abundância e diversidade das colônias. Considerando as bactérias fixadores de nitrogênio, a diversidade em ambientes florestais (considerados como controle neste trabalho) na estação seca é muito baixa e a abundância dos grupos de bactérias fixadores de nitrogênio sobreviventes é alta. Nesse período de análise, as áreas que mais se assemelharam às áreas de floresta em relação a este grupo de microrganismos, foram aquelas sob o método de regeneração natural e nucleação. Nas áreas sem vegetação (supressão) não foi observada a presença de microrganismos fixadores de nitrogênio e, nas áreas de plantio, a diversidade deste grupo foi bastante reduzida. No período chuvoso, a diversidade de microrganismos no solo é muito elevada nas áreas de floresta, neste parâmetro nenhuma das áreas em recuperação se assemelha a área de controle. A maior abundância de fixadores de nitrogênio nessa época foi observada em áreas antigas com plantio de mudas. Como as maiores diferenças entre as áreas foram observadas na estação seca, esta pode ser considerada a melhor época para esta comparação e, considerando a diversidade e abundância de microrganismos fixadores de nitrogênio, a área mais semelhante a áreas de floresta é área antiga de regeneração natural. Essas informações são muito relevantes, pois, elas podem servir de base para uma melhor distribuição de capital, para a técnica que está gerando uma boa recuperação nas áreas degradadas.

Palavras-chave: microbiota. bauxita. restauração de áreas.

ABSTRACT

The exploration of ores such as iron, bauxite and manganese bring social and economic benefits to Brazilian states, especially in the North region, but generates environmental damage that is difficult to remedy despite the environmental legislation in force. In the state of Pará, a bauxite miner is evaluating different methodologies for restoring areas after exploration. Among the methodologies practiced, the main ones are: Natural Regeneration, Planting of seedlings and Nucleation. In this work, areas submitted to these three methodologies, at different stages of development, are being compared with areas of native forest and recently deforested areas based on soil microbiota, especially the group of nitrogen-fixing microorganisms. For the analyses, soil samples were collected in two seasons: at the height of the drought (September 2018) and at the peak of the rain (April 2019). Using a selective culture medium for diazotrophic bacteria, the samples were diluted, inoculated and analyzes of colony abundance and diversity were performed. Considering nitrogen fixing bacteria, the diversity in forest environments (considered as control in this work) in the dry season is very low and the abundance of surviving nitrogen fixing bacteria groups is high. In this period of analysis, the areas that most resembled forest areas in relation to this group of microorganisms were those under the natural regeneration and nucleation method. In areas without vegetation (deletion) the presence of nitrogen-fixing microorganisms was not observed and, in planted areas, the diversity of this group was quite reduced. In the rainy season, the diversity of microorganisms in the soil is very high in forest areas, in this parameter none of the areas in recovery is similar to the control area. The greatest abundance of nitrogen fixers at this time was observed in old areas with seedlings. As the greatest differences between the areas were observed in the dry season, this can be considered the best time for this comparison and, considering the diversity and abundance of nitrogen-fixing microorganisms, the area most similar to forest areas is an old area of natural regeneration. This information is very relevant, as it can serve as a basis for a better distribution of capital, for the technique that is generating a good recovery in degraded areas.

Keywords: microbiota; bauxite; restoration of areas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivos gerais	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	A mineração de bauxita	15
3.2	Descrição da área de estudo	17
3.3	Técnicas de remediação de remediação na exploração de bauxita na cidade de paragominas	19
3.4	A importância do nitrogênio para o solo	22
3.5	Os microrganismos do solo e as bactérias fixadoras de nitrogênio	23
3.6	Os microrganismos como bioindicadores do solo	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	Documentações e requisitos para viagem à mineradora	28
4.2.	Descrição da metodologia de coleta	28
4.3.	Análises laboratoriais dos microrganismos	31
4.4	Análise de dados das bactérias fixadoras de nitrogênio	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ÍNDICIE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mina de bauxita em Paragominas-PA.....	20
Figura 2- Mapa da área do empreendimento Mineração Paragominas.	18
Figura 3- Visita de técnicos da mineradora na área de Regeneração Natural.....	22
Figura 4- Visita de técnicos da mineradora na área de Plantio de Mudas.... Erro! Indicador não definido.	
Figura 5- Visita de técnicos da mineradora na área de Nucleação..... Erro! Indicador não definido.	
Figura 6- Levantamento das áreas a serem utilizadas para a coleta através do software Google Earth	29
Figura 7- Desenho esquemático da coleta de solo.....	29
Figura 8- Amostras de solo lacradas em sacos plásticos e etiquetadas.....	30
Figura 9- Área de supressão da mineradora.	31
Figura 10- Desenho esquemático da diluição da amostra.....	33
Figura 11- Placa de Petri com colônias de bactérias fixadoras de nitrogênio.	34
Figura 12- Gráfico de abundância de fixadores de nitrogênio no período seco em todas as áreas.....	36
Figura 13- Análise estatística dos dados do período seco no software PAST.	37
Figura 14- Gráfico de diversidade de fixadores de nitrogênio no período seco em todas as áreas.....	39
Figura 15- Gráfico de diversidade de fixadores de nitrogênio no período chuvoso em todas as áreas.	40
Figura 16- Gráfico de abundância de fixadores de nitrogênio no período chuvoso em todas as áreas.	41
Figura 17- Análise estatística dos dados do período chuvoso no software PAST.	41
Figura 18- Comparação de abundância entre áreas nos dois períodos.....	42
Figura 19- Comparação de diversidade entre áreas nos dois períodos.....	43

1 INTRODUÇÃO

A atividade mineradora é uma das principais fontes de renda do país, onde ela representa 25% do saldo do Brasil e 4% do PIB (Portal G1, 2018.), no estado do Pará, a atividade de mineração de minério de ferro e bauxita geram empregos, renda e desenvolvimento para a cidade onde a mineração está instalada. A mineração de bauxita em Paragominas é uma grande influência econômica, social e estrutural, porém essa mesma mineração provoca grandes danos ambientais, seja pelo descarte incorreto dos rejeitos ou pela retirada da camada vegetal de florestas nativas da região para a efetivação da extração do mineral.

Partindo dessa premissa, a mineradora tem por obrigação buscar técnicas que procurem reabilitar essa área após a extração ter sido totalmente concluída como está previsto na resolução Nº1/86 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) onde se fala do empregos de técnicas ou tecnologias, no qual a empresa licenciada para a atividade de mineração precisa adotar. Porém essa reabilitação da floresta demanda tempo e em certas vezes não se obtêm sucesso, então como recuperar uma área em pouco tempo com elementos naturais? Uma das alternativas são as bactérias e fungos micorrízicos, que podem ajudar nesse processo de recuperação ambiental mais rapidamente e de maneira sustentável.

Os fungos micorrízicos são grandes ajudantes das plantas, buscando nutrientes mais longe, quando os recursos são escassos próximos a ela, eles estão atrelados a raiz da planta fazendo com que a raiz seja mais extensa e com isso ajuda a planta sobreviver em períodos de seca severa. Outro componente de grande valia para o reflorestamento são as bactérias, que quando estão em simbiose com os fungos micorrízicos e as plantas, formam uma parceria perfeita para o desenvolvimento da planta em especial as bactérias fixadoras de nitrogênio.

Este grupo de bactérias ajudam a fixar o nitrogênio da atmosfera no solo através de sua enzima nitrogenase no qual ela transforma o N_2 em amônia (NH_3) para ser disponibilizada para a planta (MOREIRA, 2010). Neste grupo de microrganismo é

possível encontrar bactérias autotróficas e heterotróficas, onde se diferenciam no processo de fixação de N (VINHAL-FREITAS, 2010).

Uma mineradora de bauxita em Paragominas por sua vez, empregou 3 técnicas de reflorestamento sendo elas: Regeneração natural, Plantio de mudas e Nucleação. Para se obter a informação de qual das 3 técnicas está sendo mais eficiente, as mesmas estão sendo comparadas com a floresta nativa da região e com áreas que foram recentemente desmatadas chamadas de “supressão”, para as análises foram coletas amostras em dois períodos.

Esta pesquisa além de ajudar as empresas a empregar uma remediação mais eficiente com a microbiota do solo, ela também contribui para a literatura, pois existem ainda poucos trabalhos utilizando esses microrganismos que são tão versáteis, podendo ser usado em diversas áreas do conhecimento, como por exemplo na agricultura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

- O presente trabalho visa contribuir com os estudos voltados ao reflorestamento de áreas impactadas pelas atividades de mineração tomando como base uma avaliação da microbiota do solo, na perspectiva diversidade e abundância de bactérias fixadoras de nitrogênio.

2.2 Objetivos específicos:

- Entender a dinâmica e as necessidades para se realizar as pesquisas de campo, administradas por uma empresa multinacional.

- Estudar os microrganismos fixadores de nitrogênio e sua importância aos ecossistemas e a possibilidade da utilização como bioindicadores de qualidade ambiental.

- Realizar coletas em campo de material a ser analisado microbiologicamente.

- Comparar amostras de solo de diferentes áreas em recuperação ambiental com base na abundância e na diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A MINERAÇÃO DE BAUXITA

O potencial para exploração mineral no Brasil é enorme, sendo uma das principais fontes econômicas do país, sendo explorados 55 tipos de minerais e com reservas de 45,7% de teor de ferro, representando 17% das reservas de minério de ferro do mundo todo (SIMINERAL, 2021). De acordo com a SIMINERAL (Sindicato das Indústrias Mineraias do Estado do Pará) até 2024, a mineração pretende investir mais de R\$ 22 bilhões no estado do Pará e mais R\$ 18,863 bilhões em infraestrutura, transformação mineral e outras ramificações de negócios, como por exemplo, a fabricação de biodiesel (GEOSCAN, 2019). A mineração apresenta uma crescente evolução ao longo dos anos, com altas demandas de diversos países, a exportação deu um salto gigantesco de 91% em comparação com o 1º semestre de 2020 (IBRAM, 2021), a bauxita, no qual é a matéria-prima mais usada para a fabricação em escala comercial do alumínio, é o 3º mineral mais exportado, ficando atrás apenas do minério de ferro e do ouro. Em 2018 foram produzidos aproximadamente 32 milhões de toneladas, e a grande parte da extração desse mineral acontece em Oriximiná – Pará.

O Brasil possui a quarta maior reserva de bauxita no mundo, esse mineral é o que mais agrega valor ao setor dele, pois segundo Milton Rêgo – presidente-executivo da Associação Brasileira do Alumínio (ABAL) a cada real no qual foi obtido na extração da bauxita, é originado mais R\$ 16 nas demais etapas (REVISTA ALUMINIO, 2019). Além de Oriximiná, o Pará possui mais duas cidades com pontos de extração relevantes como Paragominas e Juruti. Com a instalação desses grandes

projetos nos municípios é possível notar ao longo dos anos seu desenvolvimento com a criação de novos postos de trabalho.

O município onde está instalada a mineradora cresce socioeconomicamente, porém, para a mineradora poder efetivar a sua extração mineral, é necessário desmatar florestas nativas da região, e durante a exploração da bauxita é necessário ter um cuidado com os rejeitos que são gerados, sem a atenção necessária, esses rejeitos de minérios produzidos pela exploração, podem causar desastres ambientais como ocorrido na cidade de Barcarena, onde rejeitos tóxicos da refinaria de uma mineradora, contaminaram o rio do município. Após feita a exploração, nem todas as empresas preocupam-se em reflorestar a área degradada, causando imensos clarões em meio a floresta nativa da região.

A bauxita teve sua descoberta em 1821 por Berthier na cidade de Les Baux, daí então a origem do seu nome de bauxita (SAMPAIO, 2008), é um mineral heterogêneo, composto por uma ou mais formas de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), ela se forma pelo intemperismo de aluminossilicatos contendo impurezas, a forma mais comum em ambientes tropicais como o Brasil, é a com alto conteúdo de gibbsita, no qual, se tem maior interesse econômico (CONSTANTINO et al, 2002).

A extração da bauxita começa com a catalogação da flora na área em que irá ocorrer a exploração, esta catalogação é feita por uma parte do EIA (Estudos de Impactos Ambientais), esse levantamento da flora é feito por uma equipe multidisciplinar, onde essa equipe vai até a área e faz a coleta dos dados das espécies nativas onde irá ser a futura exploração. A catalogação desta área é muito importante antes da mineração, pois com esses dados das espécies, a mineradora saberá quais espécies de plantas terá que utilizar no reflorestamento da área ou na compensação da área desmatada. Após a catalogação ser feita, vem a parte de retirar a camada vegetal (*topsoil*) e a camada estéril da terra, essas duas porções de solo são chamados de horizontes A e B respectivamente. O *topsoil* (solo superficial) é a camada mais superficial do solo, essa faixa superficial vai em média até 40 cm de profundidade, possuindo uma grande concentração de matéria orgânica com sementes e raízes de diversas plantas e uma grande abundância de microrganismos, no qual são essenciais para a manutenção ecológica do solo, essa retirada desses horizontes possui em média 11,4 metros de profundidade. Em seguida é feito o processo de *strip mining* (mineração a céu aberto), no qual consiste em retirar tiras ou

faixas de terra na escavação até chegar onde o mineral está depositado (PEREIRA, 2019), em média, essas faixas de lavra apresentam larguras de 25 a 30 metros e comprimento maiores do que 400 metros, após isso a bauxita extraída, é levada para um setor chamado beneficiamento, onde ocorre o processo de britagem atrição e peneiramento das frações argilosas e minerais de sílica. Posteriormente aquela faixa de terra ser totalmente minerada, uma nova faixa é aberta e ao mesmo tempo se inicia a recuperação da área em que foi extraída a bauxita, então é devolvida a camada estéreis da terra e o *topsoil*, em seguida é feita a aplicação de técnicas de remediação das áreas suprimidas (REVISTA ALUMÍNIO, 2019).

O mercado de alumínio no Brasil é bem forte, atingindo no passado o segundo lugar mundial em produção deste material, nos dias de hoje com uma produção bem menor cerca de 1,5 milhão de toneladas nas diversas aplicações do alumínio, o metal movimentava cerca de R\$ 83 bilhões segundo os dados da ABAL (Associação Brasileira do Alumínio) (CAVAENGA, 2021). Grande parte da bauxita que é produzida no Brasil é destinada à fabricação da alumina, no qual é matéria-prima para o alumínio primário, o consumo *per capita* desse alumínio proveniente do Brasil distribui-se da seguinte maneira: 37 kg nos EUA, 31 kg no Japão, 19 kg na Europa ocidental e 3,9 kg no Brasil (MÁRTIRES, 2018).

3.2 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A mina de bauxita (**Figuras 1 e 2**) fica a 70 km do município de Paragominas no sudeste do estado do Pará, no platô miltônia 3 (3°14'50.2"S 47°44'14.4"W). Teve início de sua produção em 2007 e atualmente emprega 1.400 pessoas nas suas atuais instalações (Hydro, c2021). Paragominas é um município situado na mesorregião sudeste do estado do Pará, distante cerca de 320 km da capital Belém, segundo a Köppen e Geiger, Paragominas tem clima tropical e sua temperatura média é de 26,5 C°, sendo o mês de setembro o período mais seco da região com incidência de apenas 16 mm de precipitação e o mês de março sendo o período mais chuvoso com a precipitação média de 380 mm. O estado do Pará por ser o 2º maior estado em extensão territorial do país, possui climas distintos dentro do seu território, um de seus climas é o clima tropical savânico onde é predominante na região sudeste do estado, este clima tem como características seu período chuvoso e seu período de estiagem

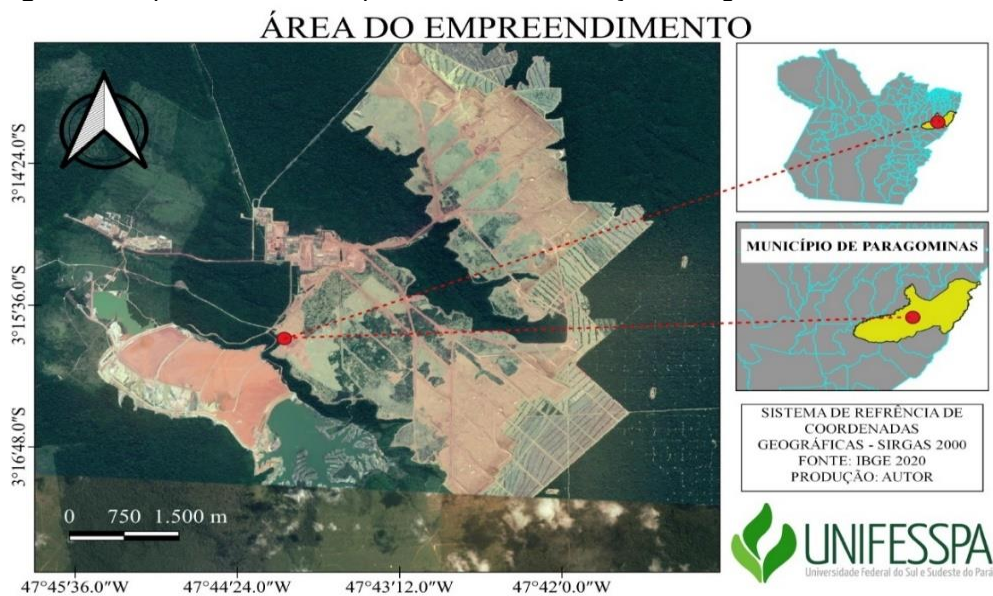
com a mesma duração de seis meses, onde se tem maior amplitude térmica em relação ao restante do estado, possuindo assim seus períodos chuvosos e secos, bem definidos (GOMES, c2021).

Figura 1- Mina de bauxita em Paragominas-PA.



Fonte: Hydro, c2021.

Figura 2- Mapa da área do empreendimento Mineração Paragominas.



Fonte: Autor.

O solo na mina de bauxita é composto por 8 camadas sendo camada vegetal (*topsoil*), capeamento argiloso, bauxita nodular, laterita ferruginosa, bauxita cristalizada, bauxita cristalizada/amorfa, bauxita amorfa e argila variegada

(PIMENTEL, 2013), todos os pontos de coleta de solo foram georreferenciados para se ter mais precisão dos dados, respeitando a metodologia da coleta e a área escolhida anteriormente em conjunto com o grupo de pesquisa e o engenheiro ambiental da mineradora.

3.3 TECNICAS DE REMEDIAÇÃO DE REMEDIAÇÃO NA EXPLORAÇÃO DE BAUXITA NA CIDADE DE PARAGOMINAS

É inegável os benefícios econômicos e sociais no qual a mineração trás para a região, mas também é inegável que sua atividade deixa sequelas muito graves para área onde está instalada, causando um estresse no seu ecossistema, alterando o solo no qual foi extraído o mineral e causando perturbações para a fauna e flora próxima da mina, outro ponto a ser considerado são as expansões de suas instalações, que por muitas vezes entram em contato com povos indígenas e/ou comunidades mudando seu cotidiano e deixando mais escassos os recursos naturais ali presentes.

A mineração de bauxita possui um grande problema, que são as imensas extensões de terra desmatadas, e com a atual forma de extração da bauxita, na qual é deixada a matéria orgânica a céu aberto por um grande período, algumas sementes e raízes acabam morrendo, fazendo com que aquele solo que antes era muito promissor para o reflorestamento, ficasse pobre de nutrientes e sozinho não será capaz de remediar o impacto ambiental causado. Pensando na problemática de reflorestamento pós extração, uma mineradora de bauxita em Paragominas buscou remediar esse problema, para poder continuar sua exploração com qualidade nas operações, selos internacionais de empresa amiga do meio do ambiente, e funcionar totalmente dentro das legislações ambientais vigentes, a partir dessa busca foram selecionadas três técnicas, onde houve um investimento pesado nelas, após essas técnicas serem aplicadas na mineradora, a empresa procura saber se esse investimento está dando retorno positivo. Então em 2013 a mineradora abriu suas portas a universidades e centros de pesquisa, nesse grupo estão presentes a UFPA, UFRA, Universidade de Oslo (UiO) e o Museu Emílio Goeldi (BATISTA, 2019) formando assim o Biodiversity Research Consotium Brazil-Norway (BRC), que tem o foco em pesquisa e desenvolvimento que possibilita o estudo e o monitoramento da biodiversidade amazônica em áreas de mineração e arredores. Com essa parceria

fechada a mineradora irá ter uma resposta científica de qual técnica empregada está se desenvolvendo melhor na região, as três técnicas escolhidas foram: regeneração natural, plantio de mudas e nucleação. A técnica de regeneração natural (**Figura 3**) consiste em reconformar a área recém minerada com a camada de estéril da terra e logo após, espalhar todo o *topsoil* (solo superficial) que estava armazenado a céu aberto por cima da camada de estéreis, com isso a ação das chuvas e sol pode auxiliar na germinação de sementes que ainda estão presentes nessa camada vegetal e assim a natureza fazer o seu trabalho em reflorestar aquela área, esse tipo de procedimento é adotado mundialmente para uma recuperação da flora de maneira mais eficiente, quando empregado de maneira correta, essa técnica possui muito potencial na recuperação de paisagens (CHAZDON, 2016).

Figura 3- Visita de técnicos da mineradora na área de regeneração natural.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares

A técnica de plantio de mudas (**Figura 4**) se caracteriza pelo mesmo procedimento da regeneração natural, mas com a diferença da implementação de mudas nativas da região, são aquelas mesmas espécies que foram catalogadas no início da extração, com isso ocorre a tentativa de aproximação do ambiente que estava presente anteriormente, o manejo do material orgânico no plantio de mudas favorece para a presença de nutrientes como N (Nitrogênio),K (Potássio),P (Fósforo),Mg

(Magnésio) e Ca (Cálcio) que são nutrientes muito importantes para o solo em que ocorreu esse tipo de estresse por meio da mineração (PEREIRA et al, 2019).

Figura 4- Visita de técnicos da mineradora na área de plantio de mudas.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

Por fim, a técnica de nucleação (**Figura 5**) consiste em fazer “bacias” com a camada de estéreis e o *topsoil* na área recém minerada, nessa técnica também é utilizada as mudas de espécies nativas, porém é adicionado coberturas vegetais como galhos e tronco de árvores, para que pássaros possam fazer seus ninhos ali e trazer mais sementes para aquela área onde está empregada a técnica, a nucleação é capaz de acelerar o ciclo natural do ecossistema com a introdução de vários mecanismos naturais como o próprio solo, fauna e microrganismos, interação entre esses acarreta um surgimento de uma vegetação secundária, além de ser uma das técnicas mais econômicas atualmente.

Figura 5- Visita de técnicos da mineradora na área de nucleação.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

3.4 A IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO PARA O SOLO

A palavra nitrogênio (N) é proveniente do grego *nitro genesis* (aquele que forma atrito), porém no ano de 1722, Antoine Laurent de Lavoisier nomeou o elemento de **azoto**, no qual significa “sem vida”. O nitrogênio é um elemento químico com número atômico 7 e de massa atômica 14, esse elemento é considerado o 7º mais abundante do universo, além de as macromoléculas do corpo humano é formada por 16% de nitrogênio (CAIUSCA, 2019).

O nitrogênio é um dos elementos mais essenciais para a manutenção e desenvolvimento da ecologia do solo, apesar do nitrogênio ser o elemento que ocupa aproximadamente 78% de toda a atmosfera na forma de gás (MARCHETTI, 2015), as plantas não conseguem usufruir desse elemento tão essencial para elas, o nitrogênio tem papel fundamental para a nutrição das plantas onde ele está ligado diretamente à composição de aminoácidos e proteínas, para as plantas usufruírem dos benefícios que o nitrogênio lhe dá, esse elemento químico precisa ser absorvido por algum fator externo ao vegetal, pois ele próprio não possui recursos suficientes para absorção dos

nutrientes. O nitrogênio influencia também no solo, onde a principal fonte provem da matéria orgânica, porém esse componente químico não está disponível em sua totalidade, assim como o atmosférico, o nitrogênio no solo é liberado lentamente por meio de atividade microbiana (SANTOS, 2020).

A disponibilidade do nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento das plantas juntamente com o fósforo. Para os seres vivos se manterem nutridos é necessário que haja combinações orgânicas, amoniacais e nítricas onde elas são metabolizadas (LESSA, 2007).

Segundo MARCHETTI, 2015:

“Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e translocação de foto assimilados e a taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo o crescimento foliar primeiramente afetado (TAÍZ; ZIEGER, 2004).”

Levando em consideração todas essas informações, é possível notar o quão importante o nitrogênio é na vida dos seres vivos, tanto para a manutenção da ecologia de um certo ambiente, quanto para o desenvolvimento dos seres vivos, porém não é possível usufruir desse elemento tão importante sem fatores que façam com que os seres vivos consigam absorver em outras formas como nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_4^+). Um dos fatores que contribuem de forma direta para essa absorção pelas plantas são as bactérias, no qual elas transformam o nitrogênio da atmosfera para elementos em que as plantas consigam absorver e se desenvolver, e além de ajudar a planta, as bactérias conseguem manter o solo sempre abastecido de nitrogênio na forma de elementos essenciais para ecologia desse ambiente.

3.5 OS MICRORGANISMOS DO SOLO E AS BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Os microrganismos são conhecidos como seres invisíveis a olho nu, ou seja, seres microscópicos. São seres com a maior diversidade biológica, podendo apresentar diversas formas celulares e metabolicamente falando, são capazes de

realizar diversas reações químicas conhecidas (VERMELHO et al,2006). Esses seres são tão diversos tanto fisiologicamente como morfológicamente e biologicamente, pois podemos encontrar nos mais variados ambientes, do mais simples deles até ao mais extremo.

Os microrganismos do solo são um dos fatores mais importantes para a biota do solo em geral, já que eles são a parte viva da matéria orgânica. Os microrganismos possuem grupos como bactérias, actinomicetos e fungos onde cada um deles tem uma característica e funções diferentes no solo. Esses microrganismos coabitam em simbiose com as plantas, entretanto, além de ter um papel importante nas funções ambientais, eles também desempenham papéis biotecnológicos como bioinoculantes, controle biológico, biorremediação, produção de fármacos, enzimas e entre outras funções. Tendo em vista essas informações, é notável a grandiosidade da biodiversidade microbiana e o potencial tão pouco explorado de um elemento de suma importância em nossas vidas (GOI et al, 2006).

As bactérias fazem uma parceria harmoniosa com as plantas em prol de um solo rico em nutrientes para os demais seres também se desenvolverem. Alguns elementos essenciais para a planta como o nitrogênio, não pode ser absorvido diretamente sem os meios necessários, então as bactérias, em especial as fixadoras de nitrogênio, fazem esse papel de captar o nitrogênio atmosférico e transformar em Amônia (NH_3) para as plantas. As bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas de vida livre foram reconhecidas há muitos anos, mostrando todo o seu potencial em associação com gramíneas (DÖBEREINER, 1958; DÖBEREINER, 1959).

As bactérias diazotróficas podem ser classificadas em alguns grupos como: diazotróficos de vida livre, diazotróficos associativos (endofíticos facultativos ou endofíticos obrigatórios) e diazotróficos simbióticos (CROPLIFE, 2021). As bactérias diazotróficas de vida livre podem viver em diversos ecossistemas, estabelecendo simbioses ou não, essas bactérias heterotróficas requerem um ecossistema com disponibilidade carbono utilizável, para poder assim, fixar nitrogênio da melhor forma possível (MARIN et al, 1999), essas bactérias são comumente encontradas em rizoplanos e na rizosfera da cana-de-açúcar, pois os exsudados como os açúcares estão envolvidos nesta associação entre planta e bactéria (DÖBEREINER, 1959). As bactérias diazotróficas associativas além de contribuírem para o crescimento da planta, ajuda em outros fatores como a solubilização de fosfato, produção de

fitormônios, entre outros diversos fatores. As bactérias diazotróficas associativas podem ser do tipo endofíticas facultativas ou endofíticas obrigatórias, no qual uma das suas principais características são que as bactérias endofíticas facultativas tem um ciclo de vida bifásico, ou seja, elas podem alternar sua vida entre o vegetal e o ambiente, enquanto as bactérias endofíticas obrigatórias dependem estritamente de uma associação com a planta (HARDOIM et al, 2008). As bactérias diazotróficas simbióticas, têm a capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente com o vegetal, nessas relações é possível encontrar estruturas diferenciadas, em associação com leguminosas, essas bactérias formam nódulos em relação ao rizóbio da planta e nesses nódulos, o rizóbio na forma de bacteróide está associado com a fixação de nitrogênio atmosférico na forma de amônia (MARIN et al, 1999).

A fixação de nitrogênio na natureza é complexa, sendo necessário ter recursos específicos para realizar essa atividade, pois o nitrogênio atmosférico é formado por dois átomos unidos por uma ligação tripla, no qual é uma ligação muito forte (HUNGRIA, 2001). As bactérias fixadoras de nitrogênio conseguem fazer essa conversão de nitrogênio em amônia, pois elas possuem uma enzima chamada nitrogenase que se liga ao nitrogênio atmosférico, o resultado dessa reação provoca uma redução de N_2 em duas moléculas de amônia, que é o suficiente para as plantas absorverem (NASCIMENTO, c2021). A partir da habilidade desse tipo de microrganismos que provém o seu nome de “diazotróficos”, di = 2, azoto = nitrogênio e trofes = alimento (aqueles que se alimentam de N_2 , o nitrogênio gasoso no ar).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é muito importante também na área econômica, plantações de feijão, milho e soja, demandam uma grande quantidade de nitrogênio para o desenvolvimento das plantações, segundo a Embrapa:

“Estima-se que a FBN tenha uma contribuição global para os diferentes ecossistemas da ordem de 258 milhões de toneladas de nitrogênio (N) por ano, sendo que a contribuição na agricultura é estimada em 60 milhões de toneladas. No Brasil, o caso mais exitoso de sua contribuição é representado pela cultura da soja, onde o uso de inoculante, a partir da década de 1960, garantiu a competitividade para a mesma quando comparada com a produção de outros países, refletindo diretamente na balança comercial do País. Caso o fornecimento de nitrogênio para a cultura da soja tivesse que ser efetuado via adubação nitrogenada seria necessário para uma

produção média de 49 sacos/ha (produtividade média da soja na safra 2012/2013) um total de 588 kg uréia/ha (considerando uma eficiência de apenas 60%), a um custo médio (outubro de 2013) de R\$ 906,00/ha. O custo por hectare da inoculação é de R\$ 8,00. Ou seja, com o processo de inoculação são economizados R\$ 898,00/ha. Se considerarmos os 27,7 milhões de hectares plantados com soja no Brasil, a economia proporcionada pela não utilização de adubos nitrogenados é da ordem de R\$ 24,9 bilhões anuais, algo em torno de US\$ 10,3 bilhões de dólares” (Embrapa, c2021).

Essa fixação biológica de nitrogênio é o segundo processo biológico mais importante para as plantas, atrás apenas da fotossíntese, e as bactérias diazotróficas ajudam nesse passo importante para a manutenção ecológica do ambiente, e essas bactérias contribuem também para o desenvolvimento ambiental e econômico, esses microrganismos são tão importantes, que interferem tanto na vida do solo e das plantas, quanto na vida de nós seres humanos.

3.6 OS MICRORGANISMOS COMO BIOINDICADORES DO SOLO

A relação dos microrganismos e as plantas é harmoniosa, alguns microrganismos tem uma relação tão íntima que segundo Peter Bakker da Utrecht University, a planta quando atacada por um patógeno, emite um composto para atrair certo tipo de microrganismos para “defendê-la” (VICENTE, 2016), isso mostra o quanto os microrganismos são importantes para o ambiente quando ocorre um desequilíbrio.

Como os microrganismos são a parte viva da matéria orgânica, e a matéria orgânica está ligada diretamente com a fertilidade do solo, podemos concluir que os microrganismos são um belo bioindicador do solo, pois qualquer alteração que aconteça no solo, é muito mais rápido obter um diagnóstico através dos microrganismos do que pela própria matéria orgânica que levam anos para demonstrar as alterações (SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, 2015). Além do diagnóstico pelos microrganismos serem bem mais rápidos, também é possível prever o que irá acontecer com o solo através dessas alterações.

Os bioindicadores são um elo importante para entendermos sobre a complexidade do solo, são muitos organismos vivendo no mesmo meio, com

processos, características, comportamentos e necessidades diferentes, e estudar esses organismos, é entender de forma mais aprofundada como funciona a vida do solo e suas interações. Esses grupos podem ser bactérias, micorrizas, actinomicetos, entre outras. Com o passar dos anos, os grupos funcionais de microrganismos foram sendo cada vez mais utilizados como bioindicadores de qualidade do solo em áreas de mineração recém florestadas, solo esse que passou por um alto nível de estresse e perdeu grande parte da sua matéria orgânica. Como os microrganismos do solo são parte fundamental para a absorção e manutenção de nutrientes essenciais para se obter um solo fértil, saber sobre sua diversidade e abundância é muito importante, principalmente nessas áreas de reflorestamento.

Uma das vantagens de se utilizar microrganismos como bioindicadores é seu baixo custo comparado com outras técnicas físicas e químicas (LOBATO, 2015), além de ser um método com repostas mais rápidas e precisas da qualidade do solo. Porém é importante salientar que não podemos afirmar que a utilização dos microrganismos é a prova de erros, é recomendado que se utilize mais de uma técnica de qualidade do solo para se ter mais chances de se chegar a uma avaliação real do solo como ressalta MATSUMOTO, 2015:

“Vale ressaltar que nenhum indicador sozinho consegue caracterizar a qualidade real de uma área e seu potencial de sofrer degradação, é interessante que se faça uso de mais de uma ferramenta para monitoramento satisfatório. Contudo, a pesquisa na correlação entre indicadores de diferentes naturezas ainda é bastante escassa, ou necessita de ajustes para aplicação com precisão” (MATSUMOTO, L. S, MARQUES, R. D., 2015).

Estes tipos de microrganismos nos dão um grande apanhado de informações de como está a saúde da biomassa de um determinado local, fornecendo uma base para efetuar alguma intervenção no local estudado. Como os microrganismos são bastante numerosos e são sujeitos a alterações, faz dele um possível indicador, na pesquisa BARROS et al, 2010, um dos objetivos seria gerar indicadores biológicos para a qualidade do solo, uma vez que foi observado o grande potencial desses microrganismo em indicar essa alteração no meio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Documentações e requisitos para viagem à mineradora

Meses antes da primeira coleta das amostras de solo na mineradora, a empresa pediu para que seguíssemos alguns protocolos deles, primeiramente teríamos que agendar com eles um período para irmos a Paragominas, de acordo com o período que escolhêssemos, a empresa iria dizer se estava disponível aquele período e diria a data para irmos a mineradora. Assim que a data pré determinada foi confirmada, a empresa solicitou exames do tipo admissional e solicitou que colocássemos a nossa carteira de vacinação em dia pois isso fazia parte dos protocolos para poder adentrar a mineradora. Em paralelo aos exames, a mineradora também pediu para que comprássemos alguns equipamentos de proteção individual, como luvas emborrachadas, óculos, capacetes, botas com bico de ferro que suportasse 100 kg, caneleiras de couro e camisas manga comprida com identificação do grupo de pesquisa e do consorcio BRC, logo após as camisas ficassem prontas, a mineradora pediu que enviássemos fotos dos componentes do grupo que iriam viajar com a respectiva camisa para fins de identificar a pessoa no qual iria fazer a coleta. Após todos os documentos serem enviados e aceitos pela mineradora, a primeira viagem foi autorizada e podíamos entrar na mina de bauxita para a coleta das amostras de solo no mês de setembro de 2018 no auge da seca na região e posteriormente teríamos que voltar a mineradora no auge das chuvas na região para fazermos mais uma coleta, porém como todas as documentações e informações do grupo de pesquisa já estavam no banco de dados da mineradora, não seria preciso enviar novamente os dados.

4.2. Descrição da metodologia de coleta

A metodologia utilizada para coleta do solo foi o padrão grid, no qual é muito utilizado no Brasil dentro dos plantios para identificar variabilidade dos fatores de fertilidade na plantação, pois como áreas de mineração são grandes, esse método é o mais adequado para ser utilizado na pesquisa. Inicialmente foi pensado em ter 20 metros de distância de um ponto de coleta para outro, porém quando estávamos

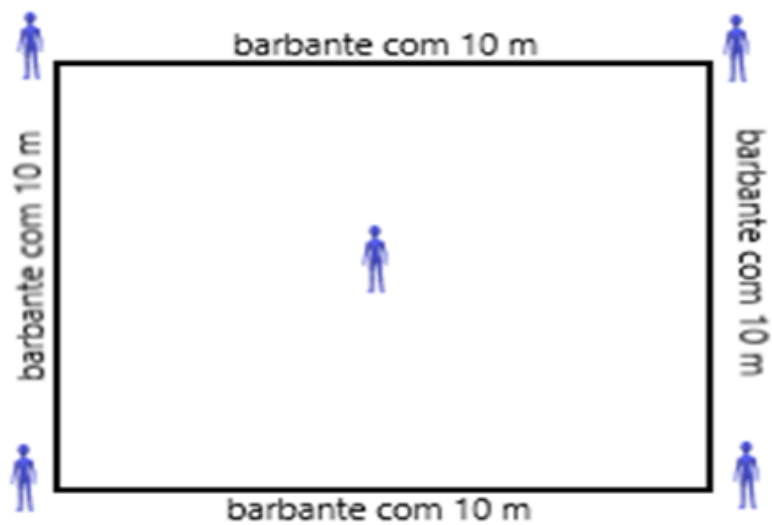
combinando as áreas de coleta, constatamos junto com o engenheiro ambiental da mineradora (**Figura 6**), que em algumas áreas onde queríamos coletar, não possuía dimensões suficientes para que esta metodologia fosse aplicada, então diminuimos de 20 para 10 metros de distância entre os pontos de coleta.

Figura 1- Levantamento das áreas a serem utilizadas para a coleta através do software Google Earth.



Fonte: Autor.

Figura 2- Desenho esquemático da coleta de solo.



Fonte: Autor.

Por fim, o padrão da coleta ficou da seguinte maneira: adentramos 10 metros em cada área escolhida, a equipe se separou em 5 pontos, sendo um no centro da coleta, cada dupla de coletores levava uma ponta de um barbante, quando o barbante ficava esticado, sabíamos que estávamos distantes 10 metros um do outro (**Figura 7**), então com um trado perfuramos o solo em aproximadamente 30 cm (pois de 0 a 30 cm de profundidade é onde ocorre a maior concentração da microbiota) e puxamos de volta a superfície para que a porção de solo fosse depositada em saquinhos plásticos e assim pudessem ser fechados e etiquetados com o nome da área coletada e o número da amostra de solo (**Figura 8**).

Figura 3- Amostras de solo lacradas em sacos plásticos e etiquetadas.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

Feito isso, adentramos mais 10 metros na área e executamos mais uma vez a coleta com 4 pontos, eliminando a coleta do ponto central. Para se ter uma melhor comparação de áreas levando em consideração tempo e método aplicado, escolhemos coletar em duas áreas com diferentes “idades” entre si, sendo elas: plantio de mudas 2009, plantio de mudas 2013, regeneração natural 2009, regeneração natural 2013, nucleação 2013 e nucleação 2016, no qual neste trabalho iremos diferenciar apenas por antigo e recente em cada área, também coletamos em uma área onde a vegetação foi recém retirada para a iniciação da extração de bauxita, no qual a mineradora chama de “supressão” (**Figura 9**).

Figura 4- Área de supressão da mineradora.



Fonte: Alaécio D. P. S. Araújo

Em todas as áreas foram coletadas 9 amostras, obtendo-se um total de 72 amostras de solo.

A coleta de solo na mineradora no mês de setembro, teve a duração de dois dias para ser totalmente feita, ao final da coleta, todas as amostras de solo estavam devidamente etiquetadas e foram armazenadas em caixas térmicas para poder preservar ao máximo os microrganismos durante a viagem de 5 horas de Paragominas até Marabá, onde foi realizada a parte laboratorial do trabalho. Ao chegar em Marabá todas as amostras de solo partiram para o laboratório de biologia geral do curso de Ciências Naturais localizado no campus 2 da Unifesspa em Marabá, e então foram separadas por cada área coletada.

4.3. Análises laboratoriais dos microrganismos

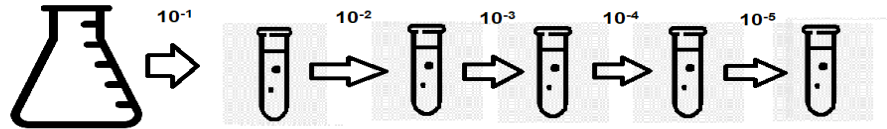
Assim que chegaram as amostras, a equipe começou a preparar o meio de cultura sólido NFB (Nitrogen Fixing Bacteria) para a posterior inoculação dos microrganismos em placa de Petri.

A equipe preparou vários meios de cultura para diversos grupos funcionais e para cada meio de cultura, ocorreu uma diluição específica, pois cada meio é seletivo

para um grupo biogeoquímico de bactéria, se inocularmos uma quantidade de amostra com uma diluição menor em um meio que seja bem seletivo, muitas colônias poderiam crescer, sendo quase impossível sua diferenciação e contagem. Como neste trabalho estamos considerando apenas o grupo de fixadoras de nitrogênio, a diluição para esse grupo se deu até a 10^{-4} , pois uma diluição maior que essa não iria ter um crescimento de colônias suficientes para a análise. Neste trabalho foram adotadas as medidas em volume, a equipe considerou essa medida com base em outros estudos e na premissa que no ambiente em recuperação ambiental, o solo compreende de pequenos fragmentos de vegetais, pedras, bolhas de ar, agregados, pequenos animais que poderiam estar contido nas amostras e isso poderia afetar na precisão dos dados. Também optou-se por não peneirar o material, pois estaria se saindo da normalidade de um ambiente natural, considerando que o fato de colher uma amostra, embalar em um saco plástico, transportar e tratar, já tira totalmente o material de suas condições normais no campo que se pretende estudar e traçar hipóteses. Para a diluição (**Figura 10**), 10 mL de amostra de solo foram acrescentadas dentro de Erlenmeyer contendo 180 mL de solução fisiológica esterilizada na autoclave vertical, formando assim, uma solução concentrada de 200 mL com a amostra de solo, após a mistura no Erlenmeyer, uma alíquota de 1 mL dessa solução concentrada foi transferida para tubos de ensaio no qual continha 9 mL de solução salina esterilizada, a transposição da solução concentrada para os tubos de ensaio, ocorreu com a ajuda de uma micropipeta volumétrica calibrada para 1 mL, e então essa solução é misturada usando um agitador de tubos vórtex, para chegar a diluição desejada, a transposição de 1 mL da solução recém agitada é feita para um outro tubo contendo também 9 mL de solução salina e então o segundo tubo é agitado no vórtex, e assim o procedimento é repetido até atingir a diluição desejada, sempre atentando para não usar a mesma ponteira em tubos diferentes, pois poderia causar alguma alteração na posterior inoculação em placas de Petri, a lógica da diluição se deu na seguinte ordem conforme imagem (**Figura 10**):

Figura 5- Desenho esquemático da diluição da amostra.

DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO



MEIOS DE CULTURA E SUAS DILUIÇÕES

- Saboraud: -3
- Actinomicetos: -3
- Solubilizadores de Fosfato: -3
- Fixadores de Nitrogênio: -4
- Celulolíticos: -4
- Proteolíticos: -4
- Amilolíticos: - 4
- Luria Bertani (LB): - 5

Fonte: Autor.

Por fim usando uma micropipeta volumétrica calibrada em 50 μL é feita a inoculação das soluções em placas de Petri nos diferentes meios de cultura, lembrando que para cada meio em que foi inoculado, ocorreu uma diluição maior ou menor da amostra. A inoculação do meio para fixadores de nitrogênio se deu com 50 μL da amostra diluída a 10^{-4} sendo inoculada no meio de cultura e espalhada levemente por toda a placa com o auxílio da alça de Drigalski devidamente esterilizada no bico de Bunsen, essa técnica é chamada de “espalhamento”, feito isso, a placa é fechada e lacrada com a película Parafilm e levada para a incubadora BOD à 29 °C para crescimento dos microrganismos.

Figura 6- Placa de Petri com colônias de bactérias fixadoras de nitrogênio.



Fonte: Alaécio D. P. S. Araújo

Após cinco dias de incubação as colônias cresceram, e assim conseguimos observar as bactérias que tiveram sua atividade enzimática aparente pois o meio seletivo utilizado contém azul de bromotimol (**Figura 11**), que por sua vez adquire uma coloração esverdeada em pH neutro e azul em pH alcalino, como as bactérias fixadoras de nitrogênio produzem amônia ou nitrato, conseqüentemente o meio onde elas estão inseridas fica elevado e então é formado um halo enzimático azul em volta da colônia, assim é possível diferenciar qual bactéria é fixadora de nitrogênio e qual não é, como a bactéria está crescendo em um meio de cultivo desprovido de nitrogênio, e em seu genoma ela possui os genes que traduzem as proteínas nitrogenase, elas fizeram o processo de tradução e passaram a consumir o N_2 do ar. Em seguida houve a contagem de abundância e diversidade de bactérias por meio de observação a olho nu, cada característica visível como o formato da colônia, a cor e a textura e o halo formado em volta da colônia, eram levados em consideração na contagem dos microrganismos, cada bactéria era identificada com um número e a sigla da área em que ela foi coletada. Após terminada a contagem, as bactérias eram preparadas para a análise em microscópio para saber suas características gram positivas ou negativas, e posteriormente ocorreu a inoculação das mesmas em placas de Petri com meio de cultivo Mueller Hinton, para crescimento de colônias e posteriormente à preservação em glicerol a $-20C^{\circ}$, a partir da contagem e diferenciação de características das bactérias, houve a análise gráfica dos números

em relação a cada área, para a observação da diversidade e abundância de bactérias fixadoras de nitrogênio por meio de dados estatísticos, lembrando que estes mesmos procedimentos foram feitos também na coleta do período chuvoso.

4.4 Análise de dados das bactérias fixadoras de nitrogênio

A análise de dados começou desde a contagem, assim que tivemos os números certos das colônias que são fixadoras, transformamos para dados estatísticos no formato de planilhas no programa Excel para se ter uma visão mais ampla e mais organizada dos dados. Os dados foram calculados da seguinte maneira, o número de colônias fixadoras foi multiplicado pelo número da diluição correspondente ao meio inoculado e pela parte de 1 mL que foi inoculada na placa, sendo assim, como a inoculação na placa de Petri foi de 50 μ L que é a vigésima parte de 1 mL, então a multiplicação se deu por 20, e como a diluição para os fixadores de nitrogênio foi de 10^{-4} foram acrescentados 4 zeros, ao final desses cálculos chegamos ao número de unidades formadoras de colônias por mL de solo, por exemplo: 5 colônias x 20 (vigésima parte de 1 mL) = 100 UFC (Unidades formadoras de colônias).

Esses números de cada amostra foram somados e divididos por 72, no qual, se refere ao número de amostras total para então fazermos a média estatística, essas médias foram transformadas em gráficos para termos uma noção visual das diferenças obtidas, testes estatísticos também foram feitos para se ter uma análise de variância, essa análise é importante pois através dela é possível saber se as diferenças entre áreas são reais ou é apenas um acaso. Mais uma vez é importante salientar que este mesmo procedimento foi feito nos dois períodos em que ocorreu a coleta e a análise laboratorial, ou seja, no período seco e no período chuvoso.

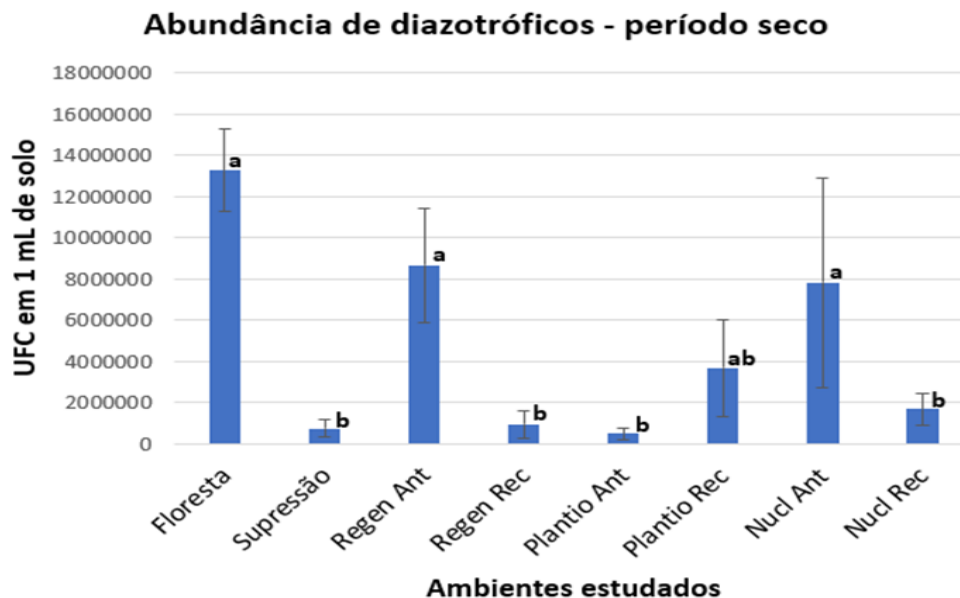
Montadas as planilhas com os números de microrganismos por mL de solo e os números de morfotipos de colônias por mL de solo, iniciou-se uma análise de variância para se comparar esses números nas diversas áreas em estudo. Para essa análise foi utilizado o software PAST (Palaeontological Statistics). O PAST trata-se de um software desenvolvido por Oyvind Hammer e colaboradores, onde se é constantemente atualizado e é bastante utilizado pelos pesquisadores para fazer as

suas análises estatísticas por possuir diversas opções de modelos estatísticos (HAMMER, 2001) . A partir dos resultados obtidos, os mesmos utilizados para enriquecer os gráficos que foram elaborados com as médias e o erro padrão, gerando dados visuais mais precisos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ambiente com maior número em abundância de bactérias diazotróficas por mL de solo no período seco foi a Floresta (**Figura 12**). Apesar das áreas em estudo neste trabalho ser as áreas onde foi extraído bauxita a alguns anos, para se entender a dinâmica dos microrganismos no solo precisamos fazer algumas comparações, nossas referências foram, uma área de floresta próximo das áreas em estudo e uma área onde ainda não se explorou a bauxita mas já foi removida a floresta, chamada pelas equipes da empresa mineradora de “área de supressão vegetal” e aqui no trabalho, somente “supressão”.

Figura 7- Gráfico de abundância de fixadores de nitrogênio no período seco em todas as áreas.

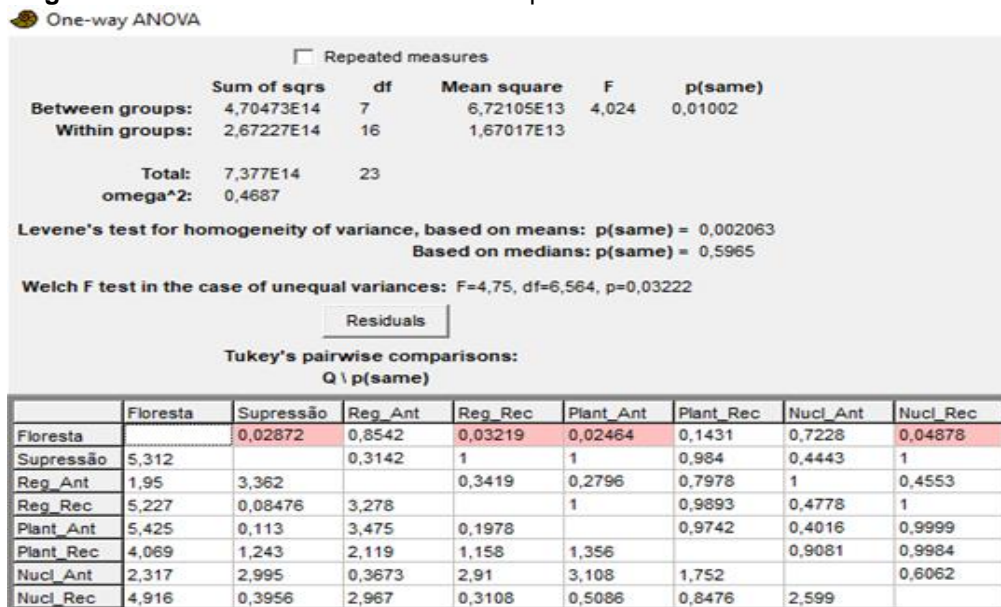


Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares

Aplicado um teste estatístico aos números de bactérias diazotróficas por mL de solo em cada área, utilizando o software PAST V.4.03, foi possível comparar as

áreas pela técnica da “Análise de variância” (**Figura 13**), este procedimento estatístico leva em consideração vários fatores mas, principalmente a distância que cada número tem da média em uma amostra, e culmina por permitir interpretarmos se a diferença entre a média de uma amostra é “significativa”, ou seja, real em relação a outra amostra ou somente obra do acaso, assim como SABINO e colaboradores. (2016) utilizou o software para calcular a diversidade de uma comunidade de microrganismos em uma área de caatinga e utilizou-se também para a comparação entre áreas em sua pesquisa, bem como SANTOS (2019) que também usou o mesmo software para fazer uma comparação com a mesma finalidade, o que mostra que o PAST é bem eficiente nas análises estatísticas:

Figura 8- Análise estatística dos dados do período seco no software PAST.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares

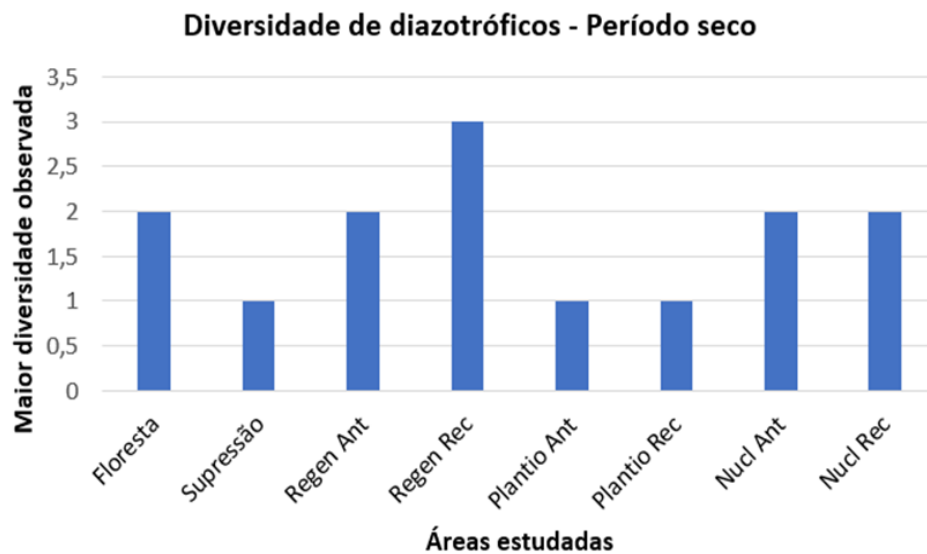
No software PAST, quando duas amostras são significativamente diferentes, elas aparecem em cor de rosa no quadro de análises (**figura 13**), em trabalhos científicos, estas diferenças costumam ser demonstradas nos gráficos ou tabelas que trazem os valores representado por letras (**figura 12**). Neste caso, apesar de na Floresta ter sido observado os maiores números de diazotróficos por mL de solo, a Floresta não difere significativamente da Regeneração Natural Antiga, nem do Plantio recente e nem da Nucleação Antiga já que todos apresentaram a letra **a**. Isso ocorre, pois, as intervenções feitas para recuperação florestal já apresentam resultados significativos aos 6 anos de idade e resultados parecidos com a floresta nativa aos 24

anos, como mostra o resultado da pesquisa feita por BIZUTI (2017). Logo as áreas de recuperação mais velhas tendem a ter um melhor desempenho por ter mais tempo para seu crescimento e seu solo possuir uma maior população de microrganismos que toleram mais a seca, como esse período na região é muito severo e com poucas incidências de chuvas, todas as áreas incluindo a floresta, passam por um estresse hídrico e dessa maneira passa a valer a dinâmica da espécie mais adaptada, o microrganismo que se adaptar melhor a esse período de seca não terá concorrentes e irá perpetuar-se naquele meio.

Quando as colônias foram contadas visualmente nas placas de Petri, além do número de colônias, foi também considerado a quantidade de morfotipos, ou seja, quantos tipos diferentes de colônias estavam se formando, permitindo assim se estimar a diversidade de microrganismos diazotróficos por mL de solo nas áreas em estudo. Estes números, representados no gráfico da **figura 14**, mostram que diferente da abundância, a maior diversidade de bactérias diazotróficas observada no período seco, foi na área de Regeneração Natural Recente, pois é onde se encontram as gramíneas.

MELLONI e colaboradores (2004) mostraram que no verão, onde se tem maior incidência do sol, as áreas com seis meses de reabilitação com esse vegetal, registraram rápida proliferação desse tipo de bactéria, pelo possível fato de se ter mais afinidade entre as raízes das gramíneas e as bactérias diazotróficas. Como aqui foi considerado a maior diversidade observada e não uma média de várias contagens como na abundância, não cabe análise estatística deste dado. Floresta, Regeneração Natural Antiga, Nucleação antiga e Nucleação recente apresentaram a mesma diversidade, com apenas dois morfotipos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico.

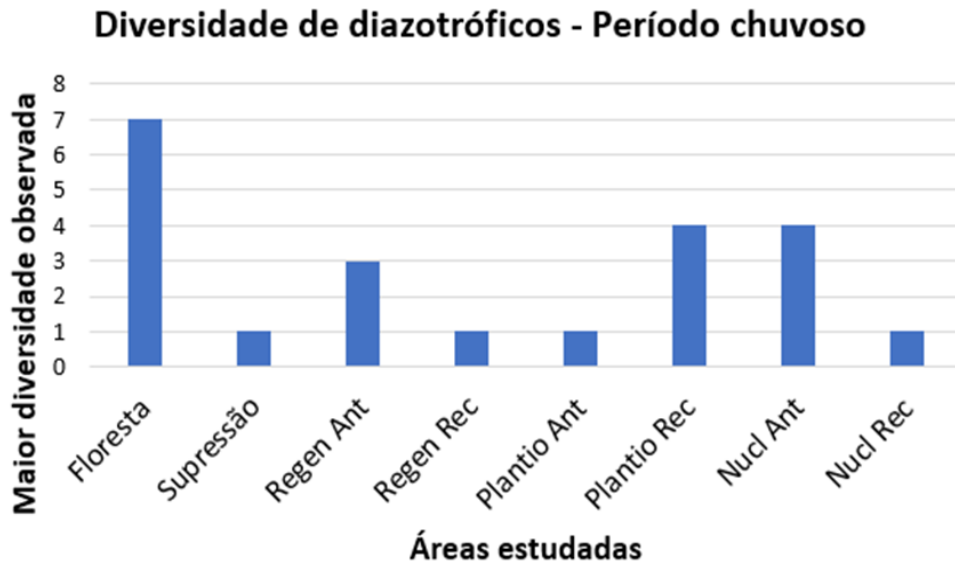
Figura 9- Gráfico de diversidade de fixadores de nitrogênio no período seco em todas as áreas.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

A diversidade de microrganismos quando há disponibilidade de água e nutrientes no ambiente muda muito, o que antes havia grande abundância de poucos tipos de bactérias, parece se ganhar em vários tipos nesse período, mas em menores populações, pelo fato da afirmação acima, quando há maior disponibilidade de nutrientes, as bactérias têm mais condições de se perpetuar, por esse motivo, pode se ver um maior quantitativo de bactérias diferentes no meio, como se pode ver no gráfico de diversidade no período chuvoso representado na **figura 15**:

Figura 10- Gráfico de diversidade de fixadores de nitrogênio no período chuvoso em todas as áreas.

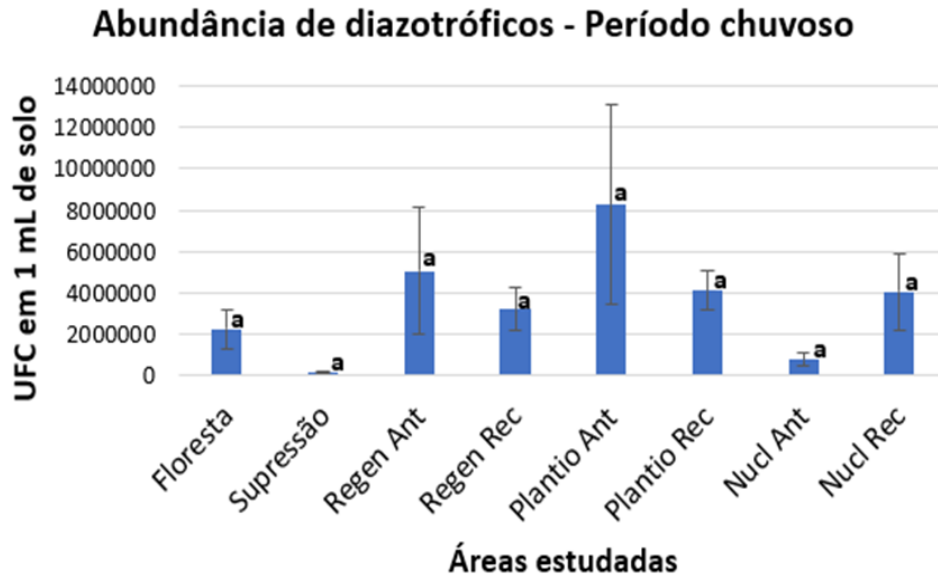


Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

A Floresta que apresentou uma baixa abundância de diazotróficos por mL de solo, apresentou uma alta diversidade com 7 diferentes morfotipos de colônias (**Figura 15**). Algumas áreas que apresentaram grande abundância como Plantio Antigo, quanto à diversidade, se comparam agora à área de supressão vegetal.

A floresta, que no período seco tinha a maior quantidade de UFC por mL de solo, passa a ter uma das menores quantidades, e a área onde agora se observa a maior abundância de diazotróficos é Plantio Antigo. Supressão continua sendo a área com menor abundância, seguido de nucleação antiga. No entanto, neste período onde não falta água nos ecossistemas, conseqüentemente, tem maior disponibilidade de nutrientes, a variação nos números é muito alta (**Figura 16**), em uma mesma área pode se ter uma amostra com muitos microrganismos por mL e outra bem próxima com nenhum ou bem pouco. Diferentemente de outras pesquisas, no qual foi concluído que a variação sazonal não influenciou na diversidade nem na abundância de diazotróficos (MELLONI et al, 2004).

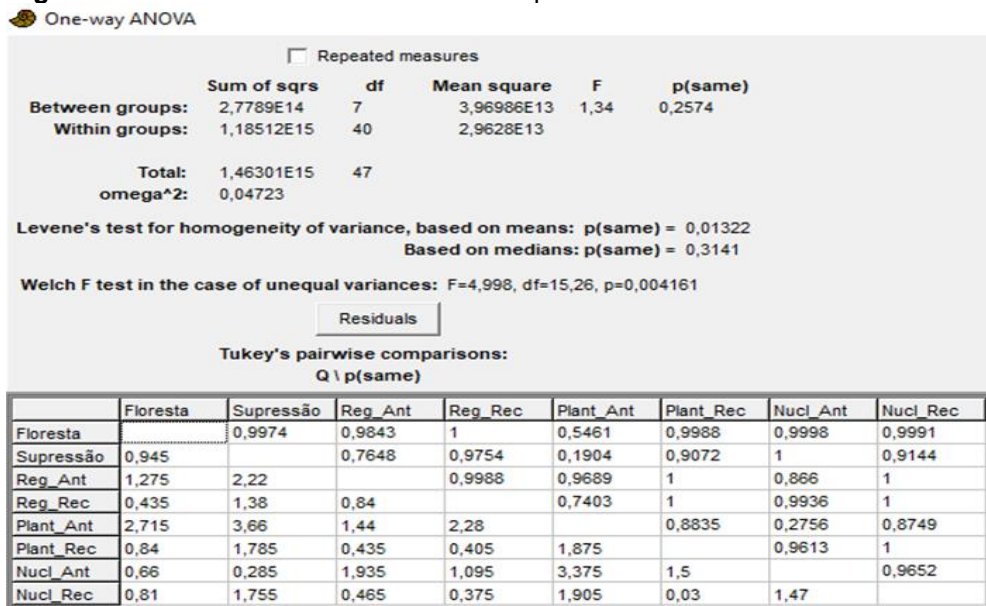
Figura 11- Gráfico de abundância de fixadores de nitrogênio no período chuvoso em todas as áreas.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares

Fato este que se reflete na análise estatística, todas as áreas estudadas receberam em suas médias a letra “a”, expressa pelas diferenças não significativas ($p > 0.05$) entre estas médias reveladas pela análise de variância (**figura 17**) do software PAST.

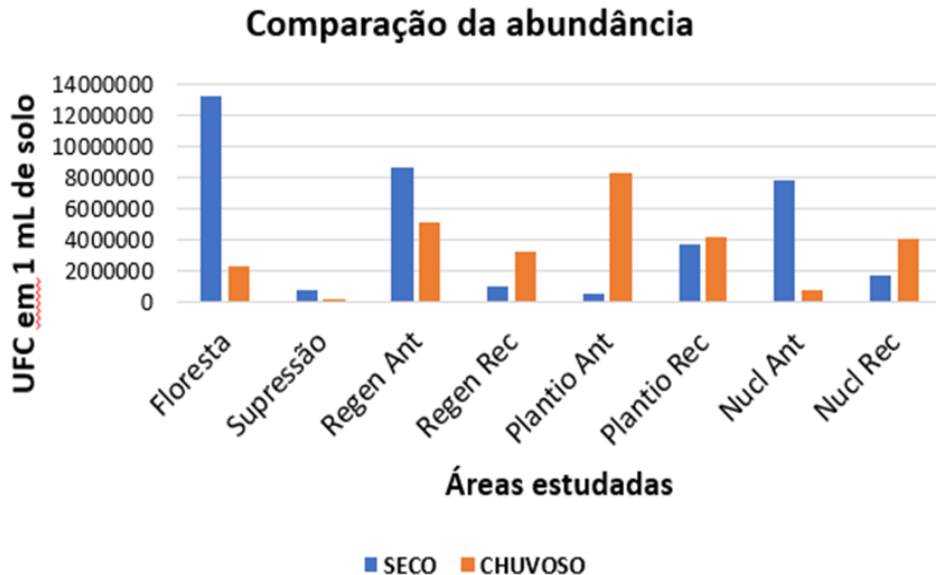
Figura 12- Análise estatística dos dados do período chuvoso no software PAST.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

Ao comparar os dois períodos investigados, seco e chuvoso, tanto em abundância quanto diversidade pode-se destacar quais as áreas que se comportam de maneira semelhante ou diversa, no gráfico da **figura 18**, está sendo comparado o número de UFC por ml de solo nos períodos seco e chuvoso.

Figura 13- Comparação de abundância entre áreas nos dois períodos.

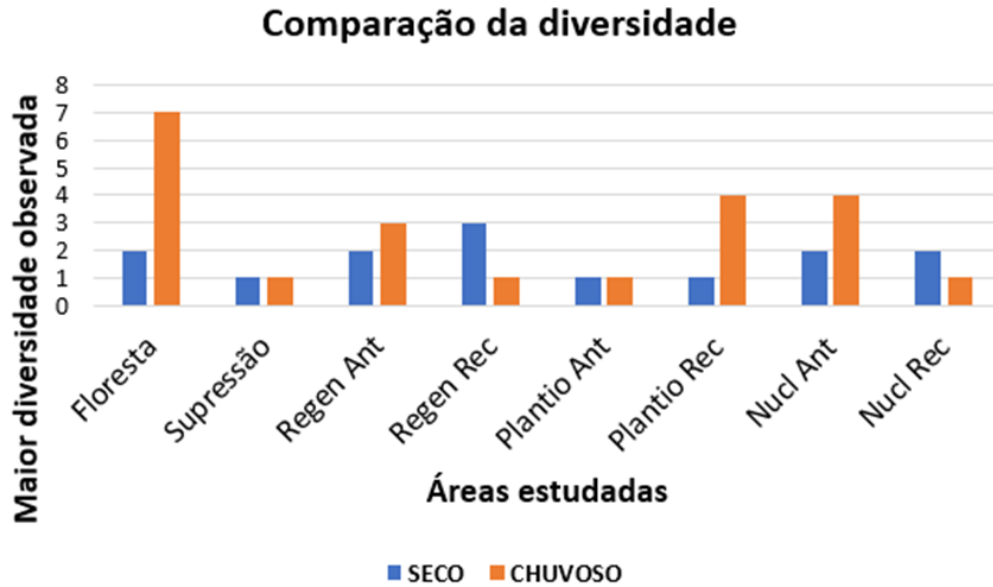


Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

As áreas que se comportam em proporcionalidade da mesma forma que a Floresta, ou seja, com maior abundância no período seco e menor no período chuvoso, são Regeneração Natural Antiga e Nucleação Antiga, Supressão também em tendência, mas com números muito reduzidos como era esperado de uma área que teve sua vegetação e camada orgânica do solo totalmente removidas.

Quanto à diversidade, a comparação entre os dois períodos vista no gráfico da **figura 19**, revela Regeneração Natural Antiga, Plantio recente e Nucleação Antiga com comportamentos semelhantes ao da Floresta.

Figura 19- Comparação de diversidade entre áreas nos dois períodos.



Fonte: SUBPROJETO - BRC 01/14: Fungos micorrízicos arbusculares.

Analisando os dois gráficos comparativos, tanto em abundância quanto em diversidade, apesar de diferenças nos números, quanto ao comportamento, duas áreas se assemelham à Floresta: Regeneração Natural Antiga e Nucleação Antiga.

A floresta amazônica é um ecossistema antigo, que levou milhões de anos para se definir com as características que tem hoje, é evidente que perturbações, sobretudo as muito grandes como as provocadas pela mineração, não vão ser mitigadas a curto prazo, e talvez nunca o sejam, afinal, foram milhões de anos de formação do solo e adaptação das espécies que influenciam inclusive o clima.

Porém, por dados aqui observados é possível se inferir que algumas técnicas de restauração podem ter maior sucesso no propósito de tornar a área semelhante às florestas que restaram na região e que o tempo é o fator determinante, afinal, as duas áreas que se assemelham à floresta quanto à dinâmica dos microrganismos diazotróficos, Regeneração Natural e Nucleação, são de instalações antigas, que reforça os resultados obtidos por PEREIRA (2019) onde constatou que a área de regeneração natural do ano de 2009, obteve uma alta concentração de matéria orgânica, o que se assemelhava com a floresta.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados e análises obtidas, podemos ver que o período seco é a melhor época para fazer as comparações, pois é onde se observa as maiores diferenças entre áreas de reflorestamento estudadas, como é um período com escassez de água e nutrientes, se torna um ambiente difícil até mesmo para a floresta, e um filtro natural para verificar o desenvolvimento e qualidade das técnicas de reflorestamento.

Levando em consideração os grupos de microrganismos fixadores de nitrogênio, a área mais parecida com a floresta, foi a área antiga de regeneração natural e constatamos também que o tempo é a essência fundamental para esse grupo de microrganismos tentar voltar a um equilíbrio, pois em áreas antigas de técnicas empregadas pela mineradora, foram as que tiveram índices parecidos com as da floresta nativa.

Vale ressaltar que estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio sendo utilizadas como bioindicadores para reflorestamento ainda é bem pouco na literatura, e se torna muito importante ter mais estudos desse grupo de microrganismo para qualidade do solo, pois esse tipo de bactéria é muito importante para a manutenção e qualidade do solo, podendo resistir por períodos onde as chuvas são escassas, se tornando mais uma alternativa para a agropecuária e restauração ambiental como biofertilizante de crescimento natural.

Esta pesquisa é grande importância, pois empresas que precisam reflorestar, ganham um norte para um reflorestamento mais eficaz, e podem direcionar um capital maior para projetos nas comunidades da região. A pesquisa ainda mostra um leque de possibilidades na utilização desse tipo de bactéria, apresentando uma alternativa natural para outros setores da sociedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROPRECISION, 2019. **A importância do grid de amostragem na quantidade das informações.** Disponível em: < <https://www.agroprecision.com.br/a-importancia-do-grid-de-amostragem-na-quantidade-das-informacoes/>>. Acesso em: 22 de dezembro de 2021.

BARROS, Yara Jurema et al. **Indicadores de qualidade de solos em área de mineração e metalurgia de chumbo: I - microrganismos**. Revista Brasileira de Ciência do Solo [online]. 2010, v. 34, n. 4, pp. 1397-1411. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000400036>. acesso em: 23 de mar. 2022.

BATISTA, F. Mineração Paragominas apresenta metodologias de recuperação floresta no XII SINRAD, na UFRA. 26/11/2019. Disponível em: <<https://redepara.com.br/Noticia/206944/mineracao-paragominas-apresenta-metodologias-de-recuperacao-florestal-no-xii-sinrad-na-ufra>>. Acesso em 09 de novembro de 2021.

BIZUTI, D, T, G. **É possível reverter a degradação de solo provocada pela mineração de bauxita por meio da restauração florestal?**. Tese (doutorado em ecologia aplicada) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p. 88, 2017.

CAIUSCA, A. **Nitrogênio**. Educa+Brasil, 2019. Disponível em: <<https://www.educamaisbrasil.com.br/enem/quimica/nitrogenio>>. Acesso em: 13 de novembro de 2021.

CAVEANGA, L, H. **Aplicações do alumínio e um raio-x do mercado para 2021**. CIMM, 2021. Disponível em: <<https://www.cimm.com.br/portal/artigos/21056-aplicacoes-aluminio-raio-x-mercado-2021>>. Acesso em: 12 de novembro de 2021.

CHAZDON, R. L.; GUARIGUATA, M. R. **Natural regeneration as a tool for large-scale forest restoration in the tropics: prospects and challenges**. Biotrópica48(6): 716-730, 2016.

CONSTANTINO, V, R, L; ARAKI, K; SILVA, D, DE O; OLIVEIRA, W DE. **Preparação de compostos de alumínio a partir da bauxita: considerações sobre alguns aspectos envolvidos em um experimento didático**. Química nova. São Paulo, Vol. 25, N° 3, 490-498, 2002.

CROPLIFE BRASIL, 2021. **Nitrogênio: sua fixação biológica está mais perto de você do que imagina**. Disponível em: < <https://croplifebrasil.org/noticias/fixacao-biologica-nitrogenio/>>. Acesso em: 14 de novembro de 2021.

DÖBEREINER, Johanna. **A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável**. Biotecnologia Ciência, p. 2-3, 1997.

EMBRAPA, c2021. **Fixação biológica de nitrogênio**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2021.

GEOSCAN, 17 de setembro de 2019, **Mineração no estado do Pará**. Disponível em: <<https://www.geoscan.com.br/blog/mineracao-no-estado-do-para/>>. Acesso em: 11 de novembro de 2021.

GOMES, R, R, F. **Clima no Pará**. Infoescola, c2021. Disponível em: < <https://www.infoescola.com/geografia/clima-do-para/>>. Acesso em: 23 de dezembro de 2021.

HAMMER, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: **Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. V & ELSAS, K. D. V. **Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth**. Trends in Microbiology v.16 n.10, p. 463-471, 2008.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, I. de C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2001.

IBRAM, 2021, **Setor mineral: valores de produção, de exportações e de tributos quase dobram no 1º semestre de 2021**. Disponível em: <<https://ibram.org.br/noticia/setor-mineral-valores-de-producao-de-exportacoes-e-de-tributos-quase-dobram-no-1o-semester-de-2021/#:~:text=Exporta%C3%A7%C3%B5es%20de%20min%C3%A9rios&text=Foram%20exportadas>>

%20174%2C5%20milh%C3%B5es,do%20setor%20exportado%20pelo%20Brasil>. Acesso em: 09 de novembro de 2021.

LESSA, Ruth Néia Teixeira. **Ciclo do nitrogênio**. Setembro, 2007. Pelotas.

LOBATO, B. **Atividade microbiana indica a saúde dos solos**. Embrapa, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/3311811/atividade-microbiana-indica-a-saude-dos-solos>>. Acesso em 13 de dezembro de 2021.

MARCHETTI, Marithsa Maiara; BARP, Elisete Ana. **Efeito rizosfera: a importância de bactérias fixadoras de nitrogênio para o solo/planta–revisão**. Ignis: Periódico Científico de Arquitetura e Urbanismo, Engenharias e Tecnologia da Informação, p. 61-71, 2015.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio e sua importância para a agricultura tropical**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 24 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/598661>> . Acesso em: 12 de novembro de 2021.

MELLONI, R. et al. **Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 28, n. 1, p. 85-93, 2004.

MOREIRA, Fátima Maria de souza et al. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações**. Comunicata Scientiae, v. 1, n. 2, pág. 74-74, 2010.

NASCIMENTO, P, S. **Fixação do nitrogênio**. Infoescola, c2021. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/biologia/fixacao-do-nitrogenio/>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2021.

PEREIRA, I, C, DE B; SOUZA, L, DO S, F. **Fertilidade do solo construído em áreas degradadas sob recuperação após mineração de bauxita em Paragominas-PA**. Monografia, (graduação em agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazonia, Belém, p. 38, 2019.

PIMENTEL, N, E. **Utilização do minerador de superfície (sistema de lavra contínua) na mina de bauxita Paragominas**. Monografia (especialista em lavra e tecnologia mineral) Universidade Federal do Pará – Paragominas, p. 30, 2013.

REVISTA ALUMINIO, 2019, **Especial mineração de bauxita: como é feita a extração e qual a importância da atividade para o brasil**. Disponível em: <<https://revistaaluminio.com.br/especial-mineracao-de-bauxita-como-e-feita-a-extracao-e-qual-a-importancia-da-atividade-para-o-brasil/>>. Acesso em: 09 de novembro de 2021.

SABINO, Francisco Geovanio da Silva; CUNHA, Maria do Carmo Learth; SANTANA, Gregório Mateus. **Estrutura da Vegetação em Dois Fragmentos de Caatinga Antropizada na Paraíba**. Floresta e Ambiente [online]. 2016, v. 23, n. 4 [Acessado 7 Fevereiro 2022] , pp. 487-497. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2179-8087.017315>>. Epub 07 Jun 2016. ISSN 2179-8087. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.017315>.

SAMPAIO, J, A; ANDRADE, M, CALIXTO DE; DUTRA, A, J, B. **Bauxita**. Rochas & Minerais Industriais: Usos e Especificações. Rio de Janeiro, 2º edição, 279-304, 2008.

SANTOS, M, S DOS. **Nitrogênio: importância, manejo e sintomas de deficiência**. + Soja, 2020. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/nitrogenio-importancia-manejo-e-sintomas-de-deficiencia/>>. Acesso em 13 de novembro de 2021.

SANTOS, Raissa; CABREIRA, Wilbert. **Densidade da fauna invertebrada da serapilheira em função do efeito de borda de diferentes áreas de reflorestamento**. Enciclopédia Biosfera, v. 16, n. 30, 2019.

SIMINERAL, c2021, **MINERAÇÃO NO PARÁ, NO BRASIL E MUNDO**, Disponível em:<<https://simineral.org.br/mineracao/mineracao-para>>. Acesso em 09 de novembro de 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, 2015. **Micro-organismos funcionam como indicadores de qualidade dos solos**. Disponível em: < <https://sbmicrobiologia.org.br/micro-organismos-funcionam-como-indicadores-da-qualidade-dos-solos/>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2021.

SUBPROJETO - BRC 01/14: **Fungos micorrízicos arbusculares em áreas naturais e áreas de restauração após mineração de bauxita no Pará**. Consórcio de Pesquisa em Biodiversidade Brasil-Noruega (BRC). Disponível em: <https://pt.brcbn.com/projetos>

VERMELHO, A. B; PEREIRA, A. F; COELHO, R. R. R; PADRÓN, T.S. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 2006.

VICENTE, M. **Microrganismos das plantas auxiliam o vegetal e podem ser fontes de antibióticos**. EMBRAPA, 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/10456334/microrganismos-das-plantas-auxiliam-o-vegetal-e-podem-ser-fontes-de-antibioticos>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2021.

VINHAL-FREITAS, I. C., & Rodrigues, M. B. (2010). **FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO**. *Agropecuária Técnica*, 31(2), 143-154. <https://doi.org/10.25066/agrotec.v31i2.4515> acesso em: 23 de mar. 2022.