

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE
NITROGÊNIO EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE
CARVÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sabrina de Fátima Barbosa Dahmer

Santa Maria, RS, Brasil

2014

BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE CARVÃO

Sabrina de Fátima Barbosa Dahmer

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência do Solo**.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Zaida Inês Antonioli

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

de Fátima Barbosa Dahmer, Sabrina
BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM
ÁREA DE MINERAÇÃO DE CARVÃO / Sabrina de Fátima Barbosa
Dahmer.-2014.
50 p.; 30cm

Orientador: Zaida Inês Antonioli
Coorientador: Andressa de Oliveira Silveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2014

1. Solos Construídos 2. Diazotróficas 3. Bacteria 4.
Região 16S rRNA I. Inês Antonioli, Zaida II. de
Oliveira Silveira, Andressa III. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pela autora.

© 2014

Todos os direitos reservados a Sabrina de Fátima Barbosa Dahmer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Liberato Salzano, 27, Vila Amaral, Palmeira das Missões – RS. CEP: 98300-000.

E-mail: sabrina_dahmer@hotmail.com

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

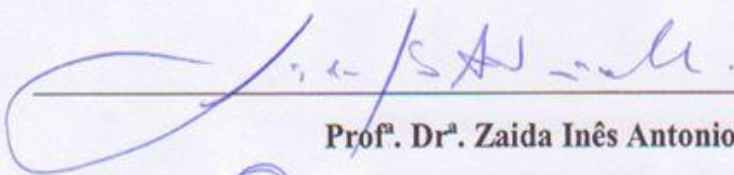
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO
EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE CARVÃO**

Elaborado por
Sabrina de Fátima Barbosa Dahmer

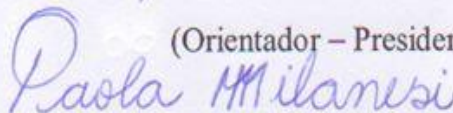
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA

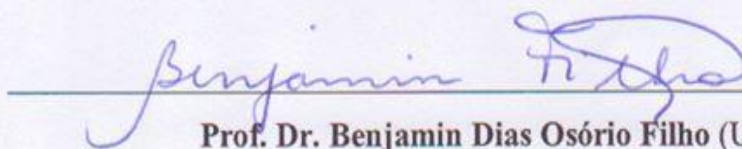


Prof.ª Dr.ª. Zaida Inês Antonioli

(Orientador – Presidente)



Dr.ª. Paola Mendes Milanesi (UFSM)



Prof. Dr. Benjamin Dias Osório Filho (UERGS)

Santa Maria, 19 de fevereiro de 2014.

*Aos meus queridos pais, Arlete e Wilmar, pelo exemplo de
superação e força.
A minha saudosa vó Xínica “in memoriam”.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades maravilhosas na minha vida.

Aos meus pais Maria Arlete e Wilmar Dahmer pela educação que me proporcionaram, pelo estudo, pelo incentivo, pela paciência em todos os momentos de minha ausência. Ao meu irmão Tulio Allan Barbosa Dahmer “o neném da casa” e ao restante da família pelo apoio e visita incondicional.

Ao meu namorado Delvany de Castro por todo incentivo, carinho e compreensão.

À minha orientadora Dr^a. Zaida Inês Antonioli pela orientação, ensinamentos, compreensão, confiança para realização desse trabalho e por todos os momentos de incentivo durante esses 6 anos.

Ao professor Dr. Rodrigo J. S. Jacques pela orientação, pelos ensinamentos, por sua confiança pelo seu otimismo e seu jeito divertido em todos os momentos.

À intensa ajuda e muita paciência de Andressa de Oliveira Silveira e Paulo Ademar Avelar Ferreira durante todas as etapas da realização do trabalho.

Ao auxílio de Taís Backes, Juliane Schmitt, Luana Orlandi e Natielo Almeida Santana na realização das etapas desse trabalho e pelo excelente convívio.

Aos meus queridos colegas de laboratório de Biologia do Solo e do Ambiente: Daiana Bortoluzzi Baldoni, Daniel Pazzini Eckhardt, Daiane Fiuza, Marcos Leandro dos Santos, Ricardo Bemfica Steffen, Antônio Bassaco, Diogo Vendrusculo, Willian Braga, Francisco Wesz, Talita Ferreira e Caroline Rabuscke pelo excelente ambiente de trabalho (alto astral) pelo respeito e também pelo bom trabalho em equipe.

Agradeço aos meus amigos de todas as horas e a todos os colegas que fiz nessa caminhada.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

À CAPES pela concessão da Bolsa de Estudo.

Meu sincero muito obrigada!

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE CARVÃO

AUTORA: SABRINA DE FÁTIMA BARBOSA DAHMER

ORIENTADORA: ZAIDA INÊS ANTONIOLLI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de fevereiro de 2014.

O carvão é o combustível fóssil extraído do subsolo por processos de mineração com a maior disponibilidade no mundo. No estado do Rio Grande do Sul, Brasil, a principal fonte é a Mina de Candiota, com reservas de um bilhão de toneladas passíveis de serem mineradas a céu aberto. Essa atividade resulta em ambientes construídos com elevado grau de desestruturação, pH ácido, toxicidade de metais pesados e susceptível a processos erosivos. A exposição deste às condições atmosféricas e a minerais sulfetados possibilita a formação de drenagem ácida de mina, alterando e comprometendo a qualidade da água, do solo e do ar. Visando reestabelecer e preservar as condições ambientais desejáveis torna-se necessário a recuperação dessas áreas de mineração. Uma alternativa é a introdução de bactérias fixadoras de nitrogênio que beneficiam o crescimento de plantas leguminosas. Nesta perspectiva, este trabalho teve por objetivo investigar a biodiversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em solos construídos após a mineração de carvão. As amostras de solos contruídos foram coletadas e após, em solução, adicionadas em substrato com plantas-iscas de siratro e de ervilhaca para realizar o isolamento das bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN) através dos nódulos. Após, os isolados foram submetidos ao teste de pH (3,0; 4,0; 5,0; 7,0 e 9,0) e de metais pesados (Cd, Cu, Pb, Ni e Zn, em 3 dosagens diferentes). Posteriormente os isolados mais eficientes no teste de pH foram submetidos a caracterização molecular e verificação dos genes *nodA* e *nifH*. Os dados obtidos apresentaram um amplo número de isolados tolerantes a diversos valores de pH e diferentes metais com variadas concentrações. A caracterização molecular demonstrou 4 filos α - β - γ -Proteobacteria e Firmicutes, prevalecendo o filo α -proteobacteria, principalmente por *Bradyrhizobium* sp., devido maior adaptação em ambientes ácidos, característica predominante das áreas degradadas após a mineração de carvão.

Palavras-chave: Solos Construídos. Diazótroficas. Bacteria. Região 16S rRNA.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduate Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria

BIODIVERSITY OF NITROGEN-FIXING BACTERIA IN COAL MINING AREA

AUTHOR: SABRINA DE FÁTIMA BARBOSA DAHMER

ADVISOR: ZAIDA INÊS ANTONIOLLI

Date and Local of the Defense: Santa Maria, february 19th 2014.

Coal is a fossil fuel extracted from underground by mining processes with the greatest availability in the world. In the state of Rio Grande do Sul, Brazil, the main source is the Candiota Mine with reserves of a billion tonnes likely to be mined in the open. This activity results in built environments with a high degree of disorganization, acid pH, heavy metal toxicity and susceptible to erosion. Exposing this weathering and sulphide minerals facilitates the formation of acid mine drainage, changing and affecting the quality of water, soil and air. Aiming to restore and preserve the desirable environmental conditions it is necessary to recover those mining areas. An alternative is the introduction of nitrogen-fixing bacteria that benefit the growth of leguminous plants. In this perspective, this study aimed to investigate the biodiversity of nitrogen fixing bacteria in soils built after coal mining. Contruidos soil samples were collected and after, in solution, added on substrate with plants-baits siratro and vetch to perform the isolation of nitrogen-fixing bacteria (BNF) through nodes. After the isolates were subjected to the pH (3.0, 4.0, 5.0, 7.0 and 9.0) testing and heavy metals (Cd, Cu, Pb, Ni and Zn in 3 different dosages). Later isolates efficient at pH test were subjected to molecular characterization and verification of Noda and nifH genes. The data obtained showed a large number of isolates tolerant to different pH values and different metals with different concentrations. Molecular characterization showed 4 phyla α - β - γ -Proteobacteria and Firmicutes, whichever phylum α -proteobacteria, mainly Bradyrhizobium sp. Due greater adaptation in acidic environments, the predominant characteristic of degraded areas after coal mining.

Keywords: Built soils. Diazotrophic. Bacteria. 16S rRNA.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características químicas dos solos contruídos coletado na área de mineração de carvão na região de Candiota, RS.....	20
TABELA 2 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise da reação em cadeia da polimerase.....	25
TABELA 3 - Caracterização molecular de isolados bacterianos proveniente de solos de área de mineração de carvão, mina de Candiota, RS.	32

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
ARTIGO 1 - BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE CARVÃO, CANDIOTA, RS*	16
1. RESUMO	16
2. INTRODUÇÃO.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Área de mineração de carvão Candiota – RS	18
3.2 Amostragem de solo em área de mineração de carvão.....	19
3.3 Isolamento e cultivo das bactérias fixadoras de nitrogênio.....	20
3.4 Testes de tolerância a pH e metais pesados nos isolados bacterianos.....	22
3.5 Autenticação dos isolados bacterianos	23
3.6 Métodos moleculares.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Características das áreas de coleta de solos construídos	25
4.2 Características fenotípicas	26
4.3 Teste de pH.....	27
4.4 Teste de metais	28
4.5 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem.....	30
4.6 Caracterização molecular da região 16s rRNA e detecção dos genes <i>nodAe nifH</i>	30
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

INTRODUÇÃO

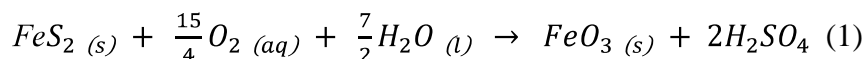
O carvão mineral é extraído do subsolo por processos de mineração e é o combustível fóssil com a maior disponibilidade do mundo. As reservas totalizam 847,5 bilhões de toneladas, quantidade suficiente para atender a demanda brasileira atual por 130 anos (ANEEL, 2012). Ao contrário do que ocorre com o petróleo e o gás natural, estas reservas não estão concentradas em poucas regiões do mundo.

No Brasil, as principais reservas de carvão mineral encontram-se nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com 28,8 e 3,4 bilhões de toneladas (89,0 e 10,5% do estoque do país), respectivamente para um total das reservas brasileiras de 32,6 bilhões de toneladas (SEMC, 2012). Esses estoques correspondem a 50 % dos recursos energéticos não renováveis do Brasil, enquanto que o petróleo e o gás natural correspondem, respectivamente, a 10% e 3% dos recursos energéticos brasileiros (SEMC, 2012; IEA, 2012). No estado do Rio Grande do Sul a principal e maior jazida é a Mina de Candiota, localizada no município de Candiota, a 400 quilômetros ao sul de Porto Alegre. As reservas de carvão são de um bilhão de toneladas, passíveis de serem mineradas a céu aberto, em profundidades de até 50 metros (CRM, 2012).

O processo de lavra a céu aberto é realizado em cortes sucessivos em sistemas de vaivém obedecendo aos seguintes procedimentos: a) retirada do solo superficial (horizonte A); b) retirada dos horizontes B e C; c) perfuração e detonação do arenito; d) exposição do carvão através de uma máquina de excavação chamada *walking drag-line*; e) perfuração, detonação e extração do carvão do banco superior (BS) e do banco inferior (BI), com separação do argilito intermediário. Para a reconstrução da área são realizadas as seguintes etapas: a) recomposição topográfica, constituída pelos materiais estéreis, esses compostos por materiais carbonosos e mineral (pirita e argilominerais), pelos rejeitos (rocha fragmentada, compostos sulfurados e carvão de baixa qualidade), e a deposição de cinzas; b) deposição dos horizontes A, B e C sobre a área recomposta topograficamente; c) estabelecimento de práticas agrônômicas de preparo, conservação e correção do solo; e d) plantio de espécies vegetais (SANTOS, 2006).

Os principais impactos ambientais da extração de carvão a céu aberto são gerados a partir dos materiais estéreis. Este material é rico em sulfetos de ferro e na presença do oxigênio, da água e da ação da bactéria *Thiobacillus ferrooxidans* (Bryner e Jameson) é oxidado, formando uma solução aquosa de ácido sulfúrico (Equação 1) em um processo chamado drenagem ácida de mina (DAM). Essa solução aquosa ácida

(DAM) compromete a qualidade de águas superficiais e subterrâneas, solos e sedimentos, pois acidifica esses ambientes e dissolve metais pesados.



Pirita

Ácido sulfúrico

O tipo e a quantidade de sulfeto de ferro presente no material estéril e rejeito acarretará no nível de acidez, na concentração e na composição dos metais da DAM, além da presença ou ausência de materiais alcalinos (FUNGARO; IZIDORO, 2006). Como consequência há aumento no risco de contaminação da atmosfera, de fontes de água superficiais e subterrâneas, e do solo, dificultando o estabelecimento de plantas com potencial para a revegetação das áreas degradadas pela mineração de carvão (SANTOS et al., 2008; LEAL, 2011).

Além das alterações químicas no solo decorrentes da mineração de carvão, há também uma degradação biológica (MENDES FILHO, 2004; SANTOS, 2006). O solo ao ser removido deixa uma destruição total do ambiente local, como consequência tem-se a redução dos teores de matéria orgânica e biomassa microbiana desse ambiente (RIGOTTI, 2002). Essa perda causa uma redução da atividade biológica do solo, onde populações de organismos edáficos e seus processos bioquímicos desempenham diversas funções químicas e físicas, como: decomposição e mineralização da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, produção de substâncias cimentantes (polissacarídeos) ou ligantes (hifas fúngicas). Além disso, a biota edáfica proporciona melhoria da agregação do solo, a porosidade e estabilidade do solo, consequentemente a aeração, a retenção e a disponibilização de água e nutrientes para as plantas, auxiliando assim no estabelecimento e crescimento vegetal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SANTOS et al., 2008; HOLANDA NETO., 2011).

Juntamente, à degradação química e biológica do solo em áreas de mineração de carvão, ocorrem alterações físicas do solo durante a reconstrução da paisagem. Estas alterações são causadas pela retirada, movimentação, deposição e preparo do solo, mistura de horizontes com rejeitos de carvão, subsolo e pedaços de rochas. Além disso, ocorre a diminuição da estabilidade de agregados, aumento da densidade e compactação do solo, alteração dos teores granulométricos em relação ao solo natural (NUNES, 2002), tendo como consequência menor disponibilidade de água e aeração nestes solos (LEITZKE, 2002).

O estabelecimento de plantas, assim como o restabelecimento do equilíbrio ecológico do ecossistema, é dificultado devido aos processos de degradação física, química e biológica que ocorrem no solo após a reconstrução das áreas mineradas. Órgãos fiscalizadores como FEPAM, IBAMA, entre outros, juntamente com as promotorias públicas, e representantes do governo estaduais e federal passaram a se preocupar com a recuperação desse passivo ambiental, incentivando e conduzindo assim ao desenvolvimento de técnicas que auxiliem na reconstrução da qualidade de solos, sedimentos e água nestes locais.

Neste aspecto, a revegetação é uma alternativa de baixo custo de implantação e manutenção, que auxilia no processo de recuperação de áreas degradadas, visando não somente a recuperação paisagística, mas também o controle dos processos erosivos e recuperação das propriedades físicas, químicas, e biológicas do solo (SIQUEIRA et al., 2008). As espécies vegetais selecionadas para implantação devem se adaptar bem às condições prevalentes de solo e ambiente, sendo ainda ideal que estas espécies apresentem capacidade de fixação do nitrogênio (N_2), em razão da carência desse nutriente na maioria dos solos degradados (SIQUEIRA et al., 2008). Com isso, a introdução de plantas em associação com comunidades manejadas de microssimbiontes, como fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), fungos ectomicorrízicos (FECMs) e bactérias fixadoras de N_2 (BFN), constituem numa promissora ferramenta biotecnológica para auxiliar na revegetação de ambientes e ecossistemas degradados (SIQUEIRA et al., 2007).

O nitrogênio é um elemento essencial presente na matéria viva e o que mais influencia o desenvolvimento vegetal, embora em solos brasileiros, inclusive nas áreas de mineração de carvão, seja encontrado em baixa disponibilidade de nitrogênio, acarretando em baixo desenvolvimento vegetal. Uma forma de aumentar os níveis de nitrogênio no solo é a utilização de microrganismos capazes de converter enzimaticamente o nitrogênio atmosférico em amônio, em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

O emprego de bactérias fixadoras de nitrogênio pode ser uma alternativa eficiente e de baixo custo para a remoção de metais pesados do solo, pois alguns grupos de microrganismos têm a capacidade genética e bioquímica para interagirem e sobreviverem aos efeitos tóxicos dos metais, auxiliando o estabelecimento e desenvolvimento vegetal. Estudos relacionados com a capacidade de remediação destes microrganismos oferecem ainda um grande potencial a ser explorado.

Atualmente, o interesse em microrganismos do solo tem aumentado significativamente, uma vez que eles desempenham um importante papel na manutenção da fertilidade do solo. Sendo assim, a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio com o objetivo de auxiliar o estabelecimento e crescimento vegetal torna-se uma das principais alternativas para a recuperação de áreas degradadas pela mineração do carvão. Dentre os diversos grupos filogenéticos bacterianos denominados diazotróficos, e que realizam a FBN, pode-se citar as α -proteobactérias, β -proteobactérias e os Firmicutes. A maioria dos microssimbiontes pertencente ao grupo das α -proteobactérias e são conhecidos como rizóbios. Esses microrganismos, além de possuírem a capacidade de formar nódulos em raízes e fixar nitrogênio atmosférico, possuem uma ampla diversidade genética e metabólica, incluindo os gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium*.

As β -proteobactérias compõem um segundo grupo de bactérias aeróbias ou facultativas, que são versáteis na capacidade de degradação, e também desempenham um papel importante na fixação de nitrogênio. Os principais gêneros desse grupo são *Burkholderia* e *Cupriavidus* (WILLEMS, 2006; GYANESHWAR, 2011).

Os gêneros *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. são pertencentes ao filo Firmicutes e são bactérias promotoras de crescimento que possuem a capacidade de fixar nitrogênio. Xie et al. (1998) detectaram atividade da enzima nitrogenase nas espécies *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. brevis* e *B. firmus*. O gênero *Paenibacillus* possui várias espécies descritas como fixadores de nitrogênio, tais como: *P. polymyxa* (GRAU; WILSON, 1962), *P. macerans*, *P. durus*, *P. peoriae* (MONTEFUSCO et al., 1993), *P. borealis* (ELO et al., 2001), *P. brasiliensis* (VON DER WEID et al., 2002), *P. massiliensis* (ROUX; RAOULT, 2004).

As simbioses diazotróficas ocorrem nas leguminosas e também em algumas plantas não leguminosas, com vasta diversidade hospedeira, o que amplia o potencial das mesmas para recuperação das áreas degradadas. O emprego das leguminosas nestas situações tem vários benefícios como, por exemplo: proteção do solo, enriquecimento de N, rotação/consorciação de culturas, recuperação do solo (SIQUEIRA et al., 2008). O uso de leguminosas favorece também o acúmulo de carbono (C), que beneficia as propriedades físicas e químicas do solo, aprimora atividades biológicas e aumenta a disponibilidade de nutrientes (MACEDO et al., 2008; CAYUELA et al., 2009).

Existem várias formas e finalidades no emprego de plantas associadas a microrganismos fixadores de N₂ na recuperação de áreas degradadas, incluindo leguminosas herbáceas, arbustivas e arbóreas, sendo que estas últimas são capazes de fixar entre 30 a 600 kg.ha-1 e de tolerar uma vasta diversidade de ambientes. As simbioses diazotróficas podem adicionar quantidades superiores a 300 kg.ha-1 de N, o que aumenta os estoques e a ciclagem da matéria orgânica, um importante fator de recuperação do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Zhan e Sun (2011) demonstraram que a maioria dos microrganismos fixadores de nitrogênio isolados de áreas de rejeito de mineração de cobre, auxiliaram no desenvolvimento das plantas atuando como amenizantes de pH, reduzindo a toxicidade por metais pesados, e aumentando o teor de matéria orgânica e água do solo. Algumas espécies, como *Cupriavidus necator* (Davis), são capazes de fixar nitrogênio em ambientes com altas concentrações de metais (FERREIRA et al., 2012). Espécies como *Cupriavidus taiwanensis* (Chen) e *Rhizobium mesoamericanum* (Frank) também demonstraram capacidade de fixar nitrogênio na espécie vegetal *Mimosa pudica*, em solos ricos em metais pesados (KLONOWSKA et al., 2012).

Trabalhos de pesquisa têm demonstrado o potencial de microrganismos fixadores de nitrogênio isolados de áreas de mineração de cobre, zinco, cádmio, chumbo e arsênio favorecendo o desenvolvimento das plantas e contribuindo para o aumento do teor de matéria orgânica do solo (TRANNIN et al., 2001; MATSUDA et al., 2002; CARRASCO et al., 2005; MATIAS et al., 2009; FERREIRA et al 2012). No entanto poucos são os relatos na literatura que relacionem a utilização de leguminosas associados com bactérias que fixam nitrogênio e nodulam estas plantas, em áreas degradadas pela mineração de carvão (ZANG et al., 2001; NAVARRO-NOYA et al., 2012). Dessa forma, fica evidente a necessidade desses estudos, tendo em vista o potencial dos microrganismos diazotrófico, para auxiliar o estabelecimento e desenvolvimento de plantas leguminosas nestas áreas. Assim pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em área de extração de carvão, conforme esquema apresentado na Figura 1.

Biodiversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em área de mineração de carvão.

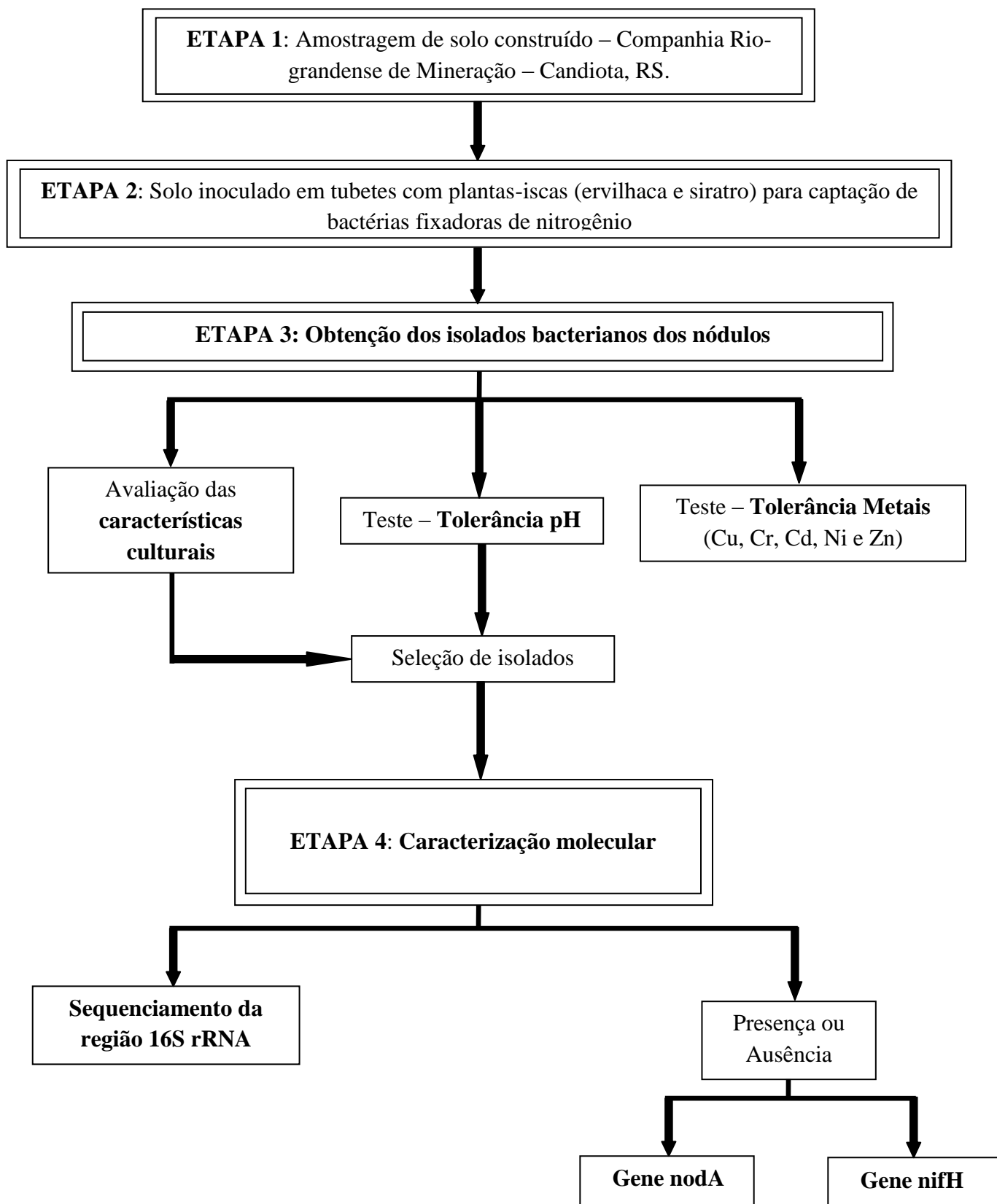


Figura 1 – Esquema das etapas realizadas durante o estudo sobre bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos da área de mineração de carvão em Candiota, RS.

26 2. INTRODUÇÃO

27

28 O carvão mineral constitui dois terços dos recursos energéticos não renováveis do
29 Brasil, sendo suas reservas 20 vezes maiores do que as de petróleo e 75 vezes superiores as de
30 gás natural. As reservas totalizam 847,5 bilhões de toneladas, quantidade suficiente para
31 atender a produção atual por 130 anos (1). No Brasil, a principal reserva encontra-se no estado
32 do Rio Grande do Sul, na mina de Candiota, com uma reserva estimada de um bilhão de
33 toneladas passíveis de serem mineradas a céu aberto, em até 50 metros de profundidade, (2).
34 Durante as etapas de lavra e beneficiamento do carvão são produzidos resíduos sólidos
35 estéreis e rejeitos ricos em sulfetos (pirita, marcassita, esfarelita, arseno-pirita, galena e
36 calcopirita), esses materiais expostos a presença de oxigênio, da água e da ação de bactérias
37 *Thiobacillus ferrooxidans* (Bryner e Jameson), oxidam-se gerando o processo de acidificação de
38 drenagens ácida de mina (DAM), além da DAM ocorre a dissolução destes minerais
39 aumentando a solubilidade de alguns metais em solução (As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Al, Cr, Mn,
40 Mg, etc) (3). Em conseqüência a esse processo, tem-se o risco de contaminação de fontes de
41 águas superficiais e subterrâneas e do solo, sendo que a recuperação dessas áreas se torna
42 mais cara devido à dificuldade de reflorestamento.

43 A utilização de tecnologias biológicas, como o emprego de microrganismos como
44 fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), fungos ectomicorrízicos (FECMs) e bactérias
45 fixadoras de N₂ (BFN), oferece uma alternativa eficiente e de baixo custo para a recuperação
46 destas áreas de mineração (4; 5; 6; 7). Tecnologias baseadas na biorremediação estão
47 geralmente ligadas com a capacidade bioquímica e genética dos microrganismos em
48 interagirem e sobreviverem aos efeitos adversos do ambiente (8). Estudos relacionados com a
49 capacidade de remediação por estes microrganismos oferecem ainda, um grande potencial a
50 ser explorado. Com isso, a introdução de plantas em associação com bactérias fixadoras de

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

51 nitrogênio, constitui-se numa promissora ferramenta biotecnológica para auxiliar na
52 revegetação de ambientes e ecossistemas degradados (9; 10; 11). Trabalhos de pesquisa têm
53 demonstrado o potencial de microrganismos fixadores de nitrogênio isolados de áreas de
54 mineração de cobre, zinco, cádmio, chumbo e arsênio favorecendo o desenvolvimento de
55 plantas e contribuindo para o aumento do teor de matéria orgânica do solo (11; 12; 13; 14; 15;
56 16).

57 A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é mediada por ampla gama de
58 microrganismos procariotos que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica,
59 genética, bioquímica e filogenética. Esta diversidade garante não só a resiliência da FBN nos
60 ecossistemas, como também a ocorrência deste processo nos mais diferentes habitats
61 terrestres (17; 18). As populações de bactérias fixadoras de nitrogênio nativas de áreas
62 degradadas pela mineração estão, provavelmente, mais adaptadas às condições edáficas e
63 ambientais locais. No entanto, não há registro de levantamentos da ocorrência, diversidade e
64 eficiência de populações de BFN, em solos de mineração de carvão no Brasil e poucos
65 trabalhos relacionados ao assunto no mundo (19). A maior diversidade destas bactérias pode
66 favorecer a simbiose com várias espécies leguminosas e maximizar a fixação biológica do
67 nitrogênio em áreas degradadas. Além disso, quanto maior a diversidade de espécies, maior a
68 resiliência dos processos microbianos do solo. Sendo assim, este trabalho objetiva-se em
69 investigar a biodiversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em área de mineração de
70 carvão.

71

72 **3. MATERIAL E MÉTODOS**

73 **3.1 Área de Mineração de Carvão Candiota – RS**

74

75 A área de mineração de carvão da Companhia Riograndense de Mineração (CRM)
76 situa-se no município de Candiota, a 400 km ao sul de Porto Alegre, cujas coordenadas

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

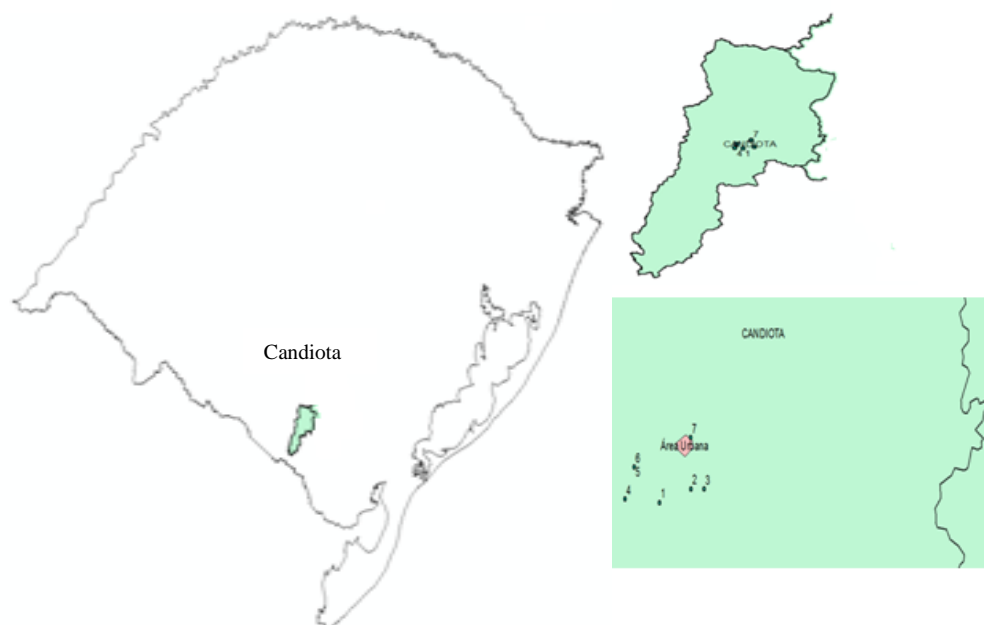
77 geográficas são 31° 33' 55,5"S e 53° 43' 30,6"W. A região apresenta um clima subtropical
78 úmido, tipo Cfa, segundo a classificação de Köppen. A temperatura média anual é de 17.2 °C.
79 O solo original da área de mineração é classificado como Argissolo Vermelho Eutrófico típico
80 (20).

81

82 3.2 Amostragem de Solo em Área de Mineração de Carvão

83

84 Para o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) foram coletadas
85 amostras de solos contruídos, formados por misturas de solos e rochas após a recomposição
86 topográfica da paisagem em áreas mineradas por carvão, em seis pontos geo-referenciados da
87 área de mineração de carvão, além da coleta de solo de uma área de referência, ou seja, uma
88 área adjacente a mineração. As amostragens de solo foram realizadas em áreas com diferentes
89 estágios de recuperação na camada superficial de 0-5 cm de profundidade próximo a
90 rizosfera.



91

92 Figura 1.: Pontos referentes as 7 áreas de coletas dos solos contruídos na mina de
93 carvão em Candiota, RS.

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

94 Antes da coleta das amostras em cada ponto, foi retirada a serrapilheira do local. Para
 95 coleta de solo, foi utilizada uma pá de corte que foi desinfetada com álcool 96% e fogo para
 96 evitar contaminação microbiológica. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos
 97 estéreis e identificadas de acordo com o ponto de coleta. Nestes locais também foram
 98 coletadas amostras de solo para a realização de análises química no Laboratório de Química e
 99 Fertilidade do Solo da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM (Tabela 1). As amostras
 100 de solos foram transportadas e armazenadas no Laboratório Biologia e Microbiologia do Solo
 101 Prof. Marcos Rubens Fries, CCR/UFSM e mantidas sob refrigeração (4 °C) até a realização
 102 das análises.

TABELA 1: Características químicas dos solos contruídos coletado na área de mineração de carvão na região de Candiota, RS.

Área	Característica da área de coleta	Coordenadas geográficas	pH do Solo	Total de íons metálicos (mg kg ⁻¹)							
				As	Cd	Pb	Cr	Cu	Ni	Mn	Zi
A1	Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação Espontânea (Área experimental)	S 31° 33' 53,9" W 053° 43' 30,5"	7.26	0.11	<0.01	0.27	0.34	10.0	<0.1	179.0	26.0
A2	Solos Construídos – 6 anos - Acácia-negra	S 31° 33' 58,2" W 053° 33' 58,2"	4.69	6.40	<0.01	12.4	16.0	6.0	<0.1	127.0	20.0
A3	Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação espontânea	S 31° 33' 39,3" W 053° 42' 17,3"	4.67	5.00	<0.01	11.8	22.0	8.0	<0.1	196.0	19.0
A4	Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Eucalipto	S 31° 33' 50,4" W 053° 44' 26,5"	3.52	6.30	<0.01	22.0	18.0	10.0	<0.1	16.0	10.0
A5	Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Acácia-negra e Eucalipto	S 31° 33' 15,4" W 053° 44' 11,3"	4.195	3.60	<0.01	10.7	14.0	8.0	<0.1	29.0	10.0
A6	Rejeito estéril* – 20 anos	S 31° 33' 15,4" W 053° 44' 11,3"	3.15	6.00	<0.01	21.2	18.0	8.0	<0.1	21.0	18.0
A7	Campo nativo – Área referência	S 31° 32' 43,0" W 053° 42' 39,6"	4.79	0.53	<0.01	0.26	0.88	8.0	<0.1	7.86	22.0

103 * Rejeito estéril é o material proveniente da mineração de carvão, constituem-se de cinza,
 104 rocha fragmentada, compostos sulfurados e carvão de baixa qualidade

105 3.3 Isolamento e cultivo das Bactérias fixadoras de nitrogênio

106

107 O experimento para o isolamento das bactérias fixadoras de nitrogênio foi conduzido
 108 em tubetes com capacidade de 110 cm³, na casa de vegetação climatizada do Departamento
 * Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

109 de Solos da UFSM, nos meses de abril a maio de 2012. Foram utilizadas como plantas isca
110 *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. (siratro) e de *Vicia sativa* L. (ervilhaca) devido a
111 abrangência de diversidade na captura de microrganismos. Os tubetes continham uma
112 mistura 2:1 de vermiculita e areia, após o preparo dos mesmos, estes foram autoclavados por
113 uma hora a 121 °C.

114 Os tratamentos corresponderam as inoculações com 1 mL de suspensões de solo
115 construído coletado em sete pontos diferentes (Tabela 1), além de duas testemunhas sem
116 inoculação (uma com e outra sem a adição de N mineral) para controle de possível
117 contaminação e para comparações com as plantas inoculadas, todas com três repetições. As
118 suspensões de solo foram preparadas pela mistura de 10 g de solo em 90 mL de solução salina
119 0.85% de NaCl e, em seguida, agitada por 30 min em agitador horizontal.

120 As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com álcool etílico 70% por
121 um minutos e hipoclorito de sódio a 1%, por um minutos. Em seguida, foram lavadas seis
122 vezes, durante 1 minuto cada uma, com água destilada esterilizada. Foram então semeadas
123 quatro sementes por tubete e, posteriormente, feita a inoculação, colocando-se, junto a cada
124 semente, 1 mL de suspensão correspondente a cada tratamento. A cada dois dias foi aplicada
125 solução nutritiva de Hoagland e Arnon (21) nos tubetes, e nos intervalos aplicada água
126 destilada autoclavada.

127 As plantas foram coletadas 50 dias após a emergência, por ocasião do florescimento,
128 para o isolamento das bactérias presentes nos nódulos. Cinco nódulos de cada planta-isca
129 foram utilizados para o isolamento de rizóbios. Estes nódulos foram primeiramente imersos
130 em álcool etílico 95%, por 30 segundos, em H₂O₂ por um minuto, e depois lavados seis vezes
131 em água esterilizada para a retirada do H₂O₂. Os nódulos foram então esmagados com o
132 auxílio de uma pinça esterilizada, em placas contendo meio de cultura 79 (22), sendo o
133 material interno espalhado nas placas para a obtenção de colônias isoladas (23). Após a

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

134 obtenção de colônias isoladas e puras, os isolados foram repicados para placas contendo meio
135 de cultura 79, para caracterização fenotípica cultural e posterior armazenamento sob
136 refrigeração (4 °C). Foram avaliadas as seguintes características culturais dos isolados: taxa de
137 crescimento medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (crescimento muito
138 rápido – 1 dia; rápido – 2 a 3 dias; lento – mais que 4 dias) e modificação do pH do meio
139 (acidificação, alcalinização e neutro).

140

141 **3.4 Testes de tolerância a pH e metais pesados nos isolados bacterianos**

142

143 Para avaliação da tolerância a pH e aos diferentes metais pesados cada estirpe foi
144 crescida em 30 mL de meio 79 com pH 6.8, sob agitação orbital de 100 rpm a 28 °C, durante
145 cinco dias. Posteriormente, alíquotas de 100 µL de suspensão de células foram inoculadas em
146 10 mL de meio líquido. Para o primeiro parâmetro (pH), os isolados foram cultivados nas
147 seguintes faixas de pH: 3.0, 4.0, 5.0 e 9.0. Já para tolerância aos diferentes metais pesados o
148 meio de cultura 79 foi suplementado com diferentes concentrações, testados individualmente.
149 As concentrações testadas de Zn (ZnSO₄) foram 1.0, 3.0 e 5.0 mmol L⁻¹, Cd (CdCl₂) 0.1, 0.5 e
150 3.0 mmol L⁻¹, Cu (CuCl₂) 1.0, 2.5 e 5.0 mmol L⁻¹, Ni (NiCl₂) 3.0, 7.0 e 15 mmol L⁻¹ e, Cr
151 (CrCl₃) 1.0, 2.5 e 5.0 mmol L⁻¹, além de um tratamento controle sem a adição do metal pesado
152 também foi utilizado. Após a adição dos metais, o pH dos meios foi ajustado para 4.0 com
153 solução de HCl 1.0 mol L⁻¹. Para avaliar a suscetibilidade dos isolados aos metais,
154 determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI) a qual é definida como a menor
155 concentração na qual não ocorreu o crescimento das estirpes, após cinco dias de incubação a
156 28 °C. Nesta etapa do estudo determinou-se o número de isolados que apresentaram
157 crescimento em cada pH avaliado e em cada concentração de metal a partir de três repetições.
158 Através do método indireto da turbidez do meio, caracterizou-se a presença ou ausência do

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

159 crescimento bacteriano, e com isso, foi determinado a tolerância ao pH dos isolados
160 bacterianos.

161

162 **3.5 Autenticação dos isolados bacterianos**

163

164 O experimento de autenticação dos isolados bacterianos obtidos do siratro (21
165 isolados) e de ervilhaca (sete isolados), obtidos do isolamento dos nódulos no experimento de
166 captura dos rizóbios e selecionados através do teste de pH, foi realizado em casa de vegetação
167 climatizada na área experimental do Departamento de Solos da UFSM.

168 As plantas foram cultivadas em tubetes de 110 cm³ contendo uma mistura 2:1 de
169 vermiculita e areia. Após o preparo, os tubetes e a solução nutritiva foram autoclavados por
170 uma hora, a 121 °C. As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por
171 cinco minutos e hipoclorito de sódio a 1%, por três minutos, e lavadas com água destilada
172 esterilizada e semeadas, no total de quatro sementes por tubetes. Posteriormente, foi realizada
173 a inoculação das estirpes cultivadas em meio 79 líquido (22), por cinco dias, em agitação
174 constante a 28 °C. Cada semente recebeu 1 mL de inóculo (1×10^9 células mL⁻¹ de suspensão
175 bacteriana). A solução nutritiva dos tubetes foi repostada a cada dois dias com solução
176 autoclavada, e seu volume foi completado durante esse período com água destilada
177 esterilizada. Dez dias após a germinação, realizou-se o desbaste, deixando somente duas
178 plantas por tubete.

179 O experimento foi conduzido por 40 dias, em delineamento inteiramente casualizado,
180 com três repetições por tratamento. Os tratamentos constituíram-se da inoculação de 29
181 isolados, além de dois controles não inoculados, um com N mineral e outro sem N mineral.
182 Após este período, foi avaliada a presença de nódulos.

183

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

184 3.6 Métodos moleculares

185

186 Os isolados foram selecionados baseados na sua tolerância do teste aos diferentes pH.
187 Dessa forma, aqueles que apresentaram um elevado crescimento em pH 3.0 e 4.0, abrangendo
188 todas as áreas estudadas. A identificação a nível genético dos isolados foi determinada pelo
189 sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os isolados foram cultivados em meio 79 líquido
190 a 28 °C, durante 3 dias de forma a obter células na fase logarítmica de crescimento. Para a
191 extração de DNA genômico utilizou-se o *kit* de extração Zr Fungal/Bacterial DNA Miniprep[®]
192 (Zymo Research Corp., USA) seguindo instruções do fabricante.

193 Para a amplificação da região 16S do rRNA foram empregados os oligonucleotídeos
194 iniciadores 27F e 1492R (24). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi
195 realizada utilizando: PCR buffer 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 μM de dNTP, 0.2 μM primers,
196 0.02 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), H₂O ultra-pura estéril e 1 μL de
197 DNA, totalizando um volume final de 25 μL. A amplificação foi realizada em um
198 termociclador Techne[®] Endurance TC-312 com o seguinte perfil térmico: uma etapa de
199 desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40
200 segundos, anelamento a 55 °C por 40 segundos, extensão a 72 °C por 1.5 minutos, e a
201 extensão final a 72 °C por 7 minutos (11). O fragmento amplificado foi separado em gel de
202 agarose 1% e visualizado sob luz UV, confirmando a amplificação. Posteriormente foi
203 submetido à purificação utilizando o kit PureLink[®] PCR Purification Kit (Invitrogen, São
204 Paulo, Brasil) e sequenciado utilizando o equipamento ABI-PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer
205 (Applied Biosystems, USA). As sequências foram analisadas utilizando o programa Staden
206 Package 2.0.0b (25) e após as mesmas foram submetidas ao BLAST para comparação com
207 sequências do GenBank (NCBI). Além disso, foram sequenciados também estirpes de

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

208 referência SEMIA 806 (*Mesorhizobium* sp.) e CIAT 889 (*Rhizobium tropici*) para ser
209 utilizado como comparação positiva com os isolados.

210 A amplificação pela PCR para o gene *nodA* foi realizada utilizando os
211 oligonucleotídeos iniciadores *nodABurkF* e *nodABurkR*, tanto para α e β -Proteobacteria. A
212 amplificação do gene *nifH* para β -Proteobacteria foi realizada com oligonucleotídeos
213 iniciadores *nifH-R* e *nifH-F* e *nifHF* e *nifHI* para α -Proteobacteria (Tabela 2). O produto da
214 PCR foi separado em gel de agarose 1% e visualizado sob luz UV, utilizando um marcador
215 molecular DNA Ladder, 100pb (Invitrogen, São Paulo, Brasil) confirmando a amplificação da
216 região de interesse.

217

TABELA 2.: Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise da reação em cadeia da polimerase.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência	Referência
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	24
	1492R	GGTACCTTGTACGACTT	
nodA	nodABurkF	CRGTGGARGGTBYGYTGGGA	16
	nodABurkR	TCAYARCTCDGGBCCGTTBCG	
nifH	nifH-F	AARGGNGGNATYGGHAARTC	26
	nifH-R	GCRTAVAKNGCCATCATYTC	
	nifHF	TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA	27
	nifHI	AGCATGTCYTCAGYTCNTCCA	

218

219 4. RESULTADOS

220

221 4.1 Características das áreas de coleta de solos construídos

222

223 As áreas de coleta apresentam distintas condições ambientais quanto à exposição
224 temporal e a cobertura vegetal. Das sete áreas de coleta, seis apresentaram pH baixo, variando
225 de 3.15 em A6, até 4.79 em A7 (Tabela 1). Na Tabela 1, encontram-se os resultados da

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

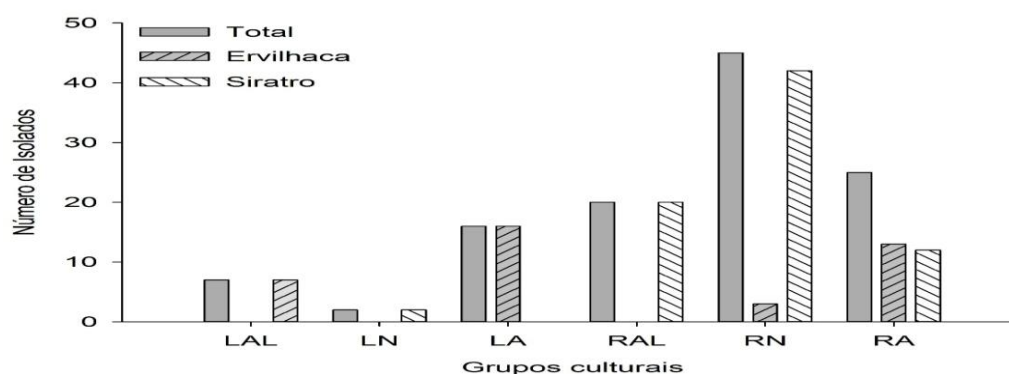
226 análise de solo quanto às concentrações de arsênio (As), chumbo (Pb), cádmio (Cd), cromo
 227 (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), manganês (Mn) e zinco (Zn). Todos os solos apresentaram
 228 teores elevados de As, Mn e Pb, valores moderados para Cr, Cu e Zn e baixos teores de Cd e
 229 Ni (28).

230

231 4.2 Características fenotípicas

232

233 As características fenotípicas de alteração do pH do meio e tempo de crescimento dos
 234 115 isolados foram separados em 6 grupos culturais (Figura 2). Esses foram divididos em:
 235 crescimento rápido e com capacidade de acidificar o meio (RA) (21,7%); crescimento rápido
 236 e que não alteraram o pH do meio (RN) (39,1%); crescimento rápido, com capacidade de
 237 alcalinizar o meio (RAL) (17,3%); crescimento lento, que não alteraram o pH do meio (LN)
 238 (1,8%); crescimento lento, que alcalinizaram o meio (LAL) (6,1%) e crescimento lento, que
 239 alcalinizam o meio (LA) (14%). Apenas os isolados do siratro apresentaram crescimento
 240 lento, que não alteraram o pH do meio (LN) e crescimento rápido, com capacidade de
 241 alcalinizar o meio (RAL), e apenas os isolados de ervilhaca apresentaram o LA.



242

243 Figura 2.: Distribuição dos 115 isolados de solo construídos provenientes de área de
 244 mineração de carvão em grupos culturais baseados no tempo de crescimento das colônias e na
 245 alteração do pH do meio: crescimento rápido e pH ácido (RA); crescimento rápido e pH

246 neutro (RN); crescimento rápido e pH alcalino (RAL); crescimento lento e pH ácido (LA);
247 crescimento lento e pH neutro (LN); crescimento lento e pH alcalino (LAL).

248

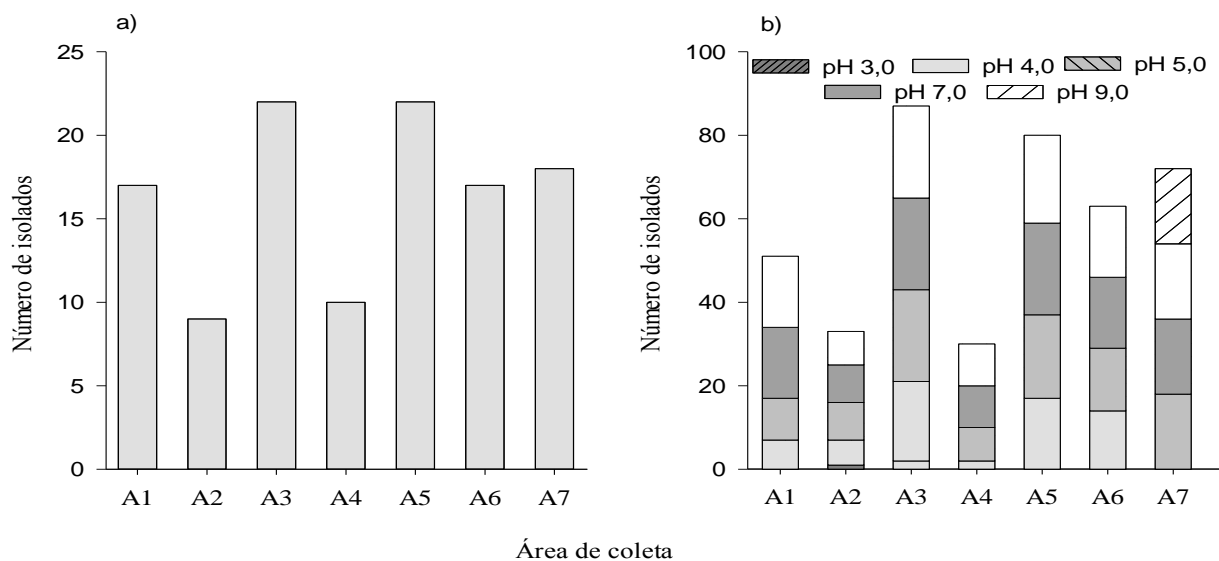
249 **4.3 Teste de pH**

250

251 Os 115 isolados e suas respectivas área de isolamento são apresentadas da Figura 2a,
252 sendo que o maior número de isolados foram encontrados em A1, A3, A5, A6 e 7, áreas estas
253 com baixo pH. A Figura 2b apresenta os isolados tolerantes a pH (Figura 3b), sendo que todos
254 os isolados mostraram tolerância quando submetidos ao valor de pH 7.0, esse utilizado como
255 pH do meio de cultura para o crescimento das bactérias.

256 A maioria dos isolados testados apresentaram tolerância, sendo que 98.2% foram
257 tolerantes ao pH 9.0, 88.6% ao pH 5.0, 72.2% ao pH 4.0 e apenas 2.6% apresentaram
258 crescimento em meio com pH 3.0. Estes resultados demonstram a elevada adaptabilidade dos
259 microrganismos nas áreas provenientes a mineração de carvão, que possuem um pH do solo
260 próximo a 4.0. Os isolados UFSM-B21, UFSM-B33 e UFSM-B34 destacaram-se,
261 apresentando crescimento em pH 3.0 (Figura 3b).

262



263
 264 Figura 3.: Número de bactérias isoladas (a) e o número de isolados tolerantes aos diferentes
 265 valores de pH por pontos de coleta (b). A1: Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação
 266 Espontânea; A2: Solos Construídos – 6 anos - Acácia-negra; A3: Solos Construídos – 8 Anos
 267 – Vegetação espontânea; A4: Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Eucalipto; A5: Solos
 268 Construídos com rejeito – 20 Anos – Acácia-negra e Eucalipto; A6: Rejeito estéril – 20 anos;
 269 A7: Campo nativo – Área referência.

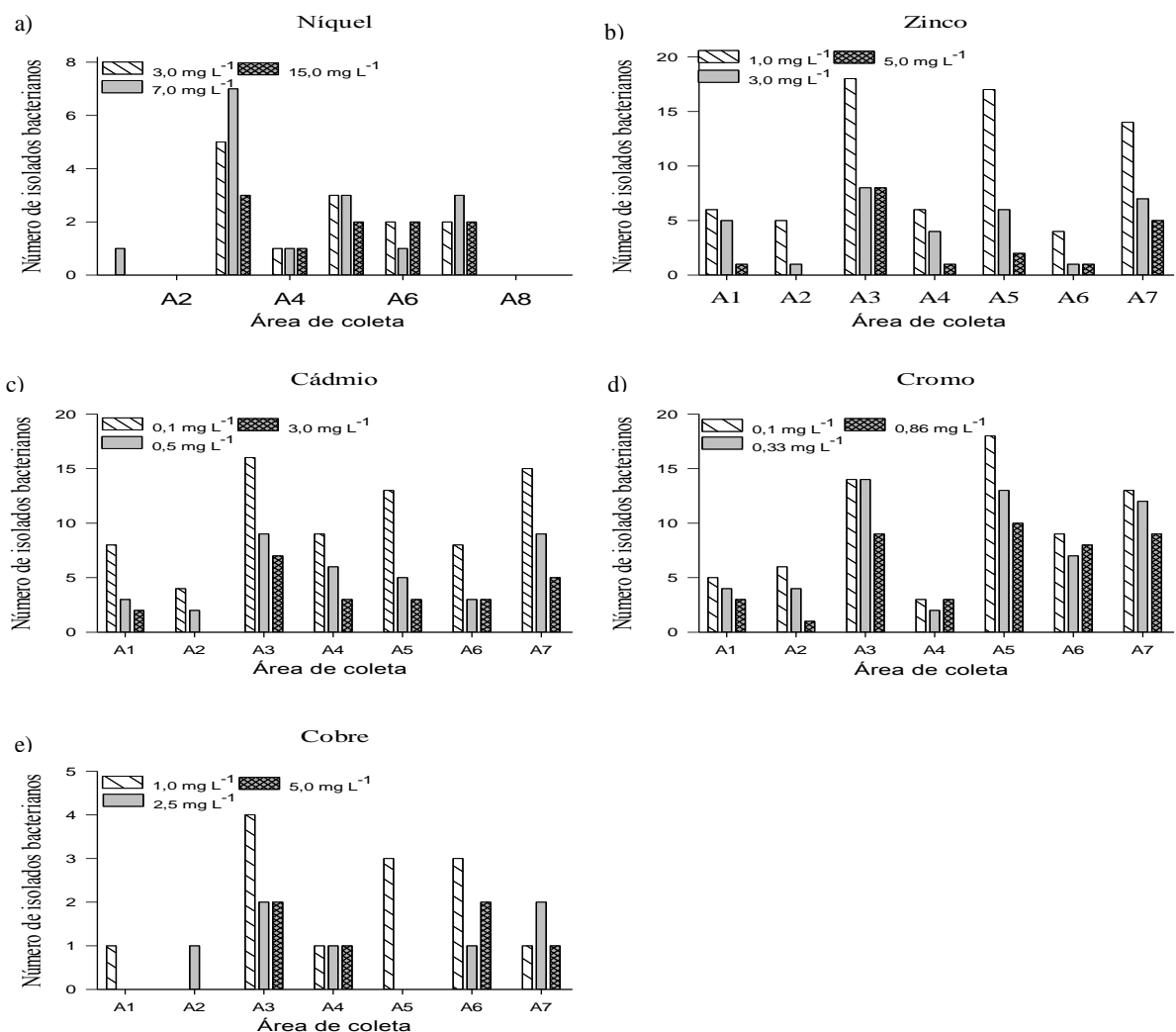
270

271 4.4 Teste de Metais

272

273 Os 115 isolados bacterianos foram testados quanto à sua tolerância a cinco metais
 274 pesados, sendo eles Cd, Cr, Cu, Ni e Zn em três diferentes dosagens (Figura 4). Quanto a
 275 tolerância ao Ni, 13.9% dos isolados apresentaram crescimento na concentração de 7 mg L^{-1} ,
 276 11.3% a baixo concentração (3 mg L^{-1}) e apenas 7% a elevados concentração de níquel (15
 277 mg L^{-1}), destacando-se os isolados da área A3, solos construídos – 8 anos – vegetação
 278 espontânea, que um maior número de isolados apresentaram crescimento em todas as
 279 concentrações de Ni.

280 A maioria dos isolados (62,60%) mostraram tolerância a menor concentração de Zn (1
 281 mg L⁻¹). Além disso, 27,8% e 15,65% toleraram as concentrações de 3,0 e 5,0 mg L⁻¹,
 282 respectivamente. Pode ser observado também que um vasto número de isolados toleraram
 283 uma baixa concentração de cádmio, 63,5% apresentaram tolerância a 0.1 mg L⁻¹ de Cd.
 284 Também apresentaram tolerância as concentrações de 0,5 e 3,0 mg L⁻¹ de Cd, 33% e 20%,
 285 respectivamente. Tanto na tolerância ao Cd como ao Zn os pontos A3, A5 e A7 foram os que
 286 apresentaram um maior número de isolados tolerando todas as concentrações dos metais.



287
 288 **Figura 3.:** Número de isolados tolerantes aos metais pesados Ni (a), Zn (b), Cd (c), Cr (d) e
 289 Cu (e) em cada área de coleta provenientes de área de mineração de carvão. A1: Solos
 290 Construídos– 8 Anos – Vegetação Espontânea; A2: Solos Construídos – 6 anos - Acácia-
 291 negra; A3: Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação espontânea; A4: Solos Construídos com

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

292 rejeito – 20 Anos – Eucalipto; A5: Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Acácia-negra e
293 Eucalipto; A6: Rejeito estéril – 20 anos; A7: Campo nativo – Área referência.

294

295 Quando submetidos a uma concentração de 0,1 mg L⁻¹ de Cr, 60% dos isolados
296 demonstraram tolerância. Para as concentrações de 0,33 e 0,86 mg L⁻¹ de Cr, 49,5% e 38,2%
297 toleraram, sendo que os pontos novamente os pontos A3, A5 e A7 foram os que apresentaram
298 um maior número de isolados tolerando todas as concentrações. Quanto ao Cu poucos
299 isolados demonstraram tolerância. Foi observado que 11,3% toleraram concentrações de 1,0
300 mg L⁻¹, e apenas 6% e 5,2% apresentaram tolerância as concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹,
301 respectivamente, sendo que desses a maioria dos isolados é proveniente das áreas A3, A5 e
302 A6.

303

304 **4.5 Autenticação por meio da inoculação no hospedeiro de origem**

305

306 No experimento de autenticação dos 28 isolados, selecionados devidos ao teste de pH,
307 25 foram autenticados (83.3%), ou seja, apresentaram nodulação positiva. Os controles sem
308 inoculação e sem N mineral não apresentaram nodulação, comprovando que não houve
309 contaminação do experimento, o que tornou possível a autenticação. A presença de nodulação
310 na autenticação dos isolados pode ser comprovada pela presença do gene *nodA*, um dos
311 responsável pela nodulação, conforme tabela 3

312

313 **4.6 Caracterização molecular da região 16S rRNA e detecção dos genes *nodA* e *nifH***

314

315 As sequências obtidas dos 28 isolados selecionados para a identificação para a
316 identificação foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank e as que

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

317 apresentaram similaridade maior do que 92% foram consideradas do mesmo gênero. A Tabela
318 3 apresenta os isolados juntamente com a caracterização molecular obtida, os valores de
319 similaridade bem como a numeração no GenBank. Foram identificadas 17 α -Proteobacteria
320 (*Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp. e *Brevudimonas* sp.), sendo o *Bradyrhizobium* sp. o
321 principal gênero encontrado, seis Firmicutes, caracterizado principalmente por *Paenibacillus*
322 sp. e *Brevibacillus* sp., além de três γ -Proteobacteria (*Pseudomonas* sp.) e duas β -
323 Proteobacteria (*Burkholderia* sp.). As estirpes referências comprovaram sua identificação,
324 demonstrando a eficácia da caracterização molecular.

325 O filo α -Proteobacteria, principalmente para isolados do gênero *Bradyrhizobium*, foi
326 identificado na maioria das áreas amostradas, com exceção de A1 e A4 (Tabela 3). Em A1 foi
327 encontrado apenas *Rhizobium* sp. e em A4 apenas um *Brevibacillus* sp., sendo esta a área
328 juntamente com a área A2 apresentaram um menor número de isolados. As áreas A3, A5 e A6
329 apresentaram um maior número de isolados selecionados quando comparadas com as demais
330 áreas, identificados os gêneros *Paenibacillus* sp., *Burkholderia* sp. e *Bradyrhizobium* sp.,
331 estas áreas apresentam pH em torno de 4.0. A área A7 apresentou o maior número de isolados
332 e a maior diversidade de gêneros: *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Pseudomonas* sp. e
333 *Paenibacillus* sp. Este resultado era esperado, tendo em vista que esta área está adjacente a
334 área de mineração, não sendo utilizada para a extração do carvão.

335 O DNA dos isolados após a identificação foram submetidos à técnica da PCR, como já
336 dito anteriormente e verificado a presença ou ausência dos genes *nifH* e *nodA* (Tabela 3). Dos
337 28 isolados bacterianos avaliados, 23 isolados apresentaram o gene *nodA* e 27 isolados o gene
338 *nifH*. A ausência desses genes foi observada em alguns isolados do filo Firmicutes e γ -
339 Proteobacteria.

340

TABELA 3.: Caracterização molecular de isolados bacterianos proveniente de solos de área de mineração de carvão, mina de Candiota, RS.

Isolado	Área Coletada	Planta isca	Táxon	Caracterização Molecular	Gene nodA	Gene nifH	Nº GenBank	Nº de pares de bases da sequência 16S rDNA	% de Similaridade	Nodulação
UFSM-B11	A1	Ervilhaca	α -Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp..	+	+	KJ532450	754	99	1
UFSM-B12	A1	Ervilhaca	α -Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp.	+	+	KJ532451	745	99	1
UFSM-B21	A2	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532461	736	99	1
UFSM-B22	A2	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532462	733	99	1
UFSM-B32	A3	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532463	741	100	1
UFSM-B33	A3	Ervilhaca	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+	KJ532452	415	96	1
UFSM-B34	A3	Ervilhaca	β -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+	KJ532453	743	99	1
UFSM-B35	A3	Ervilhaca	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i> sp.	-	+	KJ532473	729	99	0
UFSM-B41	A4	Siratiro	Firmicutes	<i>Brevibacillus</i> sp.	-	+	KJ532454	733	99	1
UFSM-B51	A5	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532464	753	99	1
UFSM-B52	A5	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532465	750	99	1
UFSM-B53	A5	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532466	749	98	1
UFSM-B54	A5	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532467	729	99	1
UFSM-B55	A5	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532468	751	99	1
UFSM-B56	A5	Ervilhaca	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	+	KJ532474	757	97	0
UFSM-B61	A6	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532469	631	98	1
UFSM-B62	A6	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Brevundimonas</i> sp.	-	+	KJ532455	727	97	1
UFSM-B63	A6	Siratiro	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	+	KJ532475	734	97	1
UFSM-B64	A6	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532470	743	99	1
UFSM-B65	A6	Ervilhaca	α -Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp.	+	+	KJ532456	751	99	1
UFSM-B71	A7	Siratiro	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i> sp.	+	+	KJ532476	771	100	1
UFSM-B72	A7	Siratiro	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	KJ532457	584	100	1
UFSM-B73	A7	Siratiro	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	KJ532458	725	100	1
UFSM-B74	A7	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp.	+	+	KJ532459	734	99	1
UFSM-B75	A7	Siratiro	Firmicutes	<i>Paenibacillus</i> sp.	-	+	KJ532477	744	99	0
UFSM-B76	A7	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532471	594	99	1
UFSM-B77	A7	Siratiro	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	+	+	KJ532472	747	99	1
UFSM-B78	A7	Siratiro	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	KJ532460	635	99	1

341

342 **5. DISCUSSÃO**

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

343

344 O estudo sobre a caracterização do solo da área de mineração da mina de Candiota
345 demonstrou característica ácida (Tabela 1), devido à drenagem ácida de mina, que além de ser
346 um dos principais problemas no estabelecimento de plantas em áreas recuperadas após a
347 mineração de carvão, afeta também a diversidade da microbiota edáfica, visto que o baixo pH
348 afeta a solubilidade de metais no solo (29). O baixo pH favorecerá a lixiviação de alguns
349 metais como As, Pb, Cr e Mn que apresentam teores elevados em áreas de mineração. As
350 elevadas concentrações de As são evidentes, mas bem menores quando comparadas a outros
351 estudos (30; 31; 32). O As é encontrado na forma de arseno-pirita, principalmente nos carvões
352 com alta porcentagem de pirita, sendo assim pouco móvel no carvão e pouco disponível para
353 ser lixiviado (33). Após a queima do carvão, o As associado a sulfetos é liberado e tende a ser
354 adsorvido por partículas menores de cinza, aumentando a sua disponibilidade, 25% no carvão
355 para, aproximadamente, 70% na cinza (34). O mesmo ocorre com Pb e Cd mas em menor
356 proporção (33) evidenciando assim as quantidades desses metais em maiores quantidades,
357 como demonstrado na tabela 1.

358 Devido à característica ácida da área, é importante a seleção de bactérias fixadoras de
359 nitrogênio mais adaptadas a índices mais elevados de acidez ou que demonstram adaptação a
360 essa nova faixa de pH, sendo que um vasto número de isolados bacterianos apresentaram
361 crescimento em pH baixo (4.0 e 5.0) (Figura 2b). Na área A1, onde o pH foi o mais elevado,
362 obteve-se um pequeno número de isolados bacterianos. Estudos demonstram que espécies
363 vegetais leguminosas nodulam em abundância quando encontradas em condições naturais de
364 pH próximo a 4.0 (35), sendo que o ambiente nativo afetará a tolerância das bactérias
365 fixadoras de nitrogênio a acidez. Bactérias com crescimento em pH 5.0 podem ter maior
366 chance de sobreviver em solos ácidos do que aquelas crescidas em pH 7.0 (16; 36; 37) devido
367 a um fenômeno denominado "acid habituation" (38) (Figura 1 e 2). Além disso, estirpes de

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

368 crescimento rápido geralmente são menos tolerantes à acidez do que as de crescimento lento
369 (17).

370 A adaptação dos microrganismos a diversos ambientes, tanto para acidez como para
371 altos teores de metais pesados no solo, torna-se cada vez mais desejável. Os isolados neste
372 estudo apresentaram uma vasta tolerância a diversos tipos de metais, sendo que, um grande
373 número apresentou tolerância ao Cd (Figura 3). Klonowska et al., (16) e Rathnayakea et al.
374 (39) relataram um amplo número de isolados tolerantes ao Cd em teores considerados alto,
375 sendo que os efeitos sobre o crescimento de microrganismos estão normalmente relacionados
376 com efeitos deletérios sobre a síntese de proteínas (40).

377 Além disso, neste estudo também foi demonstrada uma grande porcentagem de
378 bactérias tolerantes ao Cr (Figura 3) isso torna importante tendo em vista que a maioria dos
379 relatos das bactérias resistentes ao Cr foi isolada a partir do solo (16; 41) e possuindo a
380 capacidade de reduzir o Cr a forma menos tóxica (42). Alguns autores descobriram que
381 bactérias gram-positivas (Firmicutes) são mais tolerantes ao cromo do que bactérias gram-
382 negativas (proteobacterias) (39; 43; 44). Este estudo juntamente com Klonowska et al. (16) e
383 Navarro-Noya et al. (45) apresentou um grande número de isolados (Figura 3) tolerantes ao
384 Zn. Os elevados níveis de tolerância de Zn, Cd e Cr podem ser considerados agentes de
385 seleção para futuros estudos no emprego da biorremediação, devido à maior adaptabilidade
386 dessas bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas de áreas de mineração de carvão, auxiliando
387 no desenvolvimento e estabelecimento de plantas em áreas com elevados teores desses metais.

388 Essa maior adaptabilidade das bactérias fixadoras de nitrogênio em diversos ambientes
389 faz com que estas possam ser isoladas de uma grande variedade de fontes, incluindo solo,
390 água, rizosfera de plantas, raízes de árvores, materiais vegetais, forragem, fezes e larvas de
391 insetos (46), e como visto neste estudo em áreas degradadas após a mineração de carvão.

392 Após esse isolamento as bactérias fixadoras de nitrogênio foram submetidas à análise
393 de características fenotípicas para a caracterização inicial e triagem de bactérias fixadoras de
394 nitrogênio, no entanto devido à alta semelhança entre isolados necessita-se de métodos mais
395 precisos. Neste sentido, as técnicas moleculares apresentam uma ferramenta de maior precisão
396 para a identificação, através do sequenciamento do gene 16S rRNA, e também para a
397 avaliação da diversidade (47). Neste estudo, os isolados que foram submetidos à
398 caracterização da região 16S apresentaram uma diversidade genética elevada (Tabela 3)
399 semelhante ao relatados por Lima (48) e Guimarães (47), em áreas de baixo pH e fertilidade,
400 para a diversidade de bactérias aprisionadas pelo siratro (*Macropitilium atropurpureum*). No
401 entanto, esses autores também relataram uma elevada diversidade entre as bactérias fixadoras
402 de nitrogênio de leguminosas (*Bradyrhizobium* sp., *Azorhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp.,
403 *Sinorhizobium* sp., *Rhizobium* sp. e *Burkholderia* sp.), mas diferenciando quanto aos gêneros,
404 onde ocorreu um maior número de isolados do gênero *Bradyrhizobium*, ainda foram
405 encontrados *Rhizobium* sp. *Burkholderia* sp., *Brevibacillus* sp., *Paenibacillus* sp.
406 *Brevundimonas* sp. e *Pseudomonas* sp. (Tabela 3). Sendo que, o gênero *Bradyrhizobium* é
407 caracterizado pelo crescimento lento e capacidade de mudança do pH do meio de cultura para
408 alcalino ou neutro (49) condizendo com o que encontrou-se na Figura 1, onde observou-se
409 grupos crescimento lento e pH ácido (LA) e crescimento lento e pH neutro (LN). Além disso,
410 observou-se que estirpes de *Bradyrhizobium* sp. apresentaram tolerância a Cd, esta que já
411 conhecida por acumular grandes quantidades de Cd (50; 51; 52). Neste caso, a quantidade e a
412 atividade da enzima glutationa são utilizados como mecanismo de defesa (52). Também foi
413 observado que esta tolerou concentrações de Zn, o mesmo evidenciado por Navarro-Noya et
414 al. (45) em bactérias isoladas de uma mina de carvão.

415 A recente disponibilidade do genoma de ambas proteobacterias (α - e β -) pode
416 proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos e da evolução da nodulação e fixação

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

417 biológica de nitrogênio por vários gêneros (53). Neste estudo o grupo das α -proteobacterias
418 apresentaram ambos os genes *nifH* e *nodA*. Sendo que o gene *nod* abriga distintos genes para
419 o mesmo fenótipo de nodulação (54; 55). Já o gene *nifH* é bastante utilizado em estudos
420 filogenéticos, já que tem sido frequentemente sequenciado na maioria das espécies de rizóbios
421 para posterior comparação (27). Este gene codifica a síntese da enzima dinitrogenase redutase
422 e tem apresentado, recentemente, uma relação não consistente entre os estudos de filogenia de
423 suas seqüências quando comparado com a filogenia do gene ribossomal 16S, mas tem sido
424 largamente similar ao gene *nodA* (54).

425 Os gêneros *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp., e *Pseudomonas* sp. identificados neste
426 estudo, também apresentaram tanto o gene *nodA* como o gene *nifH*, sendo que a descoberta de
427 *Burkholderias* como simbioses de leguminosas ainda é recente. Estudos sugerem que as β -
428 proteobacterias podem ter adquirido o gene *nodA* das α -proteobacterias (56), ou seja,
429 ocorrendo uma transferência lateral de genes do genoma das α -proteobacterias, sendo esta a
430 explicação mais provável para a ocorrência destes genes em gêneros distante das α -
431 proteobacterias (25; 56; 57). Do mesmo modo, Ding et al. (58) demonstraram que a fixação
432 biológica de nitrogênio ocorria também em *Bacillus marisflavi* e *Paenibacillus massiliensis*,
433 pois encontraram fragmentos do gene *nifH* em *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus*. Dessa
434 forma, fica demonstrado o porquê da presença dos genes *nifH* e *nodA* no genoma dos gêneros
435 encontrados no estudo.

436 Sendo assim este estudo, demonstrado através dos dados obtidos, enfatiza a
437 necessidade de mais investigações sobre a diversidade microbiana em áreas degradadas pela
438 mineração de carvão. Esta pode abrigar um reservatório importante de microrganismos com
439 potencial biotecnológico, que podem auxiliar na diminuição do impacto ambiental que fontes
440 nitrogenadas causariam nesses passivos ambientais e, para que essas investigações sirvam

441 para uma futura comparação entre as diversas áreas degradadas pela mineração de carvão
442 existente.

443

444 **6. CONCLUSÃO**

445

446 As estirpes bacterianas isoladas das diferentes áreas de mineração de carvão
447 apresentaram alta diversidade abrangendo diferentes gêneros de bactérias fixadoras de
448 nitrogênio. Estas apresentam potencial para serem testadas futuramente em leguminosas
449 arbóreas com potencial para serem utilizadas em programas de revegetação, pois apresentam
450 tolerância a diversos níveis de pH e a diversas concentrações de metais pesados.

451

452 **7. REFERÊNCIAS**

453

454 1. **Agência Nacional de Energia Elétrica** – (ANEEL). Disponível em:
455 <<http://www.aneel.gov.br/>>.

456 2. **SECRETARIA DE ENERGIA, MINAS E COMUNICAÇÃO DO ESTADO**
457 **DO RIO GRANDE DO SUL** – (SEMC). Disponível em: <<http://www.semc.rs.gov.br/>>.

458 3. **Fungaro DA, Izidoro JC.** 2006. Remediação de drenagem ácida de mina usando
459 zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de carvão. *Quim. Nova.* **29**:735-740.

460 4. **Valls M, Atrian S, Lorenzo V, Fernández LA.** 2000. Engineering a mouse
461 metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy
462 metals in soil. *Nature Biotechnol.* **18**:661-665

463 5. **Sriprang R, Hayashi M, Yamashita M, Ono H, Saeki K, Murooka Y.** 2002. A
464 novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant
465 and genetically engineered rhizobia. *J Biotechnol.* **99**:279-293

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista *Applied Environmental Microbiology*.

- 466 6. **Sriprang R, Hayashi M, Ono H, Takagi K, Hirata K, Murooka Y.** 2003.
467 Enhanced accumulation of Cd²⁺ by a *Mesorhizobium* sp. transformed with a gene from
468 *Arabidopsis thaliana* coding for phytochelatin synthase. *Appl Environ Microbiol.* **69**:1791-
469 1796.
- 470 7. **Wu CH, Wood TK, Mulchandani A, Chen W.** 2006. Engineering plant-microbe
471 symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Appl Environ Microbiol.* **72**: 1129-1134.
- 472 8. **Vázquez S, Agha R, Granado A, Sarro MJ, Esteban E, Peñalosa JM, Carpena**
473 **RO.** 2006. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil.
474 *Water Air Soil Pollut.* **177**:349–365.
- 475 9. **Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C.**
476 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by B-proteobacteria is widespread in the nature. *J*
477 *Bacteriol.* **185**:7266-7272.
- 478 10. **Wani PA, Khan MS, Zaidi A.** 2007. Effect of metal tolerant plant growth
479 promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by
480 greengram plants. *Chemosphere.* **70**:36–45.
- 481 11. **Ferreira PAA, Bomfeti CA, Silva Júnior R, Soares BL, Soares CRFS, Moreira**
482 **FMS.** 2012. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco,
483 cádmio, cobre e chumbo. *Pesq. agropec. bras.* **47**:85-95.
- 484 12. **Trannin ICB, Siqueira JO, Moreira FMS, Lima AS.** 2001. Tolerância de
485 Estirpes e Isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a Zinco, Cádmio e Cobre "In
486 Vitro". *Rev. Bras. Cienc. Solo.* **25**:305-316.
- 487 13. **Matsuda A, Moreira FMS, Siqueira JO.** 2002. Tolerância de rizóbios de
488 diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. *Pesq. Agropec. Bras.* **37**: 343-355, 2002.
- 489 14. **Carrasco JA, Armario P, Pajuelo E, Burgos A, Caviedes MA, Lopes R,**
490 **Chamber MA, Palomares AJ.** 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

491 *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite
492 mine. *Soil Biol Biochem.* **37**:1131-1140.

493 15. **Zhan J, Sun Q.** 2011. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in
494 wastelands of copper mine tailings during the process of natural ecological restoration.
495 *Journal of Environmental Sciences.* **23**:476–487.

496 16. **Klonowska A, Chaintreuil C, Tisseyre P, Miché L, Melkonian R, Ducousso M,**
497 **Laguerre G, Brunel B, Moulin L.** 2012. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts
498 (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their
499 adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microb Ecol.* **81**:1-18.

500 17. **Moreira FMS, Siqueira JO.** 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo.* 2. ed.
501 Lavras: UFLA.

502 18. **Moreira FMS, Huising EJ, Bignell DE.** 2010. *Manual de Biologia dos Solos*
503 *Tropicais.* Editora UFLA.

504 19. **Zhang XX, Kosier B, Priefer UB.** 2001. Genetic diversity of indigenous
505 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil
506 restoration with alfalfa. *Mol. Ecol.* **10**:2297–2305.

507 20. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** 2006. *Sistema Brasileiro de*
508 *Classificação de Solos.* . 2. ed. – Rio de Janeiro : EMBRAPA-SP.

509 21. **Hoagland DR, Arnon DI.** 1950. *The water culture method for growing plants*
510 *without soil.* Berkeley: California Agricultural Experiment Station.

511 22. **Fred EB, Waksman SA.** 1928. *Laboratory manual of general microbiology – with*
512 *special reference to the microorganisms of the soil.* New York: McGraw-Hill Book Company.

513 23. **Vincent JMA.** 1970. *Manual for the Practical Study of Root lule Bacteria.* Oxford:
514 Blackwell Scientific.

- 515 24. **Lane DJ.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p 115–148. In Stackebrandt E,
516 Goodfellow M(ed), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New
517 York, NY.
- 518 25. **Staden R, Judge DP, Bonfield JK.** 2003. Analysing sequences using the Staden
519 package and EMBOSS. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical
520 Approach. Eds. Stephen A. Krawetz and David D. Womble. Human Press Inc., Totawa, NJ
521 07512. pp. 393–410.
- 522 26. **Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C.**
523 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by B-proteobacteria is widespread in the nature. J
524 Bacteriol. **185**:7266-7272.
- 525 27. **Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N.** 2001.
526 Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic
527 relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology. 147:981–993.
- 528 28. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB -;** Relatório de
529 estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São
530 Paulo. São Paulo: (R321)-CETESB, 2001. Anexo único, artigo 1º da Decisão de Diretoria Nº
531 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005.
- 532 29. **Oliveira A, Pampulha ME.** 2006. Effects of long-term heavy metal
533 contamination on soil microbial characteristics. J. Biosci. Bioeng. **102**:157–161.
- 534 30. **Gayer RA, Rose M, Dehmer J, Shao LY.** 1999. Impact of sulphur and trace
535 element geochemistry on the utilization of marine-influenced coal-case study from South
536 Wales Variscan foreland basin. Int. J. Coal Geol. 40:151-174.
- 537 31. **Van der Flier-Killer E, Goodarzi F.** 1991. Geological controls on major and
538 trace elements characteristics Cretaceous coals of Vancouver Island Canada. Bull. Geol.
539 Soc. **162**: 255-265.

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

- 540 32. **Dai S, Zeng R, Sun Y.** 2006. Enrichment of arsenic, antimony, mercury, and
541 thallium in a Late Permian anthracite from Xingren, Guizhou, Southwest China. *Int. J. Coal*
542 *Geol.* **66**: 217-226.
- 543 33. **Flues M, Sato IM, Cotrim MB, Figueiredo Filho PM, Camargo IMC.** 2008.
544 Avaliação da influência da operação da termoelétrica a carvão na concentração dos metais e
545 as no solo de Figueira, Pr – Brasil. *Quim. Nova.* **31**:25-30.
- 546 34. **Flues M, Camargo IMC, Sato IM.** 2004. Relatório final, Projeto FAPESP
547 01/144424.
- 548 35. **Moreira FMS, Tiedje J, Marsh TL.** 2002. Burkholderia spp. are among fast
549 growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazônia and from
550 brazilian Leguminosae forest species. In: *Memorias da XXI Reunión Latinoamericana de*
551 *rhizobiologia*, Cocoyoc, México.
- 552 36. **Indrasumunar A, Dart PJ, Menzies NW.** 2011. Symbiotic effectiveness of
553 *Bradyrhizobium japonicum* in acid soils can be predicted from their sensitivity to acid soil
554 stress factors in acidic agar media. *Soil Biol Biochem.* **43**:2046 – 2052.
- 555 37. **Indrasumunar A, Menzies NW, Dart PJ.** 2012. Laboratory prescreening of
556 *Bradyrhizobium japonicum* for low pH, Al and Mn tolerance can be used to predict their
557 survival in acid soils. *Soil Biol Biochem.* **48**:135-141.
- 558 38. **Dilworth MJ, Rynnef G, Castelli JM, Vivas-Marfisi AI, Glenn AR.** 1999.
559 Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected
560 by calcium and low pH. *Microbiology.* **45**:1585-1593.
- 561 39. **Rathnayake IVN, Megharaj M, Krishnamurti GSR, Bolan NS, Naidu R.** 2013.
562 Heavy metal toxicity to bacteria – Are the existing growth media accurate enough to
563 determine heavy metal toxicity? *Chemosphere.* **90**:1195–1200.

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista *Applied Environmental Microbiology*.

- 564 40. **Naz N, Young HK, Ahmed N, Gadd GM.** 2005. Acumulação de cádmio e de
565 homologia de ADN com genes de resistência a metais em bactérias redutoras de sulfato. Appl.
566 Environ. Microbiol. **71**:4610-4618.
- 567 41. **Cheng G, Li X.** 2009. Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. isolated
568 from soils of iron mineral area. Eur J Soil Biol. **45**:483–487.
- 569 42. **Dhal B, Thatoi HN, Das NN, Pandey BD.** 2013. Chemical and microbial
570 remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid
571 waste: A review. J, Hazard. Mater. **250– 251**:272– 291.
- 572 43. **Viti C, Giovannetti L.** 2001. The impact of chromium contamination on soil
573 heterotrophic and photosynthetic microorganisms. Ann. Microbiol. **51**:201–213.
- 574 44. **Viti C, Giovannetti L.** 2005. Characterization of cultivable heterotrophic bacterial
575 communities in Cr-polluted and unpolluted soils using biolog and ARDRA approaches. App.
576 Soil. Ecol. **28**:101–112.
- 577 45. **Navarro-Noya Y, Hernández-Mendoza E, Morales-Jiménez J, Jan-Roblero J,**
578 **Martínez-Romero E, Hernández-Rodríguez C.** 2012. Isolation and characterization of
579 nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine
580 tailings. App. Soil. Ecol. **62**:52– 60.
- 581 46. **Daane LL, Harjono I, Barns SM, Launen LA, Palleroni NJ, Häggblom MM.**
582 2002. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus*
583 *naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salta
584 marsh plants. Int J Syst Evol Microbiol. **52**:131-139.
- 585 47. **Guimarães AA, Jaramillo PMD, Nobrega RSA, Florentino LA, Silva KB,**
586 **Moreira FMS.** 2012. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated
587 from agricultural soils in the western Amazon by using cowpea as the trap plant. Appl
588 Environ Microbiol (Print). **78**:6726-6733.

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

- 589 48. **Lima AS, Nóbrega RSA, Barberi A, Silva K, Ferreira DF, Moreira FMS.**
590 2009. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the
591 western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*).
592 Plant Soil. **319**:127–145.
- 593 49. **Chagas-Junior AF, Oliveira LA, Oliveira AN.** 2010. Phenotypic
594 characterization of rhizobia strains isolated from Amazonian soils and symbiotic efficiency in
595 cowpea. Acta Sci.Agron. **32**:161 – 169.
- 596 50. **Siñeriz LM, Kothe E, Abate C.** 2009. Cadmium biosorption by *Streptomyces* sp.
597 F4 isolated from former uranium mine. J Basic Microbiol. **49**:1–8.
- 598 51. **Bianucci E, Fabra A, Castro S.** 2011. Cadmium accumulation and tolerance in
599 *Bradyrhizobium* spp. (Peanut microsymbionts). Curr. Microbiol. **62**:96-100.
- 600 52. **Bianucci E, Fabra A, Castro S.** 2012. Involvement of glutathione and enzymatic
601 defense system against cadmium toxicity in *Bradyrhizobium* sp. strains (peanut symbionts).
602 Biometals. **25**:pp. 23–32.
- 603 53. **Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Wen-Ming Ch, Elliott GN, Bontemps**
604 **C, Estrada-de Los Santos P, Gross E, Dos Reis FB, Sprent JI, Young JP, James EK.**
605 2011. Legume nodulating Beta-proteobacteria: diversity, host range, and future prospects,
606 Mol. Plant-Microbe Interact. **24**:1276-1288.
- 607 54. **Haukka K, Lindström K, Young JPW.** 1998. Three phylogenetic groups of
608 nodA and nifH genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolated from leguminous trees
609 growing in Africa and Latin America. Appl Environ Microbiol. **64**:419-426.
- 610 55. **Wernegreen JJ, Riley MA.** 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of
611 symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. Mol
612 Biol Evol. **16**:98-113.

- 613 56. **Moulin L, Chen WM, Béna G, Dreyfus B, Boivin-Massson C.** 2002. Rhizobia:
614 the family is expanding. In: Finan, T. M.; O'Brian, M. R.; Layzell, D. B.; Vessey, J. K.;
615 Newton, W. *Nitrogen fixation: global perspectives*. Oxon: CAB International, 2002. p. 61-65.
- 616 57. **Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, Dos Reis Júnior FB, Gross E, Lawton**
617 **RC, Neto NE, de Fátima Loureiro M, De Faria SM, Sprent JI, James EK, Young JP.**
618 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol Ecol.* **19**:44–52.
- 619 58. **Ding Y, Wang J, Liu Y, Chen S.** 2005. Isolation and identification of nitrogen
620 fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J Appl Microbiol.* **99**:1271-281.
- 621

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou um amplo número de isolados tolerantes a diversos valores de pH e diferentes metais pesados com variadas concentrações, além disso a caracterização molecular resultou em quatro filos α - β - γ -Proteobacteria e Firmicutes, prevalecendo o filo α -proteobacteria, representado principalmente por *Bradyrhizobium* sp., devido á sua adaptação em ambientes ácidos, característica predominante das áreas degradadas pela mineração de carvão. Estas podem ser utilizadas como futuros inoculantes bacterianos para leguminosas arbóreas de rápido crescimento para serem empregadas em programas de revegetação nestas áreas, pois esta temática ainda é pouco explorada no Brasil.

Ainda existem extensas áreas abandonadas pela atividade mineradora e que apresentam sérios problemas ambientais, conforme discutidos anteriormente. Normalmente, os programas de recuperação de áreas degradadas adotam como estratégia a adição de material orgânico ao solo e a adição de grandes quantidades de fertilizantes no solo, porém os seus efeitos são pouco duradouros e de elevado custo. Essa proposta está baseada em uma alternativa ambientalmente aceita e de baixo custo que, além dos benefícios relacionados à estética e proteção, é a maneira mais simples e natural para a recuperação de solos degradados.

A obtenção de simbiontes radiculares que apresentam tolerância às condições de estresse comumente encontrados nos solos reconstruídos após atividade de mineração de carvão, possibilitará a sua aplicação em mudas de espécies arbóreas destinadas a programas de revegetação. Isto permitirá o emprego de plantas inoculadas com bactérias eficientes na promoção do crescimento vegetal, buscando-se de forma mais rápida e eficiente a recuperação do solo e da vegetação, o que resultará na melhoria de todo o ambiente da região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/>>. Acesso em: 15 de mai. de 2012.

CARRASCO, J. A. et al. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1131-1140, 2005.

CAYUELA, M. L.; SINICCO, T.; MONDINI, C. Mineralization dynamics and biochemical properties during initial decomposition of plant and animal residues in soil. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p. 118-127, 2009.

COMPANHIA RIO-GRANDENSE DE MINERAÇÃO (CRM). Disponível em: <<http://www.crm.rs.gov.br/>>. Acesso em 15 de mai. de 2012.

ELO, S. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 535-545, 2001.

FERREIRA, P. A. A. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 1, p. 85-95, 2012.

FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. C. Remediação de drenagem ácida de mina usando zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de carvão. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 735-740, 2006.

GRAU, F. H. E.; WILSON, P. W. Physiology of nitrogen-fixation by *Bacillus polymyxa*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, p. 490-496, 1962.

GYANESHWAR, P. et al. Legume nodulating Beta-proteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1276-1288, 2011.

HOLANDA NETO, M. R. **Atributos microbiológicos de um solo construído vegetado com gramíneas após mineração de carvão em Candiota/RS**. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em solos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Disponível em: <<http://www.iea.org/>>. Acesso em 15 de maio de 2012.

KLONOWSKA, A. et al. Biodiversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts (*Cupriavidus taiwanensis*, *Rhizobium mesoamericanum*) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. **FEMS Microbiology Ecology**, p. 1-18, 2012.

LEAL, O. A. **Frações e qualidade da matéria orgânica de um solo construído vegetado com gramíneas após a mineração de carvão**. 2011. 113f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

LEITZKE, V. W. **Armazenagem e disponibilidade de água de solos construídos na área de mineração de carvão de Candiota - RS**. 2002. 129f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

MACEDO, M. O. et al. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. **Forest Ecology and Management**, v. 255, p. 1516-1524, 2008.

MATIAS, S. R. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 259–266, 2009.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 343-355, 2002.

MENDES FILHO, P. F. **Potencial de reabilitação do solo de uma área degradada, através da revegetação e do manejo microbiano**. 2004. 89f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MONTEFUSCO, A.; NAKAMURA, L. K.; LABEDA, D. P. *Bacillus peoriae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, p. 388–390, 1993.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. . Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

NAVARRO-NOYA, Y. et al. Isolation and characterization of nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine tailings. **Applied Soil Ecology**, v. 62, p. 52– 60, 2012.

NUNES, M. C. D. **Condições físicas de solos construídos na área de mineração de carvão de Candiota-RS**. 2002. 130f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

RIGOTTI, N. **Recuperação de áreas degradadas: estudo de caso. Porto Alegre, FINEP/CAPES/PADCT/GTM/PUCRS/FEPAM**, p.99-113, 2002.

ROUX V.; RAOULT, D. *Paenibacillus massiliensis* sp. nov., *Paenibacillus sanguinis* sp. nov. and *Paenibacillus timonensis* sp. nov, isolated from blood cultures. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1049-1054, 2004.

SANTOS, D. C. **Alterações químicas e biológicas em solo de área de mineração de carvão submetido a diferentes cultivos**. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

SANTOS, D. C. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo construído após mineração de carvão e submetido a diferentes coberturas vegetais. **Revista Brasileira de Agrociencia (UFPEL)**, v. 14, p. 135-146, 2008.

SECRETARIA DE ENERGIA, MINAS E COMUNICAÇÃO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – (SEMC). Disponível em: <<http://www.semc.rs.gov.br/>>. Acesso em 15 de maio de 2012.

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, C. A. Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Org.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo – Ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Metrópole Editora Ltda, v. 1, p. 495-524, 2008.

SIQUEIRA, J. O. et al. Micorrizas e a degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 5, p. 219-306, 2007.

VON DER WEID I. et al. *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2147-2153, 2002.

* Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista Applied Environmental Microbiology.

TRANNIN, I. C. B. et al. Tolerância de Estirpes e Isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a Zinco, Cádmio e Cobre "In Vitro". **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 305-316, 2001.

XIE, G. I. I.; SU, B. L.; CUI, Z. J. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. **Acta Microbiol Sin** 38, 480-483, 1998.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, p. 3-14, 2006.

ZHAN, J.;SUN, Q. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in wastelands of copper mine tailings during the process of natural ecological restoration. **Journal of Environmental Sciences**. 23:476–487, 2011.

ZHANG, X. X.; KOSIER, B.; PRIEFER, U. B. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2297–2305, 2001.