

Anabel González Hernández

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS
HERBÁCEAS UTILIZANDO RIZÓBIOS ISOLADOS DE ÁREAS
DE MINERAÇÃO DE CARVÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio R. F. S. Soares

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hernández, Anabel González
Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas
utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão
/ Anabel González Hernández ; orientador, Márcio José
Rossi ; coorientador, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa
Soares. - Florianópolis, SC, 2015.
93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Recuperação de áreas
degradadas. 3. Fixação biológica do nitrogênio. I. Rossi,
Márcio José. II. Soares, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

"Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão"

Por

Anabel González Hernández

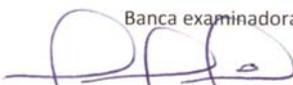
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (003/BTC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

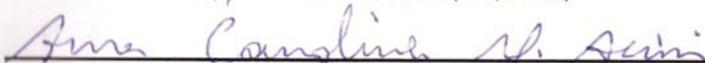


Dr(a) Márcio José Rossi (MIP/CCB/UFSC)

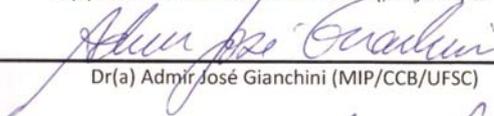
Banca examinadora:



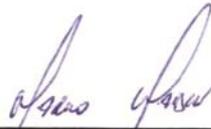
Dr(a) Julio Cesar Pires Santos (CAV/UEDESC)



Dr(a) Ana Carolina Maisonnave Arisi (CTA/CCA/UFSC)



Dr(a) Admir José Gianchini (MIP/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2015.

Aos meus pais que são tudo para mim

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua infinita misericórdia e todas as oportunidades maravilhosas na minha vida.

Aos meus amados pais, José Francisco e Aida Rosa por me ensinarem que este era o único caminho.

Ao meu avô por assumir o que era meu para eu conseguir estar hoje aqui.

Ao meu querido Lázaro Ismael, pela compreensão e carinho.

Ao Brasil e ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação- CNPq pela bolsa de estudos.

Ao Programa de Pósgraduação Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal Santa Catarina pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

À CNPq pelo o apoio financeiro através do Processo 477756/2013-1.

Ao Professor Márcio por aceitar me orientar sem ainda ter me conhecido.

Ao Professor Cláudio pela disponibilidade, apoio e pela grande ajuda.

A todos os colegas de laboratório particularmente aos meus especiais Diana, Francisco, Carol, Manu, Igor, Bianca, David, Ednilson, Thays, Kelly e Rafa pela contribuição no meu trabalho.

À Dona Nésia, Sr. Maurício e ao Frei Frigo pela acolhida e por fazerem com que eu me sentisse em minha própria casa.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho, especialmente às minhas grandes amigas quase irmãs Danae e Dayana por me seguirem nessa aventura.

Finalmente, quero agradecer ao meu querido Renati. Saiba, meu Chuchú, que esta dissertação também é sua. Obrigada por cada segundo que me dedicou nesta caminhada.

A todos o meu sincero muito obrigada!

"He ofendido a Dios y a la humanidad porque mi trabajo no tuvo la calidad que debia haber tenido"
Leonardo Da Vinci

RESUMO

As atividades de lavra a céu aberto do carvão mineral no sul de Santa Catarina impactaram aproximadamente 6.700 ha de solo. A revegetação é uma alternativa que auxilia no processo de recuperação de áreas degradadas, e o emprego de leguminosas herbáceas inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio é motivado pela dificuldade em se implantar uma cobertura vegetal nesses locais, devido principalmente à baixa disponibilidade de nutrientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar, dentre 16 rizóbios autóctones da região carbonífera em Criciúma, aqueles com maior potencial simbiótico para as leguminosas herbáceas *Vicia sativa* (Ervilhaca) e *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio). Foram conduzidos ensaios em casa de vegetação contendo 17 tratamentos de inoculação (16 rizóbios autóctones + estirpe recomendada para cada leguminosa), além de dois tratamentos sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral). Após 60 dias, foi avaliada a nodulação, crescimento, absorção de N e eficiência simbiótica. A capacidade promotora do crescimento vegetal foi avaliada pela produção de ácido indolacético, ACC deaminase, sideróforos e solubilização de fosfato. A classificação filogenética dos isolados foi realizada por sequenciamento parcial do gene rDNA 16S. Dentre os rizóbios capazes de nodular as leguminosas herbáceas, apenas UFSC-M8 mostrou-se eficiente para a Ervilhaca. Foi verificada a presença de mais de um mecanismo de promoção do crescimento no mesmo isolado, destacando-se UFSC-M8 por apresentar todas as características avaliadas. Os isolados foram classificados como pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Gluconobacter*. Os resultados sugerem que a inoculação da Ervilhaca com o isolado de rizóbio UFSC-M8 classificada como *Burkholderia* sp. é uma alternativa promissora para testes de inoculação a campo visando a revegetação das áreas impactadas pela mineração de carvão.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, eficiência simbiótica, revegetação, áreas degradadas, *Vicia sativa*, *Calopogonium mucunoides*

ABSTRACT

The charcoal open pit mining in the south of Santa Catarina state was inappropriately developed, impacting approximately 6,700 ha. Revegetation is an alternative that helps in the recovery of these areas and the use of herbaceous legumes inoculated with nitrogen fixing bacteria is motivated by the difficulty to implement a vegetation cover in these places, mainly due to the low availability of nutrients. The objective of this work was to evaluate, among 16 autochthonous rhizobia from the coal mining area of Criciúma, Santa Catarina, those with the greatest potential for making symbiosys with the herbaceous legumes *Vicia sativa* (Ervilhaca) and *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio). Tests were conducted in greenhouse containing 17 inoculation treatments (16 autochthonous rhizobia + recommended strain for each legume), plus two treatments without inoculation (with and without mineral nitrogen). After 60 days, the nodulation, growth, N uptake and symbiotic efficiency were evaluated. The capacity of promoting plant growth was assessed by determining the production of indol acetic acid, ACC deaminase, siderophores and inorganic phosphate solubilization. The phylogenetic classification of the isolates was performed by sequencing the 16S rDNA gene. Among the rhizobia capable of nodulating the herbaceous legumes, only UFSC-M8 was efficient for *Vicia sativa*. It was found the presence of more than one growth-promoting mechanism in the same organism, and the isolate UFSC-M8 presented all of them. The isolates were classified as belonging to the genera *Rhizobium*, *Burkholderia* and *Gluconobacter*. The results suggest the inoculation of *Vicia sativa* with the rhizobium UFSC-M8, classified as *Burkholderia* sp., is a promising alternative for revegetation field trials to recover coal mining degraded areas.

Keywords: Biological nitrogen fixation; recovering of degraded areas; symbiotic efficiency; *Vicia sativa*; *Calopogonium mucunoides*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de promoção do crescimento de plantas por rizobactérias (Adaptado de MUNEEES e MULUGETA, 2014).	32
Figura 2. Processo de movimentação de fósforo nos solos (Adaptado de MUNEEES e MULUGETA, 2014).	34
Figura 3. Produção de etileno pela planta em função do tempo, após stresse ambiental (STEARNS e GLICK, 2003).	36
Figura 4. Degradação de ACC pela enzima ACC deaminase (ACCD), formando α -cetobutirato e amônia (NASCIMENTO, 2011).	37
Figura 5. Crescimento da parte aérea (A) e sistema radicular (B) da Ervilhaca inoculada com os rizóbios SEMIA 384, UFSC-M8 e UFSC-M9 após 60 dias da inoculação. R1, R2 e R3, representam as repetições dentro de cada tratamento. C/N = controle nitrogenado; S/N = controle sem nitrogênio.	49
Figura 6. Número (A) e massa seca de nódulos (B) produzidos em <i>Vicia sativa</i> (Ervilhaca) inoculada com os isolados de rizóbio UFSC-M8, UFSC-M9 e a estirpe recomendada SEMIA384, após 60 dias de crescimento. Barras verticais representam o erro padrão da média.....	50
Figura 7. Massa seca de parte aérea (A) e raízes (B) de <i>Vicia sativa</i> (Ervilhaca), inoculada com rizóbios, após 60 dias de crescimento.	51
Figura 8. Teor (A) e acúmulo de nitrogênio (B) em <i>Vicia sativa</i> (Ervilhaca) inoculada com rizóbios, após 60 dias de crescimento.	52
Figura 9. Eficiência simbiótica de rizóbios para <i>Vicia sativa</i> (Ervilhaca) em casa de vegetação.	53
Figura 10. Crescimento (A) e nódulos (B e C) de <i>Calopogonium mucunoides</i> (Calpogônio) inoculado com o isolado de rizóbio UFSC-M8 e estirpe recomendada BR 1602 após 60 dias da inoculação. C/N = controle nitrogenado.....	54
Figura 11. Número de nódulos (A) e massa seca de nódulos (B) produzidos por rizóbios inoculados em <i>Calopogonium mucunoides</i> (Calopogônio), após 60 dias de crescimento.....	54
Figura 12. Massa seca da raiz (A) e da parte aérea (B) de <i>Calopogonium mucunoides</i> (Calopogônio) inoculada com rizóbios, após 60 dias de crescimento em casa de vegetação.	55

Figura 13. Teor (A) e acúmulo de nitrogênio (B) em <i>Calopogonium mucunoides</i> (Calopogônio) inoculado com rizóbios, após 60 dias de crescimento em casa de vegetação.....	56
Figura 14. Eficiência simbiótica de rizóbios inoculados em <i>Calopogonium mucunoides</i> (Calopogônio), em casa de vegetação.	57
Figura 15. Diferenças entre as áreas de solubilização produzidas pelos isolados autóctones em meio NBRIP contendo CaHPO ₄ após 14 dias de incubação a 25 °C.....	58
Figura 16. Índice de solubilização de fósforo bicálcico por rizóbios em meio NBRIP após de 14 dias de crescimento a 25 °C.....	58
Figura 17. Ensaio para verificar a produção de sideróforos por isolados de rizóbios em meio CAS-ágar, após 72 h de crescimento a 25 °C. Halo amarelo indica resultado positivo. 131 = <i>Pseudomonas putida</i> (UW4); 731 = <i>P. fluorescens</i> (YsS6).	59
Figura 18. Representação qualitativa da produção de ácido indol acético por isolados de rizóbios: (A) curva padrão; (B) produção de AIA em presença do Trp como indutor.	60
Figura 19. Árvore filogenética <i>neighbour-joining</i> baseada no sequenciamento parcial (455 pb) do gene rDNA 16S de isolados de rizóbios autóctones de áreas de mineração de carvão.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de ácido indol acético (AIA) e de α -cetobutirato por isolados de rizóbios de áreas de mineração de carvão, estirpes recomendadas pelo MAPA e <i>P. fluorescens</i> (estirpe controle para ACCD).	61
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC- 1-aminociclopropano-1-carboxilato
ACCD- 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase
AIA- ácido indolacético
APP- área de preservação permanente
FBN- fixação biológica de nitrogênio
BPCP- bactérias promotoras do crescimento de plantas
BR- Embrapa Agrobiologia
BSF- bactérias solubilizadoras de fosfatos
CAS- Cromo azurool S
CTAB- brometo de hexadeciltrimetilamônio
Da- Dalton
DAM- drenagem ácida de mina
DNA- ácido desoxirribonucleico
dNTP- desoxirribonucleotídeo fosfatado
DO- densidade óptica
EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ES- eficiência simbiótica
FEPAGRO- Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
ha- hectare
IS- índice de solubilização de fosfato
Kb- Kilobases
MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Mb- Megabases
MSF- microrganismos solubilizadores de fosfatos
MSN- massa seca de nódulos
MSPA- matéria seca da parte aérea
MSR- matéria seca das raízes
NA- nitrogênio acumulado
NN- número de nódulos
pb- pares de bases
PCR- reação em cadeia da polimerase
RNA- ácido ribonucleico
RPCP- rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
SEMIA- Coleção do banco de referência nacional para germoplasma de rizóbio do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária.
YM- meio de cultura Extrato de Levedura-Manitol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1.	Mineração de carvão: importância e impactos ambientais.....	25
2.2.	Revegetação na recuperação de áreas degradadas.....	26
2.3.	Importância das leguminosas na recuperação ambiental.....	27
2.4.	Fixação biológica de nitrogênio e os rizóbios	29
2.5.	Benefícios da inoculação de rizóbios em leguminosas	30
2.6.	Outros mecanismos de promoção do crescimento de plantas	31
2.6.1.	Solubilização de fosfato	33
2.6.2.	Produção de sideróforos.....	34
2.6.3.	Produção de ácido indolacético (AIA).....	35
2.6.4.	Regulação dos níveis de etileno pela ACCD.....	35
3.	OBJETIVOS	39
3.1.	Geral.....	39
3.2.	Específicos	39
4.	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1.	Microrganismos utilizados	41
4.2.	Leguminosas herbáceas.....	42
4.3.	Meios de cultura e soluções nutritivas	42
4.4.	Compatibilidade e eficiência simbiótica dos rizóbios.....	43
4.5.1.	Produção do ácido indol acético (AIA).....	45
4.5.2.	Capacidade de solubilização de fosfato.....	45
4.5.3.	Produção de sideróforos	46
4.5.4.	Determinação da concentração de α -cetobutirato.....	46
4.6.	Identificação dos isolados por sequenciamento de gene rDNA 16S	47
4.7.	Análises estatísticas.....	48
5.	RESULTADOS.....	49
5.1.	Compatibilidade e eficiência simbiótica	49
5.1.1.	Efeito da inoculação de rizóbios em Ervilhaca	49
5.1.2.	Efeito da inoculação de rizóbios em Calopogônio	53
5.2.	Capacidade promotora do crescimento das plantas <i>in vitro</i>	57
5.2.1.	Solubilização de fosfato	57
5.2.2.	Produção de sideróforos.....	59
5.2.3.	Quantificação de AIA e de α -cetobutirato.....	59
5.3.	Classificação filogenética baseada no sequenciamento do rDNA 16S	61
6.	DISCUSSÃO	65
6.1.	Compatibilidade e eficiência simbiótica	65

6.2 Capacidade promotora do crescimento das plantas <i>in vitro</i>	68
6.3 Identificação dos isolados por sequenciamento de gene rDNA 16S	73
7. CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O carvão mineral é considerado o combustível fóssil mais abundante no planeta, tendo grande importância na produção de energia elétrica em diversos países. As reservas desse recurso no Brasil atingem 32,6 bilhões de toneladas, estando concentradas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. As atividades de lavra de carvão mineral a céu aberto nestas regiões não foram desenvolvidas com planejamento adequado, e nem observaram os padrões de recuperação necessários e indispensáveis para manter a qualidade do meio ambiente. Somente no sul de Santa Catarina, aproximadamente 6.700 ha encontram-se impactados por essa atividade, cujos substratos existentes nas áreas lavradas são caracterizados por um elevado grau de desestruturação, pH ácido, toxicidade de elementos-traço e textura bastante friável, sendo muito suscetível a processos erosivos.

A revegetação utilizando leguminosas é uma alternativa de baixo custo de implantação e manutenção que auxilia no processo de recuperação de áreas degradadas. Consiste na implantação de uma cobertura vegetal, visando não somente a recuperação paisagística, como também o controle dos processos erosivos e a recuperação das propriedades do solo. Para isso, é essencial a utilização de espécies de plantas capazes de se adaptar a esses solos degradados. Para a revegetação das áreas de preservação permanente, segundo a normativa brasileira, recomenda-se a introdução de leguminosas arbóreas nativas. No entanto, no caso das pilhas de rejeito sugerem-se as leguminosas herbáceas porque não comprometem a impermeabilização dos mesmos, pois não possuem um sistema radicular profundo.

A inoculação dessas plantas com microrganismos promotores de crescimento surge pela dificuldade em se implantar uma cobertura vegetal nesses locais, devido principalmente à baixa disponibilidade de nutrientes e às condições físicas do solo inapropriadas para o crescimento das plantas. Nesse contexto, os rizóbios destacam-se dentro desses microrganismos, pois no processo simbiótico convertem o nitrogênio atmosférico (N_2), não assimilável, em amônia (NH_3^+) passível de ser utilizado pela planta. Além da fixação de nitrogênio as bactérias podem também favorecer o crescimento das plantas através de outros mecanismos, por exemplo, pela produção de fitohormônios tais como auxinas, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos, entre outros.

A proposta deste trabalho consiste na avaliação de rizóbios com relação a diversos mecanismos relacionados com a promoção do crescimento das plantas e adaptação às condições de solos degradados pela mineração do carvão, com vistas a obter inoculantes bacterianos capazes de favorecer as leguminosas herbáceas. Esses poderão ser empregados na revegetação das extensas áreas de pilhas de rejeitos de mineração existentes no Sul do estado de Santa Catarina, assim como em outras áreas degradadas por atividades de mineração no Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Mineração de carvão: importância e impactos ambientais

O carvão mineral é considerado o combustível fóssil mais abundante no planeta, tendo grande importância na produção de energia elétrica em diversos países (WCI, 2005). As reservas no Brasil atingem 32,6 bilhões de toneladas e correspondem a 50% dos recursos energéticos não renováveis do país, sendo as reservas concentradas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CPRM, 2010). No estado de Santa Catarina, encontra-se a segunda maior reserva do minério no Brasil, com 3,4 bilhões de toneladas (GOMES *et al.*, 2003). Apesar do importante papel do carvão na economia do sul do Estado de Santa Catarina, o impacto ambiental causado pela sua exploração é também expressivo, sendo considerada área crítica nacional para fins de controle de poluição (BRASIL, 1980).

As atividades de mineração de carvão alteram física, química e biologicamente os ecossistemas associados às áreas mineradas, pondo em risco o solo, a biota e os recursos hídricos (SOARES *et al.*, 2008). A mineração a céu aberto é uma das atividades produtivas que causa as maiores mudanças nos ecossistemas afetados, devido ao desmatamento, remoção de solo e modificações topográficas sobre áreas relativamente grandes. Além desses efeitos diretos, desencadeia outros indiretos, como o aumento da susceptibilidade à erosão, poluição de corpos d'água, a migração da fauna e a perda do valor paisagístico (BARTH, 1989; SANCHEZ e FORMOSO, 1990).

Dentre os impactos físicos têm-se aqueles ocasionados pelo processo de lavra, ocasionando a destruição da estrutura do solo, pela remoção da vegetação da superfície, a fim de se ter acesso à camada de carvão. No entanto, do ponto de vista químico, a drenagem ácida de mina (DAM) representa um dos maiores problemas ambientais da exploração do carvão, principalmente no estado de Santa Catarina (SILVEIRA *et al.*, 2007). A DAM é gerada pela oxidação da pirita e a formação de ácido sulfúrico, sulfato e íons ferroso e férrico, catalisados principalmente pelas espécies bacterianas *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus denitrificans* (RUBIO, 1998 a, b). O resultado desse processo oxidativo é a redução acentuada no pH do solo, atingindo valores inferiores a 4,0. Nessas condições de acidez grande parte dos

compostos contendo elementos-traço é solubilizada, ficando passíveis de lixiviação e contaminação de mananciais de água, além de dificultar o estabelecimento da vegetação no local contaminado (DIAS *et al.*, 2005).

Calcula-se que exista na região sul do estado de Santa Catarina cerca de 6.700 ha de áreas degradadas pela mineração e que 2/3 dos cursos d'água estejam comprometidos pela DAM e pela deposição de rejeitos nos aquíferos (JICA, 1997). Como resultado do processo de mineração nessas áreas, a fertilidade do solo também encontra-se severamente afetada. Além disso, devido à remoção da vegetação, há mudanças das paisagens com marcado impacto sobre a biodiversidade da região. Dessa forma, a intervenção antrópica para sua recuperação é imprescindível (STAHL *et al.*, 2002; GONÇALVES, 2008).

2.2. Revegetação na recuperação de áreas degradadas

Os tratamentos físico-químicos convencionalmente utilizados para a recuperação de áreas degradadas apresentam várias limitações. Geralmente são custosos, de eficácia limitada e podem afetar de forma irreversível as propriedades do solo, estimulando o desenvolvimento de novas tecnologias (DELGADILLO *et al.*, 2011). A restauração e a reabilitação ecológica constituem práticas interessantes para reduzir a vasta extensão de terras degradadas (BRADSHAW, 1987). A restauração é alcançada quando a área recuperada apresenta características estruturais e funcionais semelhantes ao ecossistema existente antes da intervenção antrópica. Isso geralmente é um objetivo muito difícil, pois exige uma profunda compreensão do ecossistema. Em contraste, a reabilitação é geralmente uma meta mais viável já que o objetivo é conseguir condições semelhantes, mas não necessariamente iguais ao que existia antes da perturbação (PYWELL *et al.*, 2003). A reversão da degradação visa reduzir os impactos sobre a qualidade e funcionalidade dos ecossistemas e isso exige uma ação multidisciplinar que pode ser demorada em função da complexidade e do grau de perturbação ao qual o solo foi submetido (LAMB *et al.*, 2005).

A revegetação é uma alternativa de reabilitação de baixo custo de implantação e manutenção, que auxilia no processo de recuperação de áreas degradadas. Consiste na implantação de uma cobertura vegetal, visando não somente a recuperação paisagística, como também o controle dos processos erosivos e a recuperação das propriedades do

solo (NASCIMENTO e BIONDI, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2008). A manutenção da cobertura do solo propicia também outros benefícios, como proteção contra a radiação solar, mantendo as temperaturas mais baixas e reduzindo a perda de água por evaporação, maior ciclagem de nutrientes, além de beneficiar a atividade biológica (GASSEN e GASSEN, 1996). As espécies de plantas selecionadas para implantação devem se adaptar bem às condições prevalentes de solo e ambiente, sendo ainda ideal que essas espécies apresentem capacidade de fixação do N₂ atmosférico, em razão da carência desse nutriente na maioria dos solos degradados (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

2.3. Importância das leguminosas na recuperação ambiental

Estudos mostram que para a recuperação de áreas devastadas pela mineração é necessário o planejamento adequado do processo de reabilitação, o que permite reduzir o tempo de exposição ao impacto, assim como restituir potencialmente a diversidade biológica e a produtividade do ecossistema (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Nesse contexto, é essencial a utilização de espécies de plantas capazes de se adaptar a esses solos degradados. No entanto, há dificuldade em se implantar uma cobertura vegetal nesses locais devido principalmente à baixa disponibilidade de nitrogênio e fósforo, e às condições físicas do solo, normalmente inapropriadas para o crescimento das plantas (FERRARI e WALL, 2004).

A família Leguminosae ou Fabaceae engloba espécies importantes na alimentação animal e humana. Muitas fazem parte há milênios da cultura de diferentes povos na América. É a terceira família em número de espécies (cerca de 18.500), após Compositae e Orquidiaceas. Distribuem-se em mais de 650 gêneros e podem ser encontradas nos mais variados habitats, do ártico aos trópicos. A família inclui árvores, arbustos e herbáceas, divididas em três subfamílias: Cesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. A sua capacidade para fixar o nitrogênio é uma característica muito interessante do ponto de vista da colonização dos solos pobres, da melhoria ou a regeneração dos degradados, além da sua utilização em práticas agrícolas (PASCUAL, 2003).

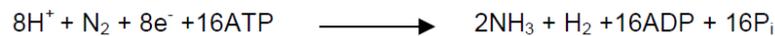
Os locais de maior sensibilidade ambiental, por sua importância ecossistêmica, são denominados áreas de preservação permanente (APP) segundo a Resolução CONAMA 004/94. Para a revegetação dessas

áreas recomenda-se a introdução de leguminosas arbóreas nativas (BRASIL, 1994). Nesse sentido, vários projetos têm tido desenvolvidos com a espécie *Mimosa scabrella* (Bracatinga) visando à recuperação de solos degradados (MELLONI *et al.*, 2004; REGENSBURGER, 2004; CARNEIRO *et al.*, 2008; SATURNO *et al.*, 2009). Em estudo realizado em áreas de mineração de bauxita em Poços de Caldas, Carneiro *et al.* (2008) verificaram que áreas revegetadas com *M. scabrella* apresentaram teores de N-total no solo de 1,11 g/kg de solo após 19 anos, sendo esse valor semelhante ao da área referência não degradada. No sul do estado de Santa Catarina, além de numerosas APP, existem extensas áreas compostas por pilhas de rejeitos (consideradas não APP). Nessas zonas recomendam-se espécies de plantas que não comprometam a impermeabilização dos rejeitos, o seja, não podem ter sistema radicular profundo. Nesse contexto, surge o emprego das leguminosas herbáceas que possuem essa característica além dos outros benefícios que oferecem as leguminosas arbóreas (BRASIL, 2013). Para esse fim, destacam-se algumas espécies herbáceas como *Calopogonium mucunoides*, originária da América do Sul, e *Vicia sativa*, espécie exótica com adaptação às regiões de clima temperado ou de altitude.

Calopogonium mucunoides é uma leguminosa herbácea perene. Possui grande adaptação a solos de baixa fertilidade natural. É capaz de atingir, por exemplo, 80% de seu rendimento máximo sob 60% de saturação de alumínio e 4 mg de P/kg, além de ser tolerante ao manganês tóxico. O desenvolvimento inicial é lento, contudo, uma vez estabelecido, apresenta excelente vigor e alta produtividade, tornando-se muito competitivo (COSTA *et al.*, 2009). *Vicia sativa*, por outro lado, é uma espécie com hábito de crescimento prostrado (decumbente). Desenvolve-se também em solos de baixa fertilidade e com problemas de acidez (baixo pH e presença de alumínio) principalmente no ciclo outono/inverno/primavera. Nessas condições conseguem fixar entre 120 a 180 kg de N/ha (ENNEKING, 1994). O uso dessas leguminosas herbáceas em solos degradados demonstram suas potencialidades para utilização em áreas altamente impactadas. Teodoro *et al.* (2011), em solos da Caatinga Mineira, por exemplo, conseguiram utilizando *Calopogonium mucunoides* um incremento do nitrogênio em 234 kg/ha, além do aumento da matéria orgânica sobre o solo por meio do material senescente e da parte aérea acumulada pelas mesmas.

2.4 Fixação biológica de nitrogênio e os rizóbios

O nitrogênio constitui mais do 80% da atmosfera, mas essa abundância não é aproveitada pelas plantas, as quais estão obrigadas a utilizar apenas as formas combinadas que se encontram no solo em pequenas quantidades. A fixação biológica de nitrogênio contribui significativamente com o fornecimento total do nitrogênio necessário para as plantas. Esse processo é feito por bactérias de vida livre ou em simbiose com as plantas. Há muitas espécies portadoras dessas características pertencentes a diferentes grupos bacterianos. A fixação biológica é altamente consumidora de energia, pois a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio é muito forte. O complexo enzimático nitrogenase (E.C. 1.18.6.1) consome 16 moléculas de ATP por N₂ reduzido, de acordo com a seguinte reação (VOET e VOET, 1995):



Alguns fixadores livres, como *Azotobacter*, requerem energia equivalente a até 100 unidades de glicose por unidade de nitrogênio fixado. No entanto, na fixação simbiótica Rizóbio-Leguminosa, a proporção diminui de 6 a 12 unidades de glicose consumida por unidade de nitrogênio fixado. Por esse fato, *Azotobacter* fornece ao solo somente algumas centenas de gramas de nitrogênio por ha/ano (PASCUAL, 2003). Já pela simbiose pode-se atingir 150 a 200 kg de nitrogênio por ha/ano, dependendo das condições da cultura (BLACK, 1996). Dessa maneira, aumenta-se o aporte de N ao solo reduzindo a relação C/N, o que favorece a mineralização e ciclagem dos nutrientes da matéria orgânica e aumenta a produção de húmus, importante fator de recuperação do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; JOHN, 2011). Apesar dessas diferenças, a fixação livre total é maior, pois a simbiótica está restrita a poucas espécies de plantas. A capacidade de se associar com bactérias que formam nódulos e fixam nitrogênio (BFN) não é uma característica de todas as leguminosas, sendo que a nodulação tem sido relatada na maioria das espécies das subfamílias Mimosoideae e Papilionoideae, enquanto na subfamília Caesalpinioideae poucas espécies têm sido descritas (BARBERI *et al.*, 1998; FARIA e GUEDES, 1999; LASTE *et al.*, 2008). Essa limitação constitui um obstáculo quando se deseja a utilização plena desse processo biológico (PASCUAL, 2003).

Denominam-se rizóbios ao grupo parafilético aonde se agrupam todas as Proteobactérias com capacidade de formar nódulos em simbiose com leguminosas, podendo ser divididos em α e β -Proteobactérias. Dentro das α -Proteobactérias se encontram os gêneros, *Rhizobium* (JORDAN, 1982), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Sinorhizobium* (CHEN et al., 1988), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Devosia* (RIVAS et al., 2002, 2003), *Blastobacter* (VAN BERKUN e EARDLY, 2002), *Methylobacterium* (JOURAND et al., 2004), *Phyllobacterium* (MANTELIN et al., 2006) e *Ochrobactrum* (TEYSSIER e JUMAS-BILAK, 2010). Nas β -Proteobactéria encontram-se espécies dos gêneros *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001), *Cupriavidus* (Chen et al., 2001) e *Herbaspirillum* (VALVERDE et al., 2003).

Alguns rizóbios são muito específicos, com capacidade para infectar e nodular um número reduzido de espécies, enquanto outros são menos seletivos. Em qualquer caso, a capacidade para infectar as células da raiz se deriva do intercâmbio de sinais entre os simbiontes. Flavonóides exudados pelas plantas induzem a expressão dos genes *nod* em *Rhizobium*, envolvidos na síntese dos fatores de nodulação (REDMOND et al., 1986; PERRE et al., 2000). Esses vão estimular os pêlos radiculares permitindo a entrada de rizóbios na planta. Posteriormente, induzem a formação de um canal de infecção, depois a divisão das células corticais, levando à formação dos nódulos que apresentam um interior perfeitamente estruturado, onde se realiza a fixação (YAO e VINCENT, 1969; XI et al., 2000).

2.5 Benefícios da inoculação de rizóbios em leguminosas

Além da escolha da leguminosa adequada para uso em programas de recuperação de solos degradados, é imprescindível o conhecimento sobre as espécies de bactérias a serem utilizadas, uma vez que as mesmas são fundamentais para que ocorra a fixação biológica do nitrogênio. Alguns estudos realizados no Brasil têm demonstrado o potencial dessa simbiose na recuperação de áreas degradadas (FRANCO et al., 1995; FRANCO e FARIA, 1997; FARIA et al., 1998; LASTE et al., 2008). Porém, existem poucas descrições das estirpes capazes de nodular eficientemente as leguminosas herbáceas *Calopogonium mucunoides* e *Vicia sativa* nessas condições. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda o emprego de *Bradyrhizobium japonicum* para *Calopogonium mucunoides* e *Rhizobium leguminosarum* para *Vicia sativa*. Essas recomendações são

muito semelhantes às australianas (VACHOT-GRIFFIN e THIES, 2005).

Estudos de isolamento de rizóbios de áreas impactadas pela mineração de carvão na região de Criciúma foram realizados pelo Laboratório de Microbiologia do Solo da UFSC. Como resultado, obteve-se 16 isolados de rizóbios que apresentaram como principais características culturais a capacidade de acidificar o meio de cultura, a produção de muco e o crescimento rápido, sendo essas características relacionadas com a capacidade adaptativa ao solo degradado. Também se constatou que alguns isolados mostraram-se eficientes em condições controladas para espécies de leguminosas arbóreas nativas da região, como a Bracatinga, com crescimento superior ao tratamento com adubação nitrogenada e/ou inoculadas com a estirpe referência (MOURA *et al.*, 2013). Embora esses isolados apresentem potencial de emprego na revegetação de áreas de APP, seria muito interessante avaliar sua efetividade para leguminosas herbáceas destinadas a áreas que não sejam APP, de modo a possibilitar que as plantas se tornem total ou parcialmente independentes da aplicação de fertilizantes nitrogenados.

2.6 Outros mecanismos de promoção do crescimento de plantas

Denominam-se rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) (PGPR, na sigla em inglês) as bactérias existentes na rizosfera que cumprem às seguintes premissas: têm a capacidade de colonizar a superfície radicular, de sobreviver, multiplicar-se e competir com a microbiota autóctone e promover o crescimento das plantas (KLOEPPER, 1994). Por sua vez, VESSEY (2003) definiu as BPCP como bactérias da rizosfera que podem crescer dentro, sobre ou em torno dos tecidos e assim estimular o crescimento da planta através de uma variedade de mecanismos. SOMERS *et al.* (2004) as classificaram com base em suas atividades funcionais em: biofertilizantes (aumento na disponibilidade de nutrientes na planta), fitoestimuladores (produção de fitormônios), rizo-remediadores (degradação de poluentes orgânicos) e biopesticidas (produção de antibióticos e metabólitos antifúngicos). No entanto, posteriormente GRAY e SMITH (2005) demonstraram que as associações BPCP variam no grau de proximidade bacteriana à raiz e a intimidade da associação. Podem-se separar em: extracelular (eBPCP), que existem na rizosfera, no rizoplano ou nos espaços entre as células do

córtex da raiz, e intracelular (IBPCP), que situam-se no interior das células das raízes geralmente em estruturas nodulares especializadas (FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

Embora os mecanismos de promoção do crescimento das plantas mediado por rizobactérias não estejam completamente elucidados, conhece-se que esta promoção ocorre pela alteração de toda a comunidade microbiana no nicho rizosfera, principalmente através da produção de várias substâncias (KLOEPPER e SCHROTH, 1981). As bactérias podem atuar na planta de maneira direta ou indireta (KLOEPPER, 1993; LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009; BABALOLA, 2010). Pela via direta fornecem à planta alguns dos elementos necessários (nitrogênio, fósforo e minerais essenciais) ou modulam os níveis de seus hormônios. Quando a estimulação do crescimento é indireta, a bactéria libera alguns metabólitos que afetam a outros fatores da rizosfera, o que finalmente reverte numa melhoria para a planta (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009; GLICK, 2012) (Figura 1). Relata-se a seguir alguns dos mecanismos diretos de promoção do crescimento de plantas.

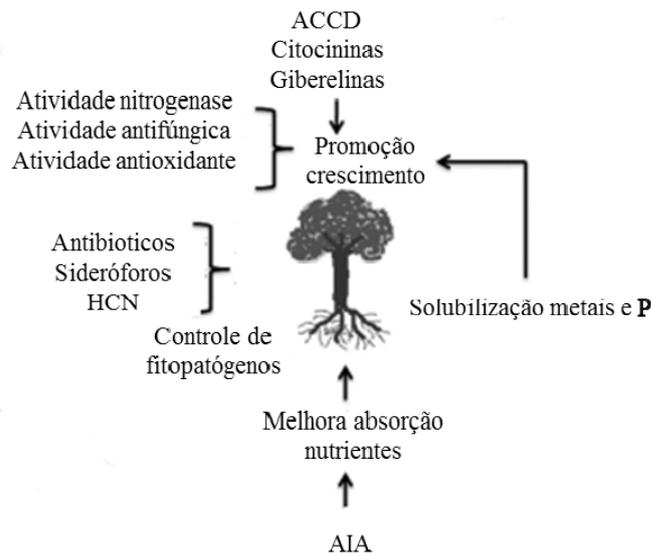


Figura 1. Mecanismo de promoção do crescimento de plantas por rizobactérias (Adaptado de MUNEES e MULUGETA, 2014).

2.6.1 Solubilização de fosfato

O fósforo exerce papel importante no metabolismo das plantas, participando da fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, transferência de genes e na reprodução (STAUFFER e SULEWSKI, 2004). É o segundo fator limitante do crescimento em plantas, depois do nitrogênio (GYANESHWAR *et al.*, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2007). Encontra-se em abundância nos solos, em formas tanto orgânicas quanto inorgânicas (Figura 2), mas em baixa disponibilidade para as plantas.

A dinâmica do P em solos é bem complexa, devido ao fenômeno de fixação de P, isto é, a transformação de P-lábil em P não-lábil (RAIJ, 2004). Este mecanismo é explicado pela grande afinidade que o fósforo tem com Ca^{3+} , Fe^{3+} e Al^{3+} (TURAN *et al.*, 2006, CLAYTON, 2010). Como resultado, na maioria dos solos o P se localiza em suas formas insolúveis, enquanto as plantas absorvem apenas as duas formas solúveis: monobásica (H_2PO_4^-) e dibásica (HPO_4^{2-}) (BHATTACHARYYA e JHA, 2012). Esta situação é superada pela adição de fertilizantes fosfatados concentrados na linha de semeadura. As plantas absorvem uma pequena quantidade dos fosfatados aplicados e o restante é convertido rapidamente nos complexos insolúveis (McKENZIE e ROBERTS, 1990). A aplicação torna-se cara e prejudicial para o meio ambiente, o que tem fomentado a busca de opções ecologicamente mais viáveis. Nesse contexto, os microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) candidatam-se como substitutos dos adubos fosfatados (KHAN *et al.*, 2006) uma vez que a sua atividade solubilizadora permite-lhe, através de vários mecanismos, fornecer à planta o P nas formas disponíveis (OBERSON *et al.*, 2001; EGAMBERDIYEVA *et al.*, 2003, ZAIDI *et al.*, 2009).

A população de MSF varia de um solo para outro entre 10^2 - 3×10^6 UFCg⁻¹ (PIEX *et al.*, 2001). O maior número deles localiza-se na rizosfera aonde se pode alcançar uma concentração de até 5-20 vezes mais que no solo (BROWN e ROVIRA, 1999). Dos vários MSF que habitam a rizosfera, as bactérias solubilizadores de fosfato (BSF) destacam-se, pois, além de proporcionar P para as plantas, também estimulam a eficiência da BFN e potencializam a produção de elementos traço, substâncias muito importantes para o crescimento das plantas (SUMAN *et al.*, 2001; AHMAD *et al.*, 2008; ZAIDI *et al.*, 2009).

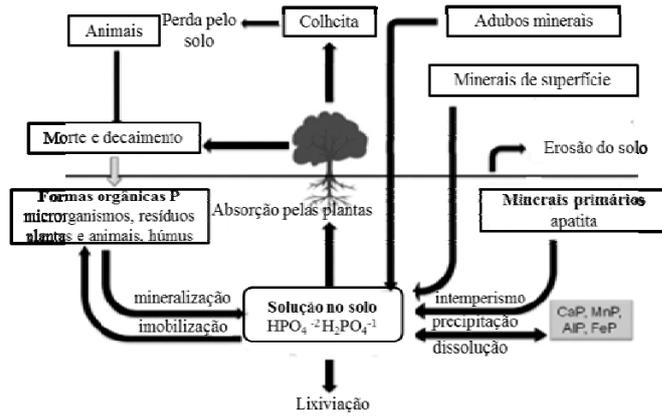


Figura 2. Processo de movimentação de fósforo nos solos (Adaptado de MUNEEES e MULUGETA, 2014).

2.6.2 Produção de sideróforos

O ferro é um elemento essencial para quase todas as formas de vida, pois participa da redução do oxigênio para síntese de ATP, redução de precursores de DNA, formação do grupo heme, entre outras funções (NEILANDS, 1995). Em condições aeróbicas, encontra-se principalmente como ferro Fe^{3+} , sendo susceptível a formar hidróxidos insolúveis ou oxi-hidróxidos, tornando-se, desta forma, inacessível para as plantas e microrganismos (RAJKUMAR *et al.*, 2010). Como estratégia para a obtenção do ferro algumas bactérias produzem sideróforos. Eles são metabólitos secundários quelantes, com massa molecular entre 400 e 2000 Da. Têm a função de se ligar ao Fe^{3+} e transportá-lo através da membrana celular bacteriana, em condições de limitação de ferro (SHARMA e JOHRI, 2003; MARTÍNEZ *et al.*, 2010).

Os sideróforos também podem formar complexos estáveis com outros metais pesados como, por exemplo, Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb e Zn, bem como com radionuclídeos, incluindo U e Np (KISS e FARKAS, 1998; NEUBAUER *et al.*, 2000). Assim, os sideróforos ajudam a aliviar as tensões impostas sobre as plantas por níveis elevados de metais pesados no solo. Além disso, o ferro também faz parte da enzima

nitrogenase, responsável pela conversão do nitrogênio em amônia, e da leghemoglobina, que controla a quantidade de oxigênio dentro dos nódulos (LUCA, 1988). A depleção do ferro no solo pode estimular que a bactéria produza metabólitos secundários responsáveis pela quelação, disponibilizando o ferro para a bactéria e também para a planta, facilitando assim a promoção do crescimento das plantas de forma direta.

2.6.3 Produção de ácido indolacético (AIA)

A produção microbiana de fitormônios é bem conhecida. Relata-se que 80% dos microorganismos isolados da rizosfera possuem a capacidade de sintetizar auxinas como metabólitos secundários, sendo o AIA o principal (PATTEN e GLICK, 1996). Ele tem sido vinculado com todos os aspectos do crescimento e na resposta de defesa da planta. Esta diversidade de funções é reflexo da complexidade no processo de biossíntese, transporte e vias de sinalização do AIA (SANTNER *et al.*, 2009). Além disso, este fitormônio está envolvido na divisão, extensão, diferenciação celular; estímulo à germinação das sementes; aumento da velocidade de desenvolvimento do xilema e das raízes; controle dos processos de crescimento vegetativo; início da formação das raízes laterais e adventícias; mediação das respostas à luz, gravidade e florescimento; influência na fotossíntese; formação de pigmentos; biossíntese de vários metabólitos, e a resistência a condições de stress (SWAIN *et al.* 2007; TSAVKELOVA *et al.*, 2007; GLICK, 2012). O AIA secretado pelas rizobactérias interfere nos processos anteriormente descritos, pois altera na planta o “pool” de auxinas. Adicionalmente, promove o crescimento das raízes e a proliferação dos pêlos radiculares, aumentando assim a absorção de água e sais minerais do solo, e, portanto, obtém-se melhor crescimento das plantas. Adicionalmente o AIA bacteriano também promove a descamação de células da raiz e como resultado aumenta a exudação radicular promovendo maior disponibilidade de nutrientes para as bactérias da rizosfera. (GLICK, 2012).

2.6.4 Regulação dos níveis de etileno pela ACCD

O etileno é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Encontra-se fortemente relacionado com processos como a

germinação de sementes, a diferenciação de tecidos, a formação da raiz e caule primordial, o alongamento da raiz, o início da floração, a síntese de antocianidinas, a abertura da flor, a senescência, o amadurecimento de frutos, a abscisão de folhas e frutos e a resposta ao stresse biótico e abiótico causado à planta (MATTOO e SUTTLE, 1991; ABELES *et al.* 1992; FRANKENBERGER e ARSHAD, 1995; ROMAN *et al.*, 1995; O'DONNELL *et al.*, 1996; SPAINK, 1997; PENNINCKX *et al.*, 1998). Sabe-se que em condições de estresse as plantas produzem etileno em elevadas concentrações, e isso pode levar à inibição do crescimento e mesmo a morte da planta (HYODO, 1991). Em aparente paradoxo, o etileno produzido sob condições de estresse tanto pode aliviar como exacerbar alguns dos efeitos da infecção por organismos patogênicos, dependendo da idade e espécie da planta, bem como do próprio patógeno (ABELES *et al.*, 1992; ARSHAD e FRANKENBERGER, 2002; VAN LOON e GLICK, 2004). STEARNS e GLICK (2003) descreveram um modelo tentando explicar estes efeitos contraditórios da ação do etileno na planta (Figura 3).

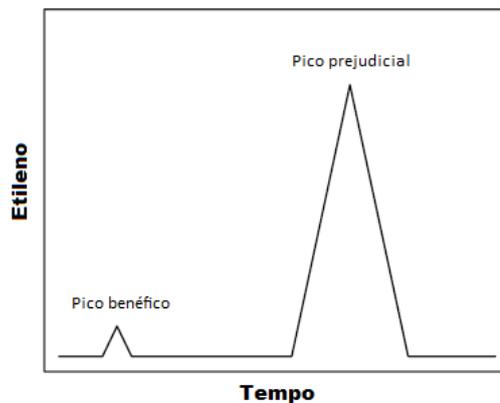


Figura 3. Produção de etileno pela planta em função do tempo, após estresse ambiental (STEARNS e GLICK, 2003).

Segundo esse modelo existe um pequeno pico inicial de etileno, que aparece horas depois da exposição da planta ao estresse, e outro pico de maiores dimensões que aparece entre um a três dias depois da exposição ao stresse. Acredita-se que o pico inicial esteja relacionado com a resposta de proteção primária, levando à ativação da transcrição de genes de resistência adquirida ou de genes relacionados com a

resposta à patogênese (CIARDI *et al.*, 2000; VAN LOON e GLICK, 2004). Nesse estágio inicial há o consumo do “pool” de 1-aminociclopropano-1-carboxylato (ACC) existente nos tecidos da planta (ROBISON *et al.*, 2001). Por outro lado, o segundo pico apresenta elevada magnitude que promove o início dos processos de senescência, clorose e abscisão, resultando na inibição de crescimento da planta e até a sua morte. Esse segundo pico ocorre devido ao aumento da transcrição de genes de ACC sintase desencadeada por fatores ambientais e de desenvolvimento (YANG e HOFFMAN, 1984).

Dentre os efeitos adversos o etileno pode atuar também como inibidor da nodulação das leguminosas *Medicago sativa* (PETERS e CRIST-ESTES, 1989), *Pisum sativum* (GUINEL e GEIL, 2002) e *Trifolium repens* (GOODLASS e SMITH, 1979). Porém, o mecanismo pelo qual ele controla a nodulação não é completamente conhecido. Sugere-se que, uma vez que a nodulação da raiz de leguminosas depender da densidade de rizóbios no rizoplane e rizosfera (FRANCOISE e SCHMIDT, 1982; KUCEY e HYNES, 1989), é possível que o etileno afete a nodulação através da limitação da proliferação dos rizóbios (TAMIMI e TIMKO, 2003). Além de inibir os processos de infecção da planta por rizóbios, o etileno também pode inibir a divisão celular na raiz (GOODLASS e SMITH, 1979), processo fundamental para a formação do nódulo primordial.

A enzima ACC deaminase (E.C. 3.5.99.7) (ACCD) é responsável pela conversão irreversível de ACC, precursor imediato do etileno em plantas, em amônia e α -cetobutirato (Figura 4) (HONMA e SHIMOMURA, 1978). É uma enzima multimérica com uma massa molecular de cerca de 35-42 kDa por subunidade. Ela foi detectada em vários organismos do solo, entre eles vários gêneros de bactérias.

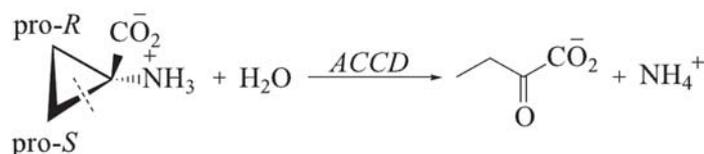


Figura 4. Degradação de ACC pela enzima ACC deaminase (ACCD), formando α -cetobutirato e amônia (NASCIMENTO, 2011).

Apesar da sua relativa abundância, muitas vezes em organismos do mesmo gênero e espécie, a distribuição da ACCD não é uniforme (BLAHA *et al.*, 2006), sugerindo assim que a origem e transferência do

gene *acdS* (gene que codifica para essa enzima) são fatores que influenciam na distribuição e prevalência da mesma. Todavia, se presume que o gene *acdS* seja transmitido horizontalmente (BOUCHER *et al.*, 2003). Entretanto, a presença da enzima ACCD totalmente funcional em plantas como *Arabidopsis* (GLICK *et al.*, 2007) dá suporte à possibilidade da transferência horizontal desse gene. Essa e outras plantas podem ter adquirido o gene *acdS* de bactérias com as quais normalmente se associam (NASCIMENTO, 2011).

Em espécies de rizóbios foram detectadas várias estirpes que possuíam o gene *acdS*. Segundo GLICK (1997), existem pelo menos duas consequências diretas resultantes da diminuição dos níveis de ACC dentro da planta: a redução dos níveis de etileno e a consequente diminuição da inibição do crescimento e proliferação celular. Sendo assim, as plantas que estabelecem relações simbióticas com as BPCP que possuam atividade da enzima ACCD, poderão ter raízes mais longas e possivelmente um maior desenvolvimento da sua parte aérea (NASCIMENTO, 2011).

Nesse sentido, é estratégico que os isolados de rizóbios indicados para produção de inoculantes com vista à revegetação de áreas degradadas, além de ter a capacidade de fixar nitrogênio, possuam algumas das características de promoção de crescimento das plantas, pois irá permitir um melhor estabelecimento da leguminosa, com todos os benefícios que isso traz e que foram anteriormente detalhados, garantindo o êxito da inoculação.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a promoção do crescimento de leguminosas herbáceas em casa de vegetação pela inoculação de rizóbios autóctones isolados de áreas de mineração de carvão.

3.2. Específicos

- a) Avaliar a compatibilidade e a eficiência simbiótica de 16 isolados de rizóbios para as leguminosas herbáceas *Vicia sativa* (Ervilhaca) e *Calopogonio mucunoides* (Calopogônio);
- b) Avaliar os isolados de rizóbio quanto a sua capacidade de promoção do crescimento das plantas, determinando-se a produção de ácido indolacético, α -cetobutirato, sideróforos e a solubilização de fosfato;
- c) Classificar filogeneticamente os isolados de rizóbio com base no sequenciamento do gene rDNA 16S.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos utilizados

Para os testes de compatibilidade e eficiência simbiótica foram avaliados 16 isolados de rizóbios pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal Santa Catarina. Esses isolados foram obtidos como resultado dos estudos de isolamento de rizóbios de áreas impactadas pela mineração de carvão na região de Criciúma, SC, realizados nesse laboratório. Nessa ocasião, Moura *et al.* (2013) realizaram a coleta do solo próximo das raízes de três leguminosas arbóreas que foram implantadas na área no ano de 2008, sendo elas: Acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild), Maricá (*Mimosa bimucronata* (DC) Kuntze) e Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth). Cinco plantas de cada espécie foram aleatoriamente selecionadas com distância mínima de 200 metros entre indivíduos, sendo coletado uma amostra composta de 12 sub-amostras. As amostras de solo foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo para transporte até o Laboratório de Microbiologia do Solo da UFSC para procedimento do isolamento de rizóbios. Para a captura das bactérias fixadoras de nitrogênio, sobretudo as nodulíferas, utilizou-se Feijão caupi (*Vigna unguiculata*), reconhecido como planta-isca por sua baixa especificidade com espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio. Como resultado obtiveram-se 11 isolados de rizóbio oriundos da rizosfera de Bracatinga (aqui designados como UFSC-B) e cinco isolados da rizosfera de Maricá (aqui designados como UFSC-M).

Também foram utilizadas estirpes bacterianas recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para as plantas empregadas: SEMIA 384 (*Rhizobium leguminosarum*), doada pelo Laboratório de Microbiologia Agrícola- FEPAGRO, e BR1602 (*Bradyrhizobium japonicum*), fornecidas pela Embrapa Agrobiologia.

As estirpes *Pseudomonas putida* (UW4) e *Pseudomonas fluorescens* (YsS6) foram utilizadas nos estudos *in vitro* como controles positivos, pois são espécies produtoras de ACCD e de sideróforos. Ambas foram doadas pelo Departamento de Biologia da Universidade de Waterloo, no Canadá.

Todos os isolados foram conservados em meio sólido em ultrafreezer a -80 °C.

4.2. Leguminosas herbáceas

As espécies de plantas empregadas foram duas leguminosas herbáceas comumente utilizadas em programas de revegetação das áreas impactadas pela mineração de carvão na região de Criciúma: *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio) e *Vicia sativa* (Ervilhaca). As sementes foram adquiridas das empresas Sementes Fortaleza (Campinas, SP) e Sementes Pirai (Piracicaba, SP).

4.3. Meios de cultura e soluções nutritivas

Para crescimento dos isolados de rizóbio foi utilizado o meio de cultura Extrato de levedura-manitol (YM) (VICENT, 1970) contendo (em g/L): manitol 10,0; K_2HPO_4 0,50; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,20; NaCl 0,10 e extrato de levedura 0,50. O meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999) foi empregado para avaliar a solubilização de fosfato bicálcico, e continha (em g/L): $(NH_4)_2SO_4$ 0,1; $Ca_3(PO_4)_2$ 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5,0; KCl 0,2 e glicose 10,0. Para a indução da produção de sideróforos foi utilizado o meio King B (KING, 1954) contendo, em g/L: peptona de soja 20,0; K_2HPO_4 1,5; $MgSO_4$ 1,5 e glicerol 15,0 mL.

O meio CAS (SCHWYN e NEILANDS, 1987) foi empregado no ensaio qualitativo para à determinação da produção de sideróforos. Esse meio foi preparado a partir da mistura de 4 pré-formulações:

- 1- Solução Fe-CAS: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (10 mmol/L HCl) 10,0 mL; solução aquosa CAS (1,21 mg/mL) 50,0 mL; solução aquosa HDTMA (1,82 mg/mL) 40,0 mL;
- 2- Tampão: PIBES 30,24 g; K_2HPO_4 0,3 g; NaCl 0,5 g; NH_4Cl 1,0 g; solução de sais 750 mL; ágar bacteriológico 15 g, para o volume final de 800 mL;
- 3- Micronutrientes: glicose 2,0 g; manitol 2,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 493 mg; $CaCl_2$ 11,0 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1,17 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1,4 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,4 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1,0 mg, para volume final igual a 70 mL;
- 4- Solução de casamina ácida filtrada a 10% (p/v): 30 mL.

Para o preparo do meio, as pré-formulações 1, 2 e 3 foram esterilizadas separadamente e misturadas na ordem 3, 2, 4 e 1 antes do ser vertido nas placas.

Para avaliação da produção de ACCD foi utilizado meio mínimo M9 (DWORKIN e FOSTER, 1958), que continha: solução 20xM9 20 mL (Na_2HPO_4 58 g; KH_2PO_4 30 g; NaCl 5 g; NH_4Cl 10 g, dissolvidos em 500 mL de H_2O Milli-Q); solução CaCl_2 0,5 mol/L 0,2 mL; solução MgSO_4 1 mol/L 0,4 mL; solução de biotina 0,3mg/mL 0,4 mL. As soluções foram esterilizadas separadamente e juntadas a 374 mL de H_2O Milli-Q estéril e mais 6 mL de uma solução de glicose 1 mol/L esterilizada por filtração. Para a comprovação da atividade ACCD foram adicionados 50 μL de solução de ACC 0,5 mol/L para cada 5 mL de meio DF.

O pH dos meios de cultura foi ajustado, quando necessário, com solução 1 mol L^{-1} de HCl ou NaOH e, em seguida, esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Para o preparo dos meios sólidos foi adicionado 1,5 % de ágar.

A solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) foi adicionada na parte inferior dos vasos tipo Leonard, utilizados nos ensaios de compatibilidade e eficiência simbiótica dos isolados em casa de vegetação. A solução continha (em mL/L): KH_2PO_4 1 mol/L 1,0; KNO_3 1 mol/L 5,0; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mol/L 5,0; MgSO_4 1mol/L 2,0; solução de micronutrientes [(em g/L) H_3BO_3 2,86; MnCl_2 1,81; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,22; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08; $\text{NaMoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,02] 1,0, Fe-EDTA [(em g/L) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24,1; EDTA 25,1] 1,0. A composição da solução sem adição de nitrogênio consistiu na substituição de KNO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ por 5,0 mL de KCl 1 mol/L e 5,0 mL de CaCl_2 1 mol/L. A solução foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

4.4. Compatibilidade e eficiência simbiótica dos rizóbios

Os isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de nodulação e eficiência simbiótica para as leguminosas herbáceas e comparadas com as respectivas estirpes recomendadas pelo MAPA: Calopogônio (BR 1602 *Bradyrhizobium japonicum*), e Ervilhaca (SEMIA 384 *Rhizobium leguminosarum*). Para tanto, foram conduzidos ensaios em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado (com três repetições) composto de 17 tratamentos de inoculação (16 isolados de rizóbios da coleção UFSC + uma estirpe recomendada pelo MAPA), além de dois tratamentos controle sem inoculação: um sem e outro com nitrogênio mineral (52,535 mgN).

As sementes foram desinfectadas com imersão em hipoclorito de sódio 2% por dois minutos e lavadas seis vezes em água destilada estéril (GARSABALL e CUEVAS, 2006). Após germinação em câmara úmida foram semeadas duas sementes em vasos tipo Leonard (VINCENT, 1970) contendo na sua parte superior 500 cm³ de uma mistura de areia e vermiculita estéril na proporção 1:1 (v/v) e na inferior solução nutritiva esterilizada de HOAGLAND e ARNON (1950) diluída quatro vezes. Em seguida, para compor os tratamentos, foi inoculado um mL de inóculo de BFN pré-crescidas em meio YM durante 48 horas em incubadora com agitação orbital a 135 rpm (10⁷ a 10⁸ células mL⁻¹ meio). Após a emissão da segunda folha cotiledonar foi aplicada uma fina camada de uma mistura de areia esterilizada, clorofórmio e parafina (10 kg, 900 mL e 10 g, respectivamente) com a finalidade de evitar contaminações.

A reposição da solução nutritiva foi feita semanalmente e, após 15 dias da implantação, a solução nutritiva empregada foi a de HOAGLAND e ARNON (1950) com a metade da concentração dos nutrientes. Depois de 60 dias em casa de vegetação as bactérias inoculadas que demonstraram capacidade nodulífera foram consideradas compatíveis e, caso contrário, foram definidas como não compatíveis. As plantas foram colhidas e o número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca das raízes (MSR) foram determinados após secagem em estufa com circulação de ar a 65 °C até peso constante. Foi determinado também o teor de nitrogênio na parte aérea das plantas por meio do método semi-micro Kjeldahl, de acordo com Sarruge e Haag (1979). O nitrogênio acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se teor de nitrogênio com a respectiva produção de matéria seca da parte aérea.

A eficiência simbiótica dos isolados de BFN e das estirpes recomendadas foi calculada segundo a fórmula: $ES = (N \text{ total fixado} - N \text{ total T sem N}) / (N \text{ total T com N} - N \text{ total T sem N}) \times 100$ (LIMA *et al.*, 2005), onde ES = eficiência simbiótica; N total fixado = concentração foliar de nitrogênio do tratamento inoculado; N total T sem N = concentração foliar de nitrogênio do tratamento sem aplicação de N; N total T com N = concentração foliar de nitrogênio do tratamento com aplicação de N.

4.5. Avaliação da capacidade promotora do crescimento das plantas *in vitro*

4.5.1 Produção do ácido indol acético (AIA)

A determinação da produção de ácido indol-acético foi realizada usando o método colorimétrico Salkowski, preparado a partir de cloreto férrico em ácido sulfúrico (GLICKMANN, 1995; SARMIENTO e DEESSAUX, 2006). Os isolados foram crescidos em 50 mL de meio YM e, quando alcançaram uma concentração aproximada de 10^7 a 10^8 células por mL do meio, foi inoculado um mL em cinco mL de meio de cultura YM. Em seguida, foi adicionado triptofano (500 µg/mL) para induzir a produção de AIA. Depois de 24 horas de crescimento no escuro, sob agitação constante (135 rpm) e temperatura de 28 °C, as culturas foram centrifugadas (3248 x g, 15 min). Em seguida, o sobrenadante foi misturado com o reagente Salkowski em relação 2:1 e procedeu-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm (LARA *et al.*, 2011). A concentração de AIA foi determinada utilizando uma curva padrão de AIA x ABS_{535} , sendo as análises realizadas em duplicatas para cada isolado.

4.5.2 Capacidade de solubilização de fosfato

Para determinar a capacidade solubilizadora de fosfato os isolados bacterianos foram multiplicados em 50 mL de meio YM por 48 horas, com temperatura de 28 °C e agitação orbital de 135 rpm. Depois de atingida a concentração correspondente a 10^7 a 10^8 células por mL do meio, usando o método da gota (ALIKHANI *et al.*, 2006), foram inoculados 10 µL de cada suspensão celular em placas de Petri contendo meio NBRIP (Nautiyal, 1999). As placas foram incubadas a 28 °C durante 14 dias. Foram feitas triplicatas para cada isolado.

A solubilização de fosfato foi determinada pelo halo transparente (área de solubilização) formado em torno da colônia, em comparação com o diâmetro da colônia. A determinação do diâmetro da colônia e do halo foi feita com paquímetro aos 3 e 14 dias após a inoculação. A capacidade solubilizadora foi determinada pelo índice de solubilização de fosfato (IS): $IS = (\text{diâmetro da colônia} + \text{diâmetro do halo}) / \text{diâmetro da colônia}$. Foi realizada uma análise descritiva para as médias e intervalos de confiança dos IS para a classificação dos isolados como de baixa, média e alta capacidade de solubilização (BERRAQUERO *et al.*,

1976). Para classificação dos isolados quanto a capacidade solubilizadora, foi utilizada a seguinte escala: baixa para $IS < 2$, Média $2 < IS < 4$ e Alta $IS > 4$.

4.5.3 Produção de sideróforos

Para avaliar a capacidade de produzir sideróforos pelos isolados de rizóbio foi utilizado um método qualitativo que se baseia na competição pelo ferro entre o complexo férrico do cromo azurol S (CAS) e o sideróforo produzido pelo microrganismo. O ferro é removido do CAS pelo sideróforo (o qual se liga ao ferro mais firmemente) e uma reação positiva é indicada por uma mudança de cor do reagente CAS de azul para laranja (SCHWYN e NEILANDS, 1987). Para tanto, 10 μL das culturas bacterianas crescidas *overnight* em meio King B foram inoculados em uma placa de Agar CAS (ALEXANDER e ZUBERER, 1991) incubada a 28 °C. Realizaram-se triplicatas para cada isolado e como controle positivo foram utilizadas as estirpes *Pseudomonas fluorescens* (YsS6) e *Pseudomonas putida* (UW4). Após três dias, os isolados foram classificados em produtores e não produtores de sideróforos, em função da mudança da cor nas placas.

4.5.4 Determinação da concentração de α -cetobutirato

A estimativa da atividade enzimática da ACCD foi realizada segundo o método descrito por PENROSE e GLICK (2003), determinando-se a quantidade de α -cetobutirato produzido pela clivagem de ACC pela enzima ACCD (HONMA e SHIMOMURA, 1978). A quantidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$) de α -cetobutirato produzido foi determinada através da comparação da leitura de absorvância a 540 nm, a partir de uma curva padrão que variou de 0 a 0,5 mmol L^{-1} .

Para isso, foi selecionada uma colônia de cada isolado mantido em meio YMA e repicada para 25 mL de meio YM. Depois de 72 horas de incubação a 28 °C, sob agitação orbital de 135 rpm, as culturas foram centrifugadas a 8314 x g durante 5 min. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com 1 mL 0,1 mol L^{-1} Tris-HCl, pH 7,5 e ressuspensas em 1 mL 0,1 mol L^{-1} Tris-HCl pH 8,5. Foi adicionado a 9 mL de meio mínimo M9 modificado sem fonte de nitrogênio e suplementado com 0,5 mmol L^{-1} de ACC (Calbiochem). Foram incubadas sob agitação a 28 °C a fim de induzir a atividade da enzima

ACC deaminase. Após 48 horas a cultura foi centrifugada (8314 x g, 5 min). O precipitado foi lavado duas vezes com 0,1 mol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5 e ressuspensionado em 400 µL de 0,1 mol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8. Em seguida adicionaram-se 20 µL de tolueno e a solução foi misturada em *vortex* à velocidade máxima durante 30 segundos.

Na sequência juntou-se 50 µL da amostra e 5 µL de uma solução 0,5 mol L⁻¹ de ACC e foi misturado em *vortex* à velocidade máxima durante 5 segundos. Incubou-se a 30 °C durante 30 minutos e adicionados 500 µL de 0,56 mol L⁻¹ HCl. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm durante 5 min e foram retirados 500 µL de sobrenadante para um tubo de ensaio. Adicionou-se 400 µL de 0,56 mol L⁻¹ HCl e 150 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina. Esta solução foi misturada em *vortex* durante 5 segundos. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo (amostra sem adição de ACC). Todas as medições foram realizadas em duplicata.

4.6. Identificação dos isolados por sequenciamento de gene rDNA 16S

Uma colônia de cada isolado bacteriano foi repicada para tubos de 0,2 mL contendo 100 µL de água ultrapura e mantidos a 100 °C por 5 min, seguindo-se uma centrifugação a 13.000 g durante 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 0,2 mL e armazenados em freezer a -20 °C (HAGEN *et al.*, 2002).

Para a classificação de todos os isolados autóctones até nível de gênero foi realizada a amplificação e o sequenciamento da região V1-V3 do gene rDNA 16S. Utilizou-se para a PCR o DNA extraído e os iniciadores PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') (MARCHESI *et al.*, 1998) e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS *et al.*, 1997). A amplificação foi feita em solução tampão para Taq DNA polimerase, contendo 0,2 mmol L⁻¹ de dNTPs, 3 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos iniciadores e 10 ng de DNA. A PCR foi realizada em termociclador modelo Mastercycler Personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com as seguintes condições: 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C, e extensão final a 72 °C por 10 min. Os amplicons foram purificados usando o *kit* Invisorb Fragment CleanUp (Invitek, Berlim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, secos a 60 °C e

enviados para sequenciamento na Macrogen Inc., United State of America.

As sequências fornecidas pela Macrogen foram processadas e comparadas com as sequências depositadas no Genbank. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para verificar a afiliação entre os isolados, uma árvore filogenética foi construída baseada na matriz evolucionária gerada por “*Kimura two-parameter*” e “*neighbor-joining*”, com 1000 “*bootstraps*”, utilizando o programa MEGA 6 (TAMURA *et al.*, 2013).

4.7. Análises estatísticas

Os dados relacionados com a avaliação da eficiência simbiótica e promoção do crescimento foram submetidos à análise de variância, utilizando R-project (Software livre). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Foi necessária a transformação dos valores para algumas variáveis no intuito de atender as pressuposições teóricas dos testes. Em Ervilhaca realizou-se a transformação logaritmo natural para MSPA e a transformação raiz quadrada para teor e acúmulo de N. Em Calopogônio a transformação coseno foi realizada para o teor e acúmulo de N e a transformação logaritmo natural para eficiência simbiótica (ES).

5. RESULTADOS

5.1 Compatibilidade e eficiência simbiótica

5.1.1 Efeito da inoculação de rizóbios em Ervilhaca

A compatibilidade e eficiência simbiótica dos rizóbios para Ervilhaca foi avaliada no inverno, durante os meses de junho a agosto. Após 60 dias da inoculação foi verificado efeito diferenciado dos tratamentos no crescimento das plantas (Figura 5). Verificou-se que a inoculação da estirpe recomendada SEMIA 384 e dos isolados UFSC-M8 e UFSC-M9 favoreceram o crescimento da Ervilhaca, com a produção de folhas verdes, enquanto os demais tratamentos apresentaram acentuada clorose seguida de queda das folhas.

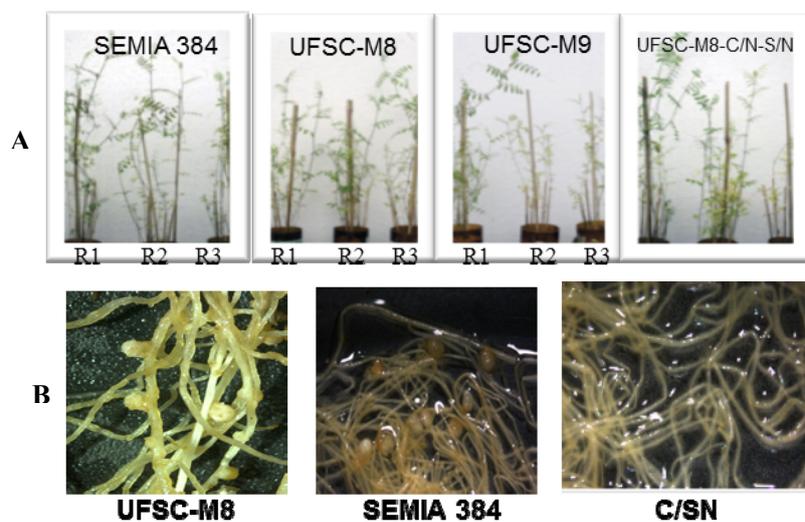


Figura 5. Crescimento da parte aérea (A) e sistema radicular (B) da Ervilhaca inoculada com os rizóbios SEMIA 384, UFSC-M8 e UFSC-M9 após 60 dias da inoculação. R1, R2 e R3, representam as repetições dentro de cada tratamento. C/N = controle nitrogenado; S/N = controle sem nitrogênio.

A inspeção visual das raízes das plantas revelou a presença de nódulos (Figura 5), verificando-se maior variação no tamanho desses entre os isolados, enquanto a cor e a forma dos nódulos exibiram pequenas diferenças. A inoculação da estirpe SEMIA 384 produziu nódulos pequenos e de coloração amarronzada com típica atividade da leghemoglobina, enquanto que os nódulos produzidos pelos isolados UFSC apresentaram maior tamanho, porém de coloração amarelada, demonstrando menor atividade dessa enzima. Dos 16 isolados testados, apenas UFSC-M8 e UFSC-M9 formaram nódulos, sendo considerados compatíveis com a Ervilhaca. A estirpe recomendada SEMIA 384 destacou-se na quantidade de nódulos formados, com incrementos de 108 e 150% em relação aos isolados UFSC-M8 e UFSC-M9, respectivamente (Figura 6A). Apesar do menor número de nódulos, a inoculação com UFSC-M8 proporcionou maior produção de massa seca de nódulos, sendo 22% maior que a estirpe recomendada SEMIA 384 (Figura 6B).

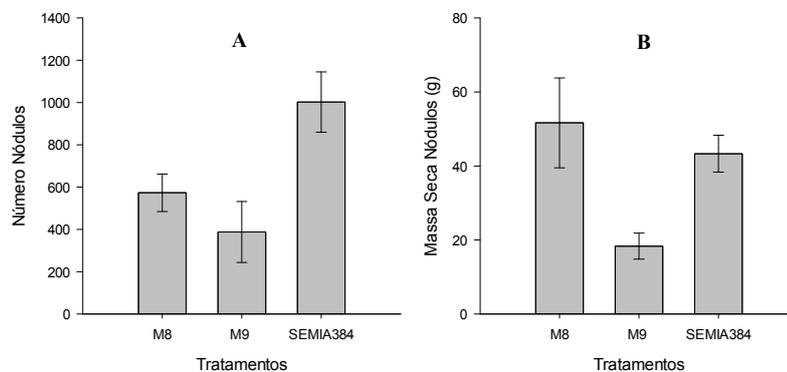


Figura 6. Número (A) e massa seca de nódulos (B) produzidos em *Vicia sativa* (Ervilhaca) inoculada com os rizóbios UFSC-M8, UFSC-M9 e a estirpe SEMIA384, após 60 dias de crescimento. Barras verticais representam o erro-padrão da média (n=3).

A massa seca da parte aérea e raízes da Ervilhaca (Figura 7) foram significativamente influenciadas pelos tratamentos ($P < 0,05$). A maior produção de massa seca da parte aérea foi obtida pelos tratamentos nitrogenado (C/N), UFSC-M8 e SEMIA 384. Já o isolado UFSC-M9 produziu valor de biomassa intermediário, sendo essa superior aos isolados não compatíveis com a Ervilhaca. Os demais

isolados proporcionaram baixa produção de biomassa da parte aérea, sendo estatisticamente semelhante ao controle sem nitrogênio (S/N). Em relação à produção de matéria seca das raízes, verifica-se que houve pequena variação entre os tratamentos testados, sendo que 15 dos 16 isolados apresentaram comportamento semelhante ao tratamento controle S/N. Assim como verificado para a parte aérea, a maior produção de raízes foi obtida no tratamento nitrogenado, seguido do isolado UFSC-M8, o qual aumentou em 72% a biomassa das raízes em relação à média dos demais tratamentos.

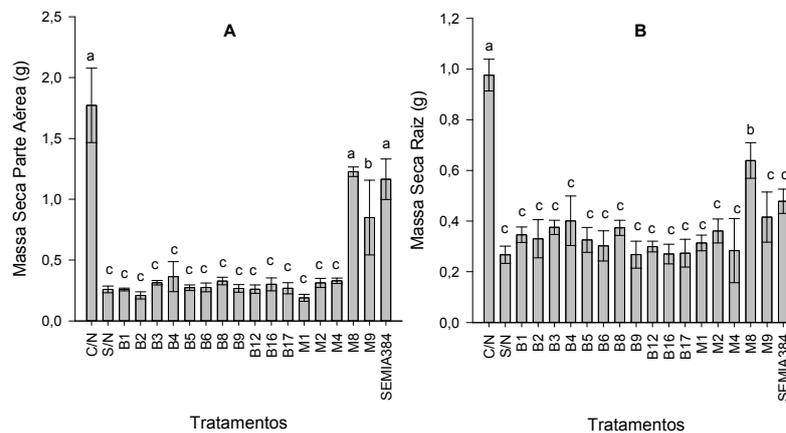


Figura 7. Massa seca de parte aérea (A) e raízes (B) de *Vicia sativa* (Ervilhaca), inoculada com rizóbios, após 60 dias de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro-padrão da média ($n=3$).

O teor e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea da Ervilhaca (Figura 8) foram significativamente influenciados pelos tratamentos ($P < 0,05$). A inoculação com o isolado UFSC-M8 proporcionou teores superiores a $14 \text{ g kg}^{-1} \text{ N}$, sendo esse 108% superior à média dos tratamentos SEMIA 384 e controle C/N (Figura 8A). Os demais tratamentos apresentaram baixos teores de N, com valores inferiores a $6 \text{ g kg}^{-1} \text{ N}$. O acúmulo de N também foi favorecido pela inoculação do isolado UFSC-M8, com incrementos de 75% em relação a estirpe recomendada e ao controle C/N (Figura 8B). O acúmulo de N nos tratamentos C/N, SEMIA 384 e UFSC-M9, apresentou valores

intermediários, enquanto que os demais isolados de rizóbio apresentaram baixo acúmulo de N, semelhante ao tratamento controle S/N.

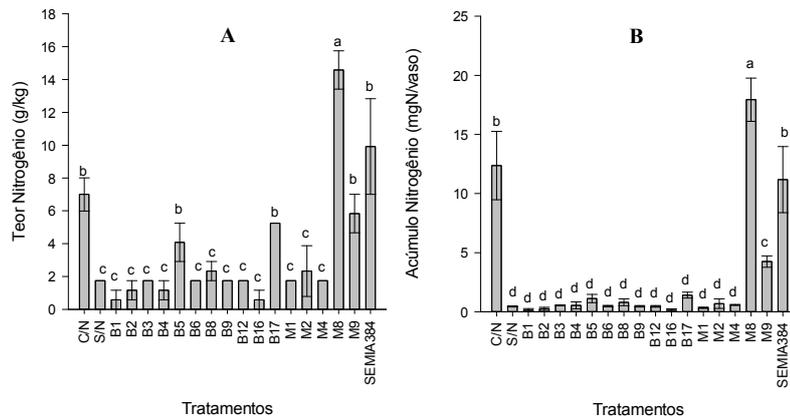


Figura 8. Teor (A) e acúmulo de nitrogênio (B) em *Vicia sativa* (Ervilhaca), inoculada com rizóbios, após 60 dias de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro-padrão da média ($n=3$).

A partir dos dados de crescimento e absorção de N foi calculada a eficiência simbiótica dos isolados (Figura 9). A maior eficiência simbiótica foi obtida a partir da inoculação do isolado UFSC-M8, seguida de SEMIA 384 e UFSC-M9, com valores de 147, 90 e 31% respectivamente. Esses valores evidenciam a capacidade do isolado UFSC-M8 em favorecer o crescimento e nutrição da Ervilhaca em relação ao tratamento nitrogenado, enquanto que o isolado UFSC-M9, apesar de compatível com essa espécie, apresenta menor eficiência simbiótica. Os demais isolados de rizóbio que foram considerados não compatíveis com a Ervilhaca apresentaram baixa eficiência simbiótica, obtendo-se valores inferiores a 20%.

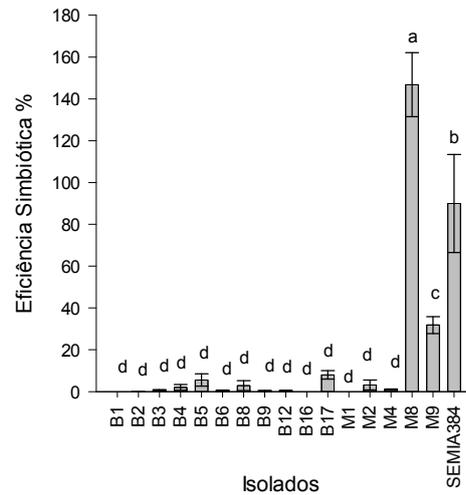


Figura 9. Eficiência simbiótica de rizóbios para *Vicia sativa* (Ervilhaca). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro-padrão da média ($n=3$).

5.1.2 Efeito da inoculação de rizóbios em Calopogônio

A compatibilidade e a eficiência simbiótica dos rizóbios para Calopogônio foi avaliada no outono, entre os meses de março a maio de 2014, durante 60 dias. Nos tratamentos controle C/N e inoculado com a estirpe recomendada BR 1602 constatou-se abundante produção de biomassa da parte aérea, com aparecimento de folhas expandidas e gavinhas foliares (Figura 10). Entretanto, em todos os tratamentos inoculados com os isolados UFSC houve pouca produção foliar, comportamento semelhante ao verificado para o tratamento controle S/N. Ao término do experimento não foram visualizados sinais de senescência para nenhum dos tratamentos. A nodulação foi constatada apenas nos tratamentos UFSC-M4, UFSC-M8 e BR 1602. Os maiores nódulos foram encontrados nas raízes das plantas inoculadas com a estirpe recomendada BR 1602, enquanto que aqueles presentes em UFSC-M4 e UFSC-M8 eram pequenos e amarelados.

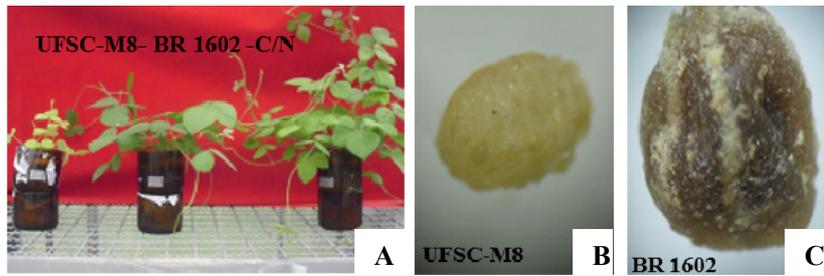


Figura 10. Crescimento (A) e nódulos (B e C) de *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio) inoculado com os rizóbios UFSC-M8 e estirpe BR 1602 após 60 dias da inoculação. C/N = controle nitrogenado.

A presença de nódulos nas raízes das plantas inoculadas com os isolados UFSC-M4, UFSC-M8 e estirpe BR 1602, permitiu considerá-los como compatíveis com o Calopogônio. A estirpe recomendada destacou-se produzindo mais do que o triplo de nódulos produzidos nos isolados UFSC. A quantidade de nódulos formados pelo isolados compatíveis (UFSC-M4 e UFSC-M8) foram semelhantes entre si (Figura 11A). A inoculação da estirpe BR 1602 produziu dez vezes mais matéria seca de nódulos do que a média dos tratamentos UFSC-M4 e UFSC-M8 (Figura 11 B).

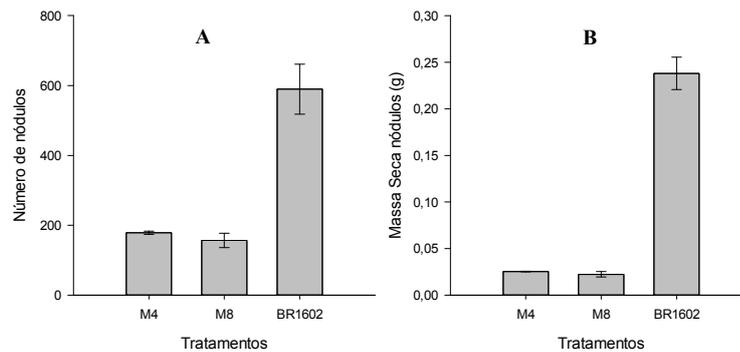


Figura 11. Número de nódulos (A) e massa seca de nódulos (B) produzidos por rizóbios inoculados em *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio), após 60 dias de crescimento. Barras verticais representam o erro-padrão da média (n=3).

A produção de matéria seca da parte aérea e raízes foi significativamente influenciada pelos tratamentos (Figura 12). Dentre os tratamentos, o controle C/N apresentou a maior produção de matéria seca da parte aérea, produzindo aproximadamente 20 vezes mais biomassa que o controle S/N (Figura 12A). A estirpe recomendada BR 1602 apresentou valores intermediários na produção de biomassa, contudo muito superiores aos obtidos para todos os isolados UFSC testados. Constatou-se que o valor médio da matéria seca da parte aérea para os isolados UFSC foi 18 vezes menor que o produzido no tratamento controle C/N. Em relação à produção de MSR, do mesmo modo que para MSPA, foi no tratamento controle C/N onde se alcançaram os maiores valores seguidos pela estirpe BR 1602. Os incrementos obtidos na produção de MSR em relação ao controle S/N foram de 788% para o controle C/N e 157% para a estirpe BR 1602. Por sua vez, não foram verificadas diferenças significativas na biomassa das raízes entre os tratamentos inoculados com os isolados UFSC e o controle S/N (Figura 12B).

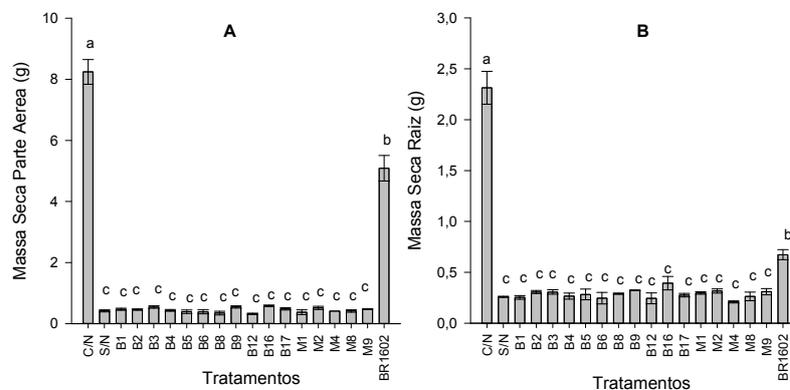


Figura 12. Massa seca da raiz (A) e da parte aérea (B) de *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio) inoculada com rizóbios, após 60 dias de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro-padrão da média ($n=3$).

O teor e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea de *Calopogônio* foram significativamente influenciados pelos tratamentos ($P < 0,05$). Verificou-se que o teor de nitrogênio no tratamento inoculado com a estirpe BR 1602 foi o dobro que o controle C/N (Figura 13A). O teor de

N no controle C/N foi superior a 11 g kg^{-1} , porém estatisticamente semelhante aos demais tratamentos. Entretanto, os isolados UFSC apresentaram baixos teores de N, com valores inferiores a 10 g kg^{-1} . O acúmulo de N também foi favorecido pela inoculação com a estirpe recomendada, com incrementos de 21% em relação ao controle C/N (Figura 13B). Constatou-se que os demais isolados apresentaram baixo acúmulo de N, semelhante ao acontecido no tratamento controle S/N.

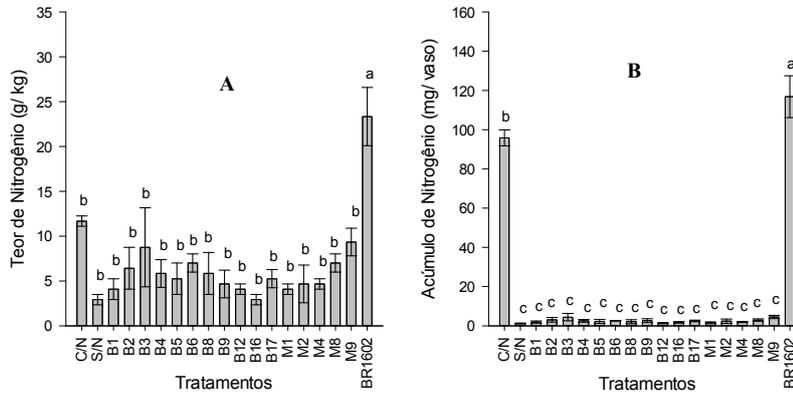


Figura 13. Teor (A) e acúmulo de nitrogênio (B) em *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio) inoculada com rizóbios, após 60 dias de crescimento. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro-padrão da média ($n=3$).

A eficiência simbiótica nos isolados de rizóbio foi confirmada em Calopogônio somente para o tratamento BR 1602 (Figura 14). . Nas condições avaliadas os isolados de rizóbio autóctones de áreas de mineração apresentaram eficiência simbiótica inferior a 10% para Calopogônio.

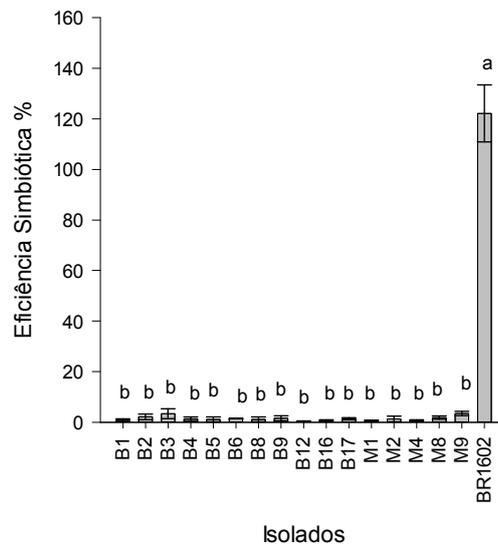


Figura 14. Eficiência simbiótica de rizóbios inoculados em *Calopogonium mucunoides* (Calopogônio). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro-padrão da média ($n=3$).

5.2 Capacidade promotora do crescimento das plantas *in vitro*

5.2.1 Solubilização de fosfato

A capacidade solubilizadora de fosfato bicálcico foi determinada para os 16 rizóbios isolados de áreas de mineração e para as estirpes recomendadas pelo MAPA empregadas na avaliação simbiótica com as duas leguminosas herbáceas testadas. Na Figura 15 pode-se observar a formação dos halos de solubilização em meio NBRIP em que se verifica a capacidade de solubilização diferenciada entre três isolados de rizóbio. Verificou-se capacidade solubilizadora em 14 dos 16 isolados, sendo os isolados UFSC-B4 e UFSC-M4 os únicos que não apresentaram essa característica. Além desses, as estirpes SEMIA 384 e BR 1602 também não apresentaram capacidade solubilizadora de fosfato.

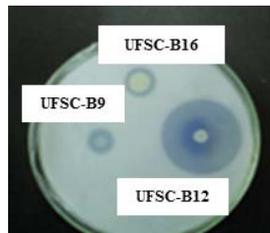


Figura 15. Diferenças entre as áreas de solubilização produzidas pelos isolados autóctones em meio NBRIP contendo CaHPO_4 após 14 dias de incubação a 25 °C.

A Figura 16 apresenta os índices de solubilização (IS) de fosfato para os isolados de rizóbio testados. Os isolados UFSC-B12 e UFSC-M9 destacaram-se em relação aos demais tratamentos, com respectivos valores de IS de 7,1 e 6,6, seguidos de UFSC-B16 com IS de 4,5. Esses isolados apresentaram alta capacidade solubilizadora por apresentarem IS superior a 4. Os isolados UFSC-B1, UFSC-B2 e UFSC-B9 apresentaram capacidade média de solubilização ($2 \leq \text{IS} \leq 4$), enquanto a maioria dos isolados apresentaram baixa capacidade solubilizadora de fosfato ($\text{IS} < 2$).

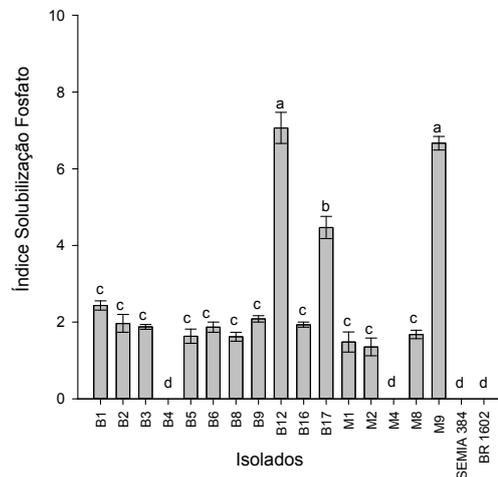


Figura 16. Índice de solubilização de fosfato bicálcico por rizóbios em meio NBRIP após 14 dias de crescimento a 25 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). Barras verticais representam o erro padrão da média ($n=3$).

5.2.2 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada qualitativamente mediante cultivo dos isolados em meio CAS-ágar. Na Figura 17 observa-se que alguns dos isolados de rizóbio apresentaram capacidade de sequestrar o Fe, evidenciado pela mudança da cor de azul para amarelo em torno da colônia. Dentre os isolados autóctones, UFSC-M8 (Figura 17A) foi o que apresentou maiores semelhanças em termos de tamanho do halo com as estirpes de *Pseudomonas fluorescens* (731) e *Pseudomonas putida* (131) utilizadas como controle positivo (Figura 17B). Além desses, verificou-se produção de sideróforos apenas para os isolados UFSC-M1 e UFSC-M4 (Figura 17C). Importante ressaltar que não houve formação de halo para nenhum dos isolados de rizóbio provenientes de amostras de solo rizosférico de Bracatinga, ficando restrito somente aos isolados bacterianos provenientes de amostras de solo rizosférico de Maricá. As estirpes recomendadas SEMIA 384 e BR 1602 também não apresentaram produção de sideróforos.

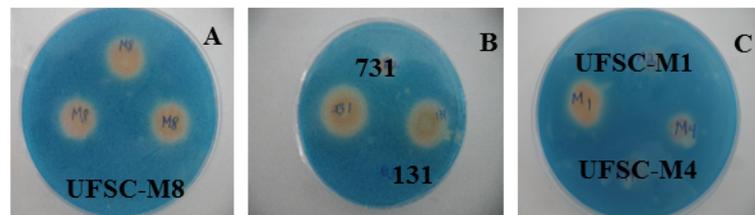


Figura 17. Ensaio para verificar a produção de sideróforos por isolados de rizóbios em meio CAS-ágar, após 72 h de crescimento a 25 °C. Halo amarelo indica resultado positivo. 131 = *Pseudomonas putida* (UW4); 731 = *P. fluorescens* (YsS6).

5.2.3 Quantificação de AIA e de α -cetobutirato

A quantificação do ácido indol acético (AIA) foi realizada pelo método colorimétrico que utiliza o reagente de Salwoski. A Figura 18 ilustra a curva padrão de AIA e a produção da auxina por alguns dos isolados de rizóbio testados.

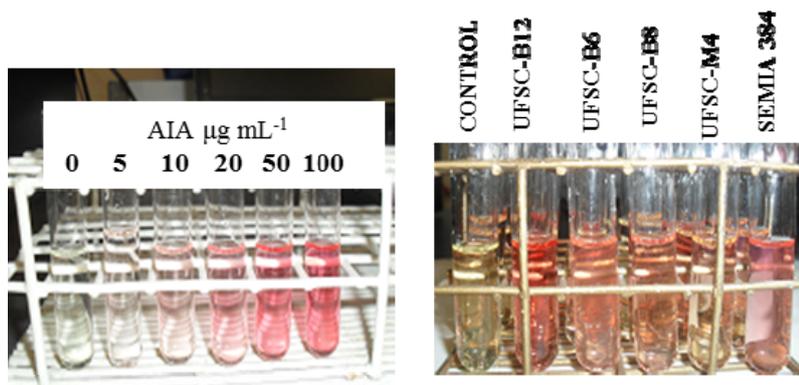


Figura 18. Representação qualitativa da produção de ácido indol acético por isolados de rizóbios: (A) diluições para a determinação da curva padrão; (B) reações indicando a produção de AIA em presença do Trp como indutor.

Verificou-se que todos os isolados de rizóbio autóctones e as estirpes recomendadas apresentaram produção de AIA. A produção de AIA variou de 2,6 a 62,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, destacando-se os isolados UFSC-B12 e UFSC-M9, seguidos pela estirpe recomendada SEMIA 384 (Tabela 1). A maioria das bactérias testadas (72%, $n=13$) produziu concentrações de AIA na faixa de 10,0 a 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto em apenas 11% ($n=2$) a produção foi inferior a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Constatou-se que a produção da auxina não dependeu da procedência dos isolados de rizóbio, pois entre os maiores e menores produtores tem-se isolados provenientes de Bracatinga, Maricá, bem como estirpes recomendadas pelo MAPA.

Para verificar a capacidade de produção de ACCD realizou-se a quantificação de α -cetobutirato (Tabela 1). Dos 16 isolados de rizóbio testados apenas UFSC-M4 e UFSC-M8 foram capazes de converter ACC em α -cetobutirato, com valores variando de 12,8 a 17 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esses valores foram inferiores aos encontrados para a estirpe *P. fluorescens* (YsS6) empregada como controle positivo (123,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Tabela 1. Produção de ácido indol acético (AIA) e de α -cetobutirato por isolados de rizóbios de áreas de mineração de carvão, estirpes recomendadas pelo MAPA e *P. fluorescens* (estirpe controle para ACCD).

Isolados	Concentração de AIA* ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração de α -cetobutirato** ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
UFSC-B1	25,7 \pm 6,5 d	0,0
UFSC-B2	15,7 \pm 0,1 f	0,0
UFSC-B3	22,0 \pm 1,0 e	0,0
UFSC-B4	26,9 \pm 0,1 d	0,0
UFSC-B5	14,9 \pm 0,1 f	0,0
UFSC-B6	21,9 \pm 0,3 e	0,0
UFSC-B8	20,3 \pm 0,1 d	0,0
UFSC-B9	19,4 \pm 1,2 f	0,0
UFSC-B12	62,7 \pm 3,5 a	0,0
UFSC-B16	14,4 \pm 1,5 f	0,0
UFSC-B17	39,9 \pm 6,4 c	0,0
UFSC-M1	15,5 \pm 3,8 f	0,0
UFSC-M2	12,4 \pm 0,0 f	0,0
UFSC-M4	4,7 \pm 3,4 g	12,8 \pm 3,0
UFSC-M8	33,4 \pm 17,4 e	17,0 \pm 9,0
UFSC-M9	60,1 \pm 2,6 a	0,0
SEMIA 384	46,85 \pm 0,0 b	0,0
BR 1602	2,6 \pm 0,7 g	0,0
<i>P. fluorescens</i> (YsS6)	n.d.	123,3 \pm 4,3

Os dados representam a média \pm desvio padrão de duas repetições. Letras diferentes na coluna representam diferenças significativas entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$). n.d. = não determinado. * Produção de AIA em meio YM suplementado com 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de L-triptofano; **Produção de α -cetobutirato em meio M9 suplementado com 5 μL de 0,5 mol L^{-1} de ACC.

5.3 Classificação filogenética baseada no sequenciamento do rDNA 16S

Com base no sequenciamento parcial do gene rDNA 16S (Figura 19), os isolados foram classificados nas ordens α -Proteobacteria e β -Proteobacteria. Dentro de α -Proteobacteria foram apontados isolados pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Gluconobacter*. Na ordem correspondente à β -Proteobacteria identificou-se o gênero *Burkholderia*.

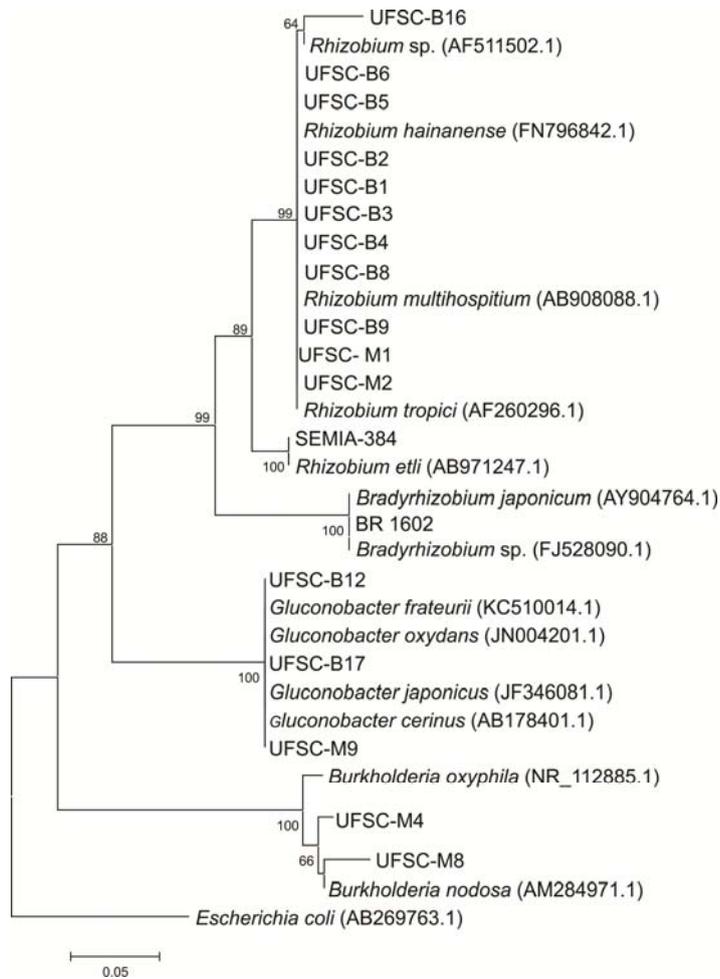


Figura 19. Árvore filogenética *neighbour-joining* baseada no sequenciamento parcial (455 pb) do gene rDNA 16S de rizóbios autóctones isolados de áreas de mineração de carvão. Números precedendo indicam valores de *bootstrap* acima do limite de representatividade. A barra representa 0,05 substituições por posição de nucleotídeo. Dados em parênteses representam os números de acesso das seqüências no *GenBank*. *Escherichia coli* (AB269763.1) foi utilizada como *outgroup*.

Os resultados indicam que *Rhizobium* é o principal gênero presente na rizosfera de Bracatinga e Maricá na áreas que foram coletadas e nas condições avaliadas, uma vez que dez dos 16 isolados se agruparam nesse gênero. Os isolados de rizóbio compatíveis com Ervilhaca pertencem aos gêneros *Burkholderia* (UFSC-M8) e *Gluconobacter* (UFSC-M9). Enquanto isso, os rizóbios que nodularam o Calopogônio (UFSC-M4 e UFSC-M8) pertencem apenas ao gênero *Burkholderia*.

6. DISCUSSÃO

6.1 Compatibilidade e eficiência simbiótica

A exploração do carvão mineral no sul do Brasil constitui um claro exemplo do impacto ambiental causado pela ação antrópica, considerando-se área crítica nacional para fins de controle de poluição desde a década de 1980. Somente no sul de Santa Catarina se encontram impactadas por esta atividade aproximadamente 6.700 ha. Os métodos tradicionais utilizados para a recuperação dessas áreas apresentam várias limitações, surgindo assim a revegetação como a principal prática para recompor e proteger o solo, reduzir a poluição das águas e promover o retorno da biota edáfica (MELLONI *et al.*, 2003, 2004), além de incrementar a sucessão vegetal, contribuindo, conseqüentemente, para o fluxo de energia e nutrientes nos ecossistemas (SIQUEIRA *et al.*, 1994). Uma das limitações para a revegetação de áreas mineradas é a fertilidade do solo ou do substrato, sendo o nitrogênio um dos fatores limitantes para o crescimento (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Nesse sentido, encontra-se amplamente relatado a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio como importante forma de disponibilizar esse nutriente após o estabelecimento da simbiose com leguminosas.

O presente trabalho tem caráter inovador em função da caracterização de isolados de rizóbios provenientes de áreas de mineração de carvão com potencial para emprego na inoculação de leguminosas visando a revegetação das áreas impactadas pela mineração de carvão na região sul do Brasil. Poucos são os trabalhos desenvolvidos no Brasil que visam o isolamento de microrganismos com esses fins. No país, destacam-se as pesquisas desenvolvidas em áreas de mineração de bauxita (NÓBREGA *et al.*, 2004; MELLONI *et al.*, 2006). Existem também alguns trabalhos com esse enfoque realizados em áreas de extração de brita em Goiás (OLIVEIRA *et al.*, 2011), e de manganês em Mato Grosso do Sul (VERISSIMO e VARCARCEL, 1992). No entanto, a linha desenvolvida pelo nosso grupo é uma das pioneiras em áreas de mineração de carvão no Brasil, fato importante se considerarmos os impactos advindos da extração e beneficiamento desse mineral.

No presente estudo foram avaliados 16 isolados de rizóbios obtidos a partir de solo rizosférico das leguminosas arbóreas Bracatinga e Maricá, presentes nas áreas impactadas. Constatou-se em trabalhos prévios que alguns desses isolados apresentam benefícios para o

crescimento de espécies de leguminosas arbóreas nativas da região (MOURA *et al.*, 2013), revelando-se como potenciais inoculantes para emprego na revegetação de áreas APP. Contudo, não há conhecimento a respeito da efetividade desses rizóbios para leguminosas herbáceas comumente utilizadas em programas de revegetação. Dentre essas espécies destacam-se a Ervilhaca e o Calopogônio, as quais têm sido empregadas em programas de revegetação de áreas impactadas pela mineração de carvão (ROCHA-NICOLEITE *et al.*, 2013), apresentando como características desejáveis a alta tolerância à acidez e elevada quantidade de nitrogênio fixado (ENNEKING, 1994; COSTA *et al.*, 2009). Além disso, essas leguminosas apresentam elevada produção de biomassa, contribuindo assim para a cobertura do solo com redução dos processos erosivos comuns em locais contendo pilhas de rejeito e material estéril (SANTOS *et al.*, 2008; HOLANDA NETO, 2011). Dessa maneira, a utilização da Ervilhaca e do Calopogônio representa uma estratégia interessante para a melhoria da qualidade do solo com consequente favorecimento da recuperação das áreas impactadas.

Para a adoção da tecnologia de inoculação de rizóbios para as leguminosas, há a necessidade de se verificar a compatibilidade e eficiência simbiótica dos mesmos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Em uma primeira etapa são realizados ensaios em condições controladas para verificar a capacidade de nodulação, efeitos no crescimento e quantidade de nitrogênio fixada via simbiose. Existe no Brasil uma extensa lista de inoculantes para leguminosas que o MAPA recomenda para utilização na agricultura. Entretanto, o emprego de espécies de rizóbios autóctones de áreas degradadas pela mineração como inoculantes é promissor, pois, em teoria, essas espécies se encontram mais adaptadas às condições edáficas e ambientais desse tipo de local.

Nesse sentido, o presente trabalho constatou que a Ervilhaca apresenta compatibilidade com dois dos 16 rizóbios autóctones avaliados, destacando-se o isolado UFSC-M8 que apresentou elevada eficiência simbiótica. Enquanto isso, apesar de se verificar compatibilidade de dois isolados com o Calopogônio, esses foram de baixa eficiência simbiótica. Sabe-se que o número de nódulos para diferentes leguminosas varia principalmente em razão do método utilizado para o cultivo das plantas e das condições ambientais nas quais os experimentos foram conduzidos (FERREIRA *et al.*, 2012b). Verificou-se que houve elevada produção de nódulos nas raízes inoculadas com os isolados compatíveis, obtendo-se valores muito superiores àqueles comumente encontrados na literatura em situações de vaso com solo (VERONEZI *et al.*, 2011). Isso estaria relacionado com

a utilização de vasos Leonard no cultivo das plantas, que poderia favorecer o estabelecimento da simbiose.

A inoculação da Ervilhaca com os isolados UFSC-M8 e UFSC-M9 promoveu a formação de grande quantidade de nódulos, porém em menor grau do que a estirpe recomendada SEMIA 384. Apesar disso, a inoculação de UFSC-M8 foi a mais eficiente para essa leguminosa, indicando que a eficiência simbiótica desse isolado estaria mais relacionada com a massa seca dos nódulos do que com a abundância dos mesmos. Correlações positivas e significativas entre a massa nodular e o nitrogênio fixado biologicamente foram descritas anteriormente (DÖBEREINER *et al.*, 1966). No entanto, frequentemente encontra-se na literatura a associação da eficiência simbiótica com o número de nódulos produzidos (LIMA *et al.*, 2009).

A formação de maior quantidade de nódulos pelos isolados não necessariamente contribui para a maior produção de matéria seca desses. Ferreira *et al.* (2012b) verificaram que houve uma relação direta entre a produção de matéria seca dos nódulos e o crescimento de cinco espécies de leguminosas inoculadas com *Cupriavidus* sp. Essa mesma relação foi constatada no presente trabalho, confirmando que a capacidade de formação de nódulos maiores contribui efetivamente para o crescimento da Ervilhaca. No caso do Calopogônio, houve também a formação de grande número de nódulos pelos isolados UFSC-M4 e UFSC-M8, porém esses foram pequenos, de coloração amarelada e de baixa eficiência para essa leguminosa. A inoculação dos rizóbios UFSC-M8 e SEMIA 384 para a Ervilhaca e BR 1602 para o Calopogônio ocasionou a formação de nódulos avermelhados, indicativo da presença da proteína leghemoglobina. Nódulos vermelhos e acobreados sugerem a presença dessa proteína que contém ferro em sua estrutura e que exerce importante papel no transporte de oxigênio no interior dos bacterióides. Essa proteína é importante para não comprometer a atividade da nitrogenase que é responsável pela fixação biológica do nitrogênio sendo sensível a altos níveis de oxigênio (APPLEBY, 1984). Taulé *et al.* (2012) observaram nódulos brancos e pequenos em *Mimosa pudica* inoculadas com isolados de *Burkholderia* sp. ineficientes para essa leguminosa, enquanto que a inoculação de isolados eficientes de *Cupriavidus* sp. produziu nódulos avermelhados em *Parapiptadenia rigida*, beneficiando o crescimento da planta. Nesse sentido, sugere-se estudos complementares envolvendo a identificação e expressão dessas proteínas na interação de leguminosas herbáceas e isolados de rizóbios aqui testados.

No presente trabalho a eficiência simbiótica para as leguminosas herbáceas foi restrita a poucos isolados de rizóbio autóctones das áreas de mineração de carvão. Dentre os 16 isolados de rizóbio testados, apenas UFSC-M8 apresentou elevada eficiência simbiótica para a Ervilhaca, apresentando ganhos na produção de biomassa da parte aérea e nutrição nitrogenada para a planta. Além disso, esse isolado destacou-se quanto ao aumento da produção de raízes, sendo inferior apenas ao tratamento controle C/N. É interessante notar que a inoculação da estirpe recomendada SEMIA 384 apresentou baixa produção de raízes, sendo essa equivalente ao tratamento controle S/N e aos isolados não compatíveis com a Ervilhaca. Como consequência, houve acentuada perda foliar nessas plantas, o que não foi verificado para as plantas inoculadas com a estirpe recomendada. Nesse caso, o contínuo fornecimento de nitrogênio por essa estirpe permitiu o crescimento da Ervilhaca mesmo com baixa produção de raízes. Esses resultados evidenciam que o isolado UFSC-M8 beneficia o crescimento da Ervilhaca por meio do processo de fixação biológica do nitrogênio. No entanto, podem estar ocorrendo também outros mecanismos de promoção do crescimento. Considerando sua procedência, pode-se afirmar que esse rizóbio pode constituir uma importante vantagem no estabelecimento da Ervilhaca em áreas degradadas pela mineração de carvão se comparado com a estirpe SEMIA 384.

Apenas a estirpe recomendada BR 1602 apresentou elevada eficiência simbiótica para o Calopogônio, havendo pouca contribuição dos rizóbios autóctones para o crescimento dessa espécie vegetal. Considerando a origem dos rizóbios avaliados, os quais foram isolados da rizosfera de Bracatinga e Maricá, pode ter ocorrido uma seleção de espécies bacterianas que não são compatíveis com o Calopogônio. Sabe-se que a estirpe recomendada para essa leguminosa é *Bradyrhizobium japonicum* e os isolados de rizóbio pertencem a outros gêneros, conforme será discutido mais adiante.

6.2 Capacidade promotora do crescimento das plantas *in vitro*

O importante papel exercido pelas bactérias promotoras do crescimento vegetal na agricultura trouxe um aumento considerável nos estudos de isolamento e identificação de bactérias associadas à rizosfera de numerosas culturas. De modo geral, o intuito nessas pesquisas é elucidar os mecanismos pelos quais as bactérias conseguem favorecer o

crescimento dessas plantas (GUTIERREZ-MANERO *et al.*, 2001; CHAKRABORTY *et al.*, 2006; KIM e KIM, 2008; PHI *et al.*, 2010). Entretanto, a maioria das bactérias descritas com capacidade promotora do crescimento vegetal (BPCP) foram isoladas de culturas agrícolas em condições de campo (JOSHI e BHATT, 2011; FARINA *et al.*, 2012; SON *et al.*, 2014), sendo poucos os trabalhos relacionados aos microrganismos autóctones de ambientes degradados (NAVARRO-NOYA *et al.*, 2012; LONGATTI *et al.*, 2013 b; SON *et al.*, 2014). No presente trabalho constatou-se que a maioria dos isolados compartilhou mais de uma característica de BPCP, sendo esse comportamento já descrito em vários trabalhos (BELIMOV *et al.*, 1995; LAZAROVITS e NOWAK, 1997; HAM *et al.*, 2009).

Apesar de a quantidade de P no solo ser geralmente alta, a maior parte dele se encontra em sua forma insolúvel, e, por conseguinte, não está disponível para o crescimento vegetal (KHAN *et al.*, 2007). Os microrganismos solubilizadores de fosfato conseguem a disponibilização mediante os mecanismos de solubilização e/ou mineralização (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999). O mecanismo envolvido na solubilização das formas insolúveis de P-Ca, P-Fe e P-Al é a produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, por exemplo, ácido glucônico e ácido cítrico (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; MARRA *et al.*, 2011), enquanto a mineralização acontece devido à produção de fosfatases (TAO *et al.*, 2008). Desafortunadamente, o emprego comercial de bactérias solubilizadoras de fosfato tem sido bastante limitado, fundamentalmente devido aos resultados variáveis exibidos por elas (GLICK, 2012). De fato, os efeitos positivos mais consistentes foram obtidos pela co-inoculação dessas bactérias com outras que possuíam outros atributos fisiológicos como, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio (ROJAS *et al.*, 2001). Dos 16 isolados de rizóbio avaliados neste trabalho, foi verificada capacidade solubilizadora de fosfato para 75% (n=14) desses. Sabe-se que áreas de mineração de carvão apresentam elevada acidez (FANNING e FANNING, 1989; FUNGARO e IZIDORO, 2006), e nessa situação há predomínio de fosfatos insolúveis ligados a Fe e Al. Neste trabalho avaliou-se a solubilização de formas de fosfato ligadas a Ca, uma vez que vários trabalhos revelam que os microrganismos solubilizadores de P-Ca também apresentam capacidade de solubilização de P-Fe e P-Al (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; HARA e OLIVEIRA, 2005; MARRA *et al.*, 2011), e porque os isolados aqui testados poderão apresentar potencial de serem empregados em outras situações de ambientes degradados onde exista predomínio de P-Ca. Trabalhos prévios

demonstraram que os isolados de rizóbio aqui testados apresentam capacidade de acidificação do meio de cultura (MOURA *et al.*, 2013). Entretanto, se considerarmos a elevada acidez do solo das áreas de mineração de carvão, é de se esperar a ocorrência generalizada de bactérias solubilizadoras de fosfato, como demonstrado neste trabalho. Vários estudos demonstraram que a redução do pH aumenta a solubilização de fosfatos insolúveis (CUNNINGHAM e KUIACK, 1992; WHITELAW, 2000; SANGEETA e NAUTIYAL, 2001; PRADHAN e SUKLA, 2005). Portanto, são imprescindíveis estudos como este que visam à seleção de isolados de áreas degradadas que possuam não apenas a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, mas também a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis.

Outra característica importante de BPCP é a produção de sideróforos (LOPER e BUYER, 1991). Apesar do Fe ser um elemento abundante no solo, o mais frequente é que esse se encontre como Fe^{3+} , forma de moderada disponibilidade. Desse modo, a quantidade de Fe disponível para assimilação pelos organismos vivos é extremamente baixa (MA, 2005). O Fe é considerado um elemento essencial, tanto para as plantas quanto para os microrganismos (GUERINOT e YING, 1994). Algumas bactérias produzem sideróforos, que são metabólitos de baixo peso molecular com elevada afinidade pelo Fe. Essa produção de sideróforos permite sequestrar o Fe do meio, sendo uma estratégia de sobrevivência em condições onde esse elemento é limitante (NEILANDS, 1988; HIDER e KONG, 2010). Son *et al.* (2014) constataram a presença de bactérias produtoras de sideróforos em áreas vulcânicas como consequência da alta salinidade, acentuada acidez e poucos nutrientes presentes no solo, situações essas comumente encontradas em ambientes degradados. Na literatura também é descrito que interações simbióticas entre rizóbios e leguminosas podem aumentar a aquisição de Fe por meio da produção de sideróforos (JIN *et al.*, 2008). Áreas de mineração de carvão apresentam elevadas concentrações de elementos-traço (FUNGARO e IZIDORO, 2006; DAHMER, 2014) e o excesso desses elementos induz deficiência de Fe nas plantas, ocasionando clorose e perda foliar (FONTES e COX, 1998; FERREIRA *et al.*, 2014). Dessa forma, os sideróforos produzidos pelos microrganismos podem atuar na redução da toxicidade de elementos-traço mediante o aumento no fornecimento de Fe para as plantas (BURD *et al.*, 2000; BELIMOV *et al.*, 2005; BRAUD *et al.*, 2006). No presente trabalho foi verificado que apenas 18% dos isolados de rizóbio testados (UFSC-M1, UFSC-M4 e UFSC-M8) produziram sideróforos. Considerando que os microrganismos produtores de siderofóros são

mais eficazes na competição pelo Fe que outros microrganismos na rizosfera (HIIFTE *et al.*, 1994), pode-se esperar que os isolados de rizóbio acima citados são promissores na inoculação de leguminosas em ambientes degradados. Para a Ervilhaca destaca-se o isolado UFSC-M8 que, além de elevada eficiência simbiótica, apresenta produção de sideróforos.

A produção de fitohormônios por bactérias é considerada um dos principais mecanismos de promoção do crescimento em plantas. Embora vários trabalhos descrevessem bactérias produtoras de auxinas como AIA, citocinas e giberelinas (BELIMOV *et al.*, 1995; BARAZANI e FRIENDMAN, 1999; TIMMUSK e WAGNER, 1999; GUTIERREZ-MANERO *et al.*, 2001; MEHNAZ *et al.*, 2001), o AIA é a auxina mais comum e melhor estudada (GLICK, 2012). Grande parte da comunidade científica considera as terminologias auxina e AIA como sendo intermutáveis (PATTEN e GLICK, 1996; SPAEPEN, 2007). Desse modo, essa auxina tem sido vinculada a vários processos fisiológicos importantes para a planta (TSAVKELOVA *et al.*, 2006; SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011). A maioria das estirpes de *Rhizobium* são capazes de produzir AIA (BADENOCH-JONES *et al.*, 1984), como constatado no presente trabalho. Além disso, alguns autores descreveram que há a necessidade de elevação nos níveis de auxinas para a formação dos nódulos (MATHESIUS *et al.*, 1998). *Bradyrhizobium elkanii*, com níveis reduzidos do AIA, induziu menor nodulação nas raízes de soja do que a sua estirpe selvagem (FUKUHARA *et al.*, 1994). Desse modo, sugere-se que uma parte do AIA encontrado nos nódulos seja de origem procariótica e que facilita a nodulação em plantas (THEUNIS, 2005).

Neste trabalho, a produção de AIA pelos rizóbios foi bastante variada, com valores entre 4,7 e 62,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses valores estão de acordo com aqueles descritos na literatura. Para rizóbios provenientes de áreas de mineração de bauxita, obtiveram-se valores de até 42,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LONGATTI *et al.*, 2013). Navarro-Noya *et al.* (2012) isolaram *Bradyrhizobium japonicum* em rejeitos de mineração de ouro e prata, com valores de 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA. Sabe-se que o AIA, assim como outros fitohormônios, estimula o crescimento vegetal em uma estreita faixa de concentrações, em que níveis baixos são ineficientes, enquanto os níveis elevados podem se tornar tóxicos para a planta (BISWAS *et al.*, 2000). Isso foi demonstrado para estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, com produção de até 171,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, prejudicando o desenvolvimento de mudas de alface (SCHLINDWEIN *et al.*, 2008). Por outro lado, Patten e Glick (2002) constataram que

rizobactérias mutantes não produtoras de AIA promoveram reduções de 35 a 50% no crescimento de canola, em comparação àquelas inoculadas com as rizobactérias não mutantes. Outros trabalhos também revelam que estirpes de rizobactérias mutantes com sobreexpressão de AIA, também reduzem o crescimento de raízes (XIE *et al.*, 1996). O presente trabalho, em que a maioria dos isolados de rizóbio testados apresentou concentração intermediária de AIA, indica que essas bactérias podem atuar como fitoestimuladores. Nesse sentido, avaliações *in vivo* deverão ser realizadas para corroborar essa hipótese, uma vez que a resposta à produção de AIA varia entre as espécies vegetais (GLICK, 2012).

Sabe-se que o AIA também estimula a transcrição da enzima ACC sintase e conseqüentemente a produção de ACC, precursor imediato do etileno em plantas (MA *et al.*, 2002), o qual em altas concentrações causa inibição do crescimento vegetal (MAYAK *et al.*, 2004; CHENG *et al.*, 2007; ZAHIR *et al.*, 2009). Nesse sentido, a enzima ACC deaminase (ACCD) é fundamental pela sua atuação na conversão do ACC em α -cetobutirato e amônia (HONMA e SHIMOMURA, 1978). No presente trabalho determinou-se a concentração de α -cetobutirato e verificou-se que apenas UFSC-M8 e UFSC-M4 foram capazes de produzir essa substância, indicando que esses isolados são produtores de ACCD. Esses isolados apresentaram concentrações de α -cetobutirato variando de 12,8 a 17,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo esses valores superiores ao valor máximo de 3,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para *Mesorhizobium ciceri* (NASCIMENTO *et al.*, 2011). O efeito imediato da inoculação de sementes com bactérias produtoras de ACCD é o favorecimento na elongação das raízes, com posterior contribuição para o desenvolvimento vegetal (CONTESTO *et al.*, 2008; NAVEED *et al.*, 2008; ONOFRE-LEMUS *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2012). No presente trabalho verificou-se que 11% dos isolados de rizóbio apresentam atividade ACCD, sendo essa frequência relativamente baixa quando se compara com a elevada frequência dessa enzima para diversos gêneros bacterianos (BELIMOV *et al.*, 2001; PENROSE *et al.*, 2003; INDIRAGANDHI *et al.*, 2007). No entanto, Duan *et al.* (2009), avaliando 233 estirpes de rizóbios, verificaram que apenas 27 delas apresentaram essa característica, o que também corresponde a uma frequência de 11%. Além disso, verificaram-se variações nos níveis de α -cetobutirato produzidos como descrito por Siddikee *et al.* (2010). Entretanto, Islam *et al.* (2009) descreveram que apesar de todos os isolados avaliados produzirem ACCD, poucos aumentaram significativamente o comprimento das raízes, indicando que sua

atividade isoladamente não é responsável por esse efeito. Siddikee *et al.* (2010) constataram que bactérias com capacidade de produzir simultaneamente ACCD e AIA são mais eficientes no favorecimento do crescimento vegetal do que aquelas que produziram somente ACCD. Dessa forma, recomendam-se estudos mais aprofundados envolvendo a interação desses dois mecanismos mediados pelos rizóbios aqui testados.

6.3 Identificação dos isolados por sequenciamento de gene rDNA 16S

Atualmente são descritos 15 gêneros de bactérias, dentro do grupo das Proteobactérias, com capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas (LONGATTI *et al.*, 2013a). Na literatura é mais relatada a participação de bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, as quais pertencem ao grupo das α -Proteobacterias (FERREIRA *et al.*, 2012 a, QUADROS, 2013; DAHMER, 2014) e dos gêneros *Cupriavidus* e *Burkholderia* pertencentes ao grupo das β -Proteobacterias (MOULIN *et al.*, 2001; GYANESHWAR *et al.*, 2011). Estudos já descreveram a capacidade desses β -rizóbios de nodular espécies de leguminosas arbóreas do gênero *Mimosa* (CHEN *et al.*, 2001; 2003; 2005b). Mais recentemente, Taulé *et al.* (2012), isolaram a partir da leguminosa arbórea *Parapiptadenia rigida*, espécie de *Cupriavidus* com capacidade de nodulação em *Mimosa*. As β -Proteobacterias são comumente encontradas em ambientes degradados e apresentam capacidade de beneficiar o crescimento das leguminosas (ZHAN e SUN, 2011; FERREIRA *et al.*, 2012b). Sabe-se que as leguminosas *Mimosa scabrella* (Bracatinga) e *Mimosa bimucronata* (Maricá) apresentam capacidade de se associar com diferentes gêneros de rizóbio (PATREZE e CORDEIRO, 2004; SIQUEIRA, 2005; CHEN *et al.*, 2007). Verificou-se no presente trabalho, por meio do sequenciamento parcial do gene rDNA 16S, que os rizóbios autóctones foram classificados nos gêneros *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Gluconobacter*. São escassos os trabalhos que utilizam as sequências do gene rDNA 16S de rizóbios para avaliar a diversidade de isolados em áreas impactadas pela mineração. Apesar dos avanços nas metodologias para a avaliação da biodiversidade, ainda pouco se conhece sobre as bactérias simbióticas fixadoras de N₂ nos ecossistemas brasileiros (STOCCO *et al.*, 2008). Quadros (2013) avaliou a diversidade, abundância relativa e composição microbiana de solo reconstruído após a mineração de carvão, utilizando sequenciamento Illumina (Illumina,

Inc., CA, EUA) do gene rDNA 16S. Dentre as bactérias predominantes encontradas, podem-se citar aquelas pertencentes aos gêneros *Devosia*, *Burkholderia*, *Methylobacterium* e *Ralstonia* (syn *Cupriavidus*), sendo que algumas espécies desses gêneros são relatadas na literatura como rizóbios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). No entanto, não foi detectada a presença do gênero *Rhizobium* naquele trabalho, fato que contrasta com os resultados obtidos no presente estudo.

A classificação até o nível de gênero pode dar indícios do comportamento diferenciado dos isolados de rizóbio quanto à eficiência simbiótica para as leguminosas herbáceas testadas. Para Calopogônio, somente a estirpe recomendada BR 1602, pertencente ao gênero *Bradyrhizobium* foi eficiente. Isso pode explicar a baixa eficiência dos 16 isolados de rizóbio avaliados, uma vez que nenhum deles foi classificado nesse gênero.

Verificou-se que os isolados que apresentaram alta eficiência simbiótica para a Ervilhaca pertenciam aos gêneros *Burkholderia* (UFSC-M8) e *Gluconobacter* (UFSC-M9). Considerando que a estirpe SEMIA 384 recomendada para a Ervilhaca é *Rhizobium leguminosarum*, poderia se esperar que rizóbios eficientes, testados no presente estudo, também fossem desse gênero. Entretanto, isso não ocorreu, uma vez que os isolados considerados compatíveis e/ou eficientes para a Ervilhaca não foram classificados nesse gênero. Esse resultado constitui um fato inédito, pois anteriormente não havia sido descrito espécies de *Burkholderia* com capacidade de nodular eficientemente Ervilhaca. Portanto, há a necessidade de mais investigações para avaliar a capacidade de *Burkholderia* sp. nodular leguminosas herbáceas.

Outro gênero em que alguns rizóbios testados se enquadraram foi *Gluconobacter*, o qual compreende bactérias diazotróficas endofíticas bastante conhecidas por promover o crescimento vegetal (COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995; PATTEM e GLICK, 1996). No entanto, não há relatos na literatura da capacidade de indivíduos desse gênero de promover nodulação em leguminosa, sendo o presente trabalho o primeiro relato dessa natureza. Uma explicação para esse fato seria a possibilidade de ocorrer transferência horizontal de genes simbióticos, sendo esse evento já descrito em rizóbios. Esse evento confere vantagem ecológica para as bactérias que os adquiriram e, dessa forma, conseguem estabelecer simbioses eficientes com leguminosas exóticas e/ou introduzidas (BARCELLOS *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado a transferência horizontal de genes NodA entre *Methylobacterium nodulans* e *Bradyrhizobium*, conferindo à *M. nodulans* capacidade de nodulação em *Crotalaria* sp. A transferência

horizontal de genes pode envolver também bactérias não simbióticas como *Paenibacillus* e *Stenotrophomonas*, capazes de promover nodulação em leguminosas (AMPOMAH e HUSS-DANEL, 2011). Em outro estudo, Marquina *et al.* (2011) atribuíram à transferência horizontal de genes ao fato de encontrarem um isolado de *Pseudomonas fluorescens* com capacidade de nodular *Trifolium* sp. Nesse sentido, sugere-se estudos futuros para se determinar a relação filogenética a partir dos genes Nod presentes no isolado UFSC-M9. Isso contribuiria para determinar a origem da transferência e o melhor entendimento do complexo mecanismo de nodulação e FBN para esse isolado.

Com o intuito de se determinar a capacidade múltipla de promoção do crescimento dos isolados de rizóbio, foi construído um diagrama de Venn (Apêndice A), em que constatou-se que apenas o isolado UFSC-M8 compartilhou os quatro mecanismos avaliados. Esse isolado foi classificado como *Burkholderia* sp. Diversos estudos constataram a presença desses mecanismos em espécies desse gênero: solubilização de P (COLLAVINO *et al.*, 2010; MARRA *et al.*, 2011), produção de AIA (LONGATTI *et al.*, 2013a), produção de ACC deaminase (ISLAM *et al.*, 2009) e produção de sideróforos (LUDOVIC *et al.*, 2007; MATHEW *et al.*, 2014). Outros isolados de rizóbio, como UFSC-M1 e UFSC-M4, classificados como *Rhizobium* sp. e *Burkholderia* sp., respectivamente, apresentarem no mínimo três mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Dessa forma, sugere-se que esses isolados possam ser testados na co-inoculação de outras espécies vegetais de interesse na recuperação ambiental.

Considerando os resultados relacionados com a eficiência simbiótica, recomenda-se o isolado UFSC-M8 para a inoculação da Ervilhaca em futuros trabalhos visando a revegetação de áreas impactadas pela mineração de carvão. Para o Calopogônio, sugere-se novos estudos envolvendo o isolamento de outros rizóbios autóctones e que sejam compatíveis com essa espécie.

7. CONCLUSÕES

- I. Entre os 16 isolados de rizóbio provenientes de áreas de mineração de carvão, 14 não apresentaram compatibilidade simbiótica com as leguminosas herbáceas testadas, sendo apenas UFSC-M8 e UFSC-M9 capazes de nodular a Ervilhaca, enquanto UFSC-M4 e UFSC-M8 foram capazes de nodular o Calopogônio.
- II. De maneira geral, os isolados de rizóbio autóctones apresentaram capacidade promotora do crescimento vegetal, destacando-se o isolado UFSC-M8 o qual apresentou todos os mecanismos de promoção avaliados, além de elevada eficiência simbiótica para a Ervilhaca.
- III. O sequenciamento do gene rDNA 16S indica que a maioria dos isolados de rizóbio autóctones de áreas de mineração pertencem ao gênero *Rhizobium*, entretanto os isolados que mais se destacaram quanto à capacidade promotora do crescimento vegetal foram classificados como *Burkholderia* (UFSC-M8) e *Gluconobacter* (UFSC-M9), sendo esse último o primeiro relato de nodulação em leguminosas.

REFERÊNCIAS

- ABELES, F.; MORGAN, P.; SALTVEIT Jr.M. Ethylene in Plant Biology, 2nd ed. Academic Press, New York, 1992.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Research in Microbiology**, v.163, p.173–181, 2008.
- ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology Fertility Soils** v.12, p.39–45, 1991.
- ALIKHANI, H.A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization of rhizobia native to Iranian soils. **Plant Soil**, v.287, p. 35-41, 2006.
- AMPOMAH, O.Y.; HUSS-DANELL, K. Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p.267–275, 2011.
- APPLEBY, C.A. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration **Annual Review of Plant Physiology** v.35, p.443–478, 1984.
- BABALOLA, O.; BENEFICIAL O. Bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1559–1570, 2010.
- BADENOCH-JONES, J.; SUMMONS, R. E.; ROLFE, B. G.; LETHAM, D. S. Phytohormones, *Rhizobium mutants*, and nodulation in legumes. IV. Auxin metabolites in pea root nodules, **Journal of Plant Growth Regulation**, v.3, n. 1-3, p. 23–39, 1984.
- BARAZANI, O.Z.; FRIENDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, v.25, p. 2397–2406, 1999.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Revista Cerne**, v.4, n.1, p.145- 153,1998.
- BARCELLOS, F.G.; MENNA, P.; DA SILVA BATISTA, J.S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Appl Environ Microbiol* 73, 2635–264, 2007.
- BARTH, R.C. Avaliação da recuperação de áreas mineradas no Brasil. Viçosa: UFV, 1989.

- BELIMOV, A. A.; HONTZEAS, N.; SAFRONOVA, V. I. Cadmium tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 241–250, 2005.
- BELIMOV, A.A.; KOJEMIAKOV, A.P.; CHUVARLIYEVA, C.V.; Interactions between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant Soil**, v.173, p.29–37, 1995.
- BELIMOV, A.A.; SAFRONOVA V.I.; SERGEYEVA T.A., EGOROVA T. N.; MATVEYEVA, V.A.; TSYGANOV V.E. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. **Canadian Journal of Microbiology**. v.47, p.642-652, 2001.
- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399- 406, 1976.
- BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.28, p.1327–1350, 2012.
- BIANCOTTI, V.; BANDI, C.; MINERDI, D.; SIRONI, M.; TICHY, H.V.; BONFANTE, P. An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3005-3010, 1996.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 92, p.880-886, 2000.
- BLACK, J. Microbiology- Principles & applications. 3rd edition. Ed. Prentice Hall. Upper saddle river, New Jersey, 1996.
- BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; MIRZA, M. S.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiology Ecology**, v.56, p. 455–470, 2006.
- BOUCHER, Y.; DOUADY, C.; PAPKE, R.; WALSH, D.; BOUDREAU, M.; NESBO, C.; CASE, R.; DOOLITTLE, W. Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups. **The Annual Review of Genetics**, v.37, p. 283–328, 2003.

BRADSHAW, A.D. Restoration: An acid test for ecology. In: Jordan III WR, ME Gilpin & JD Aber, eds. Restoration Ecology: A synthetic approach to ecological research. Cambridge: Cambridge Press University, p.23-30, 1987.

BRASIL. Critérios para recuperação ou reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão (Revisão 06). Ação Civil Pública nº 93.8000533-4 (Processo de Cumprimento de Sentença nº 2000.72.04.002543-9). Ministério Público Federal, Procuradoria da República em Santa Catarina, 2013. 19p.

BRASIL. Decreto nº 85206, de 25 de setembro de 1980. Diário Oficial da União, 26 de setembro de 1980, p.19236. Disponível em <<http://www.lexml.gov.br>>. Acesso em 12 jul. 2010.

BRASIL. Ministério. CONAMA. Resolução do CONAMA nº. 004, de 4 de maio de 1994. Define vegetação primária e secundária nos estágios inicial, médio e avançado de regeneração da Mata Atlântica, a fim de orientar os procedimentos de licenciamento de atividades florestais em Santa Catarina. Coleção de leis [do] Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1>>. Acesso em: 8 de julho 2013.

BRAUD, A.; JÉZÉQUEL, K.; VIEILLE, E.; TRITTER, A.; LEBEAU, T. Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores, **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 6, n. 3-4, p. 261–279, 2006.

BROWN, G.D.; ROVIRA A.D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v.66, p.1-102, 1999.

BURD, G.I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 237–245, 2000.

CABALLERO-MELLADO J. Microbiología Agrícola e Interacciones Microbianas con plantas. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, vol. 48(2), p.154-161, 2006.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; SOARES, A.L.L. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronosséquences de reabilitação após a mineração de bauxite. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.621-632, 2008.

CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. **Journal Basic Microbiology**, v.46, p.186–195, 2006.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. M.; LIN, K. Y.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J. I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, n.5, p.1055-1059, 2007.

CHEN, W.M. b, Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. **Applied Environmental Microbiology**. v.71, p.7461–7471, 2005.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; PRESCOTT, A.R.; KIERANS, M. SPRENT, J.I. Nodulation of *Mimosa* spp. by the beta-proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.16, p.1051–1061, 2003.

CHEN, W.N.; LEAVENS, S.; COENYE, T.; LEE T.M.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patient. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v 51, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W., YAN, G., LI, J. Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p. 392-397, 1988.

CHEN, X; TANG, J.J; ZHI, G.Y; HU, S.J. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plant: Effects of coexisting plant species. **Applied Soil Ecology**, v. 28, p. 259-269, 2005.

CHENG, Z.; PARK E.; GLICK B. R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Canada Journal Microbiology** v.53; p.912-918, 2007.

CIARDI, J.; TIEMAN, D.; LUND, S.; JONES, J.; STALL, R.; KLEE, H. Response to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. **Plant Physiology**, v.123, p.81–92, 2000.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 35, 169-172, 2007.

COLLAVINO, M.M.; SANSBERRO, P.A.; MROGINSKI, L.A. & AGUILAR, O.M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology Fertility of Soils**, v.46, p.727-738, 2010.

CONTESTO C.; DESBROSSES G.; Lefoulon C. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growthpromoting rhizobacteria, **Plant Science**, v. 175, n. 1-2, p.178-189, 2008.

COSTA, N.L.; BENDAHAN A.B.; GIANLUPPI, V.; RIBEIRO, P.S.M.; BRAGA, R.M. *Calopogonium mucunoides*: Características Agronômicas, Produtividade e Manejo. Comunicado técnico EMBRAPA, 2009.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995.

CPRM – Serviço Geológico do Brasil – Ministério de Minas e Energia. Disponível em http://www.cprm.gov.br/publique/media/capXI_b.pdf (Acessado em 08/09/2010).

CUNNINGHAM, J.; KUIACK. C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1451-1458, 1992.

DAHMER, S.F.B. Biodiversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em área de mineração de carvão. Santa Maria, Universidade Federal Santa Maria, 2014. 31p.

DELGADILLO, L.A.E; GONZÁLEZ, R.C.A; PRIETO, G.F.; VILLAGÓMEZ, I.J.R.; ACEVEDO, S.O. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación Tropical and Subtropical. **Agroecosystems**, v.14 p.597- 612, 2011.

DIAS, L.E.; PENEDO, A.P.; MELO, R.F. Revegetação de substratos sulfetados remanescentes de mineração: avanços e limitações. VI Simpósio Nacional e Congresso Latinoamericano sobre Recuperação de Áreas Degradadas - A fauna em foco. 2005 (Palestra).

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B. ; PENTEADO, A. A, F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso de nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.1, p.233-237, 1966.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., A stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rosata*. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**. v.38, n.1, p.89-98, 1988.

DUAN, J.; MÜLLER, K. M.; CHARLES, T. C.; VESELY, S.; GLICK, B. R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern saskatchewan, **Microbial Ecology**, v. 57, n. 3, p. 423-436, 2009.

DUAN, J.; MULLER, K., CHARLES, T., VESELY, S., GLICK, B. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia: Isolation, characterization and regulation. **Proceedings of the 7th International PGPR Workshop Amsterdam**, p.50, 2006.

DUHAMEL, M.S.D.; WEHR, L.Y.; HOMA, R.; SEEPERSAD, D.; DWORATZEK, S.; COX, E.E.; EDWARDS, E.A. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. **Water Research**, v. 36, p. 4193-4202, 2002.

EGAMBERDIYEVA, D.; JURAEVA, D.; POBEREJSKAYA, S.; MYACHINA, O.; TERYUHOVA, P.; SEYDALIEVA, L.; ALIEV, A. Improvement of wheat and cotton growth and nutrient uptake by phosphate solubilizing bacteria. **26th Southern Conservation Tillage Conference, 2003**.

ENNEKING, D. The toxicity of *Vicia* species and their utilization as grain legumes. Dissertation for the degree Doctor of Philosophy in Agricultural Science. University of Adelaide waite agricultural Research Institute south Australia, 1994.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. *Genome Research*, New York, v. 8, p. 186-194, 1998.

FARIA, S.M.; FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C.; SILVA, E.M.R. Recuperação de solos degradados com leguminosas noduladas e micorrizadas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 23p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 77).

- FARIA, S.M.; GUEDES, R.E. Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais (aproximação 1999). Seropédica: Embrapa- Agrobiologia, 1999. 2p. (Embrapa CNPAB. Recomendação Técnica, 5).
- FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; DE CAMPOS, S.B.; LISBOA, B.B.; WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v.55, p.44–52, 2012.
- FERRARI, A.E; WALL, L.G. Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. **Revista Facultad Agronomía La Plata**. v.105, n.2, p 63-87, 2004.
- FERREIRA, P.A.A. a ;BOMFETI, C.A; SOARES, B.; MOREIRA, F.M.S. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal MICROBIOLOGY BIOTECHNOLOGY**, V. 28, P.1947–1959, 2012.
- FERREIRA, P.A.A. b; BOMFETI, C.A.; SILVA, J. R, SOARES, B.L., SOARES, C.R.F.S; MOREIRA, F.M.S. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p. 85-95, 2012.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F.F.; MARIANO, R.L.R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In: **Plant Growth and Health Promoting Bacteria** (Maheshwari, D.K.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p.21–42, 2011.
- FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. de. The Contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n.5-6, p. 897-903, 1997.
- FRANCO, A.A.; DIAS, L.E.; FARIA, S.M.; CAMPELLO, E.F.C.; SILVA, E.M.R. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. In: Estrutura, Funcionamento e Manejo de Ecossistemas Brasileiros (ESSEVES, F.A), Rio de Janeiro, Instituto de Biologia-UFRJ, p.459-467, 1995.
- FRANCOISE, M.; SCHMIDT, E. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. **Applied and Environmental Microbiology**, v.35, p. 661-667, 1982.
- FRANKENBERGER, W.; ARSHAD, M. *Phytohormones in Soil*. Marcel Dekker, New York, 1995.

FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake in canola (*Brassica napus* L.). **Biology Fertility Soils**, v.24, p.358–364, 1997.

FUKUHARA, H.; MINAKAWA Y.; AKAO, S.; MINAMISAWA, K. “The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation,” **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 8, p. 1261–1265, 1994.

FUNGARO, D.A.; IZIDORO, J.C. Remediação de drenagem ácida de mina usando 458 zeólitas sintetizadas a partir de cinzas leves de carvão. **Quimica Nova**. 29:735-740, 2006.

GARSABALL, J.A.L.; CUEVAS, M.C.S. Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. "Querepa Rosada" con hipoclorito de sodio. **Revista UDO Agrícola**, v.6, n.2, p. 60-66, 2006.

GARSABALL, J.A.L.; CUEVAS, M.C.S. Desinfección de ápices de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) cv. "Querepa Rosada" con hipoclorito de sodio. **Revista UDO Agrícola**, v.6, n.2, p. 60-66, 2006.

GASSEN, D.N.; GASSEN, F.R. Plantio direto. Passo Fundo, Aldeia Sul, 1996. 207p.

GLICK, B., CHENG, Z., CZARNY, J.; DUAN, J. Promotion of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v.119, p. 329-339, 2007.

GLICK, B.; LIU, C.; GHOSH, S.; DUMBROFF, E. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. **Soil Biology & Biochemistry**. v.29, p.1233-1239, 1997.

GLICK, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, p.1-15, 2012.

GLICKMANN, E.; DEESSAUX, Y.A critical examination of the specificity of the Salkosky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 45, p.631-640, 1995.

GOMES, A.J.P.; CRUZ, P.R.; BORGES, L.P. Recursos minerais energéticos: carvão e urânio. p. 577-601. In: BIZZI, L. A.; SCHOBENHAUS, C.; VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, J. H. (orgs.). Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil: textos, mapas e SIG. Brasília: CRPM – Serviço Geológico do Brasil, 2003. 692 p. Disponível em: <<http://www.crpm.gov.br>>. Acesso em 05 jul. 2010.

- GONÇALVES, F.C. Efeito de plantas de cobertura sobre os atributos físicos de um solo construído na área de mineração de carvão de Candiota-RS após três anos. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 2008. 91p. (Dissertação de Mestrado).
- GOODLASS, G.; SMITH, K. Effect of ethylene on root extension and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.). **Plant and Soil**. v.51, p. 387-395, 1979.
- GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p.395–412, 2005.
- GUERINOT, M. L.; YING, Y. Iron: nutritious, noxious, and not readily available, **Plant Physiology**, v. 104, n. 3, p. 815–820, 1994.
- GUTIERREZ-MANERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiology Plant**, 111, p.206–211, 2001.
- GUTIERREZ-MANERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum** v. 111, p. 206–211, 2001.
- GYANESHWAR P, et al. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 24, p.1276–1288, 2011.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE P.S. Role of microorganisms in improving P nutrient of plants. **Plant Soil**, v.245, p.83-93, 2002.
- HAGEN, R.M.; GAUTHIER, Y.P.; SPRAGUE, L.D.; VIDAL, D.R.; ZYSK, G.; FINKE, E.J.; NEUBAUER, H. Strategies for PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded tissues. **Journal of Clinical Pathology Molecular Pathology**, v. 55, n. 6, p. 398-400, 2002.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95-98, 1999.

HAM, M.S.; PARK, Y.M.; SUNG, H.R.; SUMAYO, M., RYU, C.M., PARK, S.H., GHIM, S.Y. Characterization of rhizobacteria isolated from family Solanaceae plants in Dokdo Island. Kor. **Journal Microbiology Biotechnology**. v.37, p.110–117, 2009.

HARA, F.A.S, OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v.34, p.343-357, 2004.

HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores, **Natural Product Reports**, v. 27, n. 5, p. 637–657, 2010.

HIIFTE, M.; WOESTYNE, M.V.; VERSTRAETE, W. Role of siderophores in plant growth promotion and plant protection by fluorescent Pseudomonads. In: Manthey, J.A., Crowley, D.E., Luster, D.G. (Eds.), *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 81–92, 1994.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Exp. Station, 1950. 32p.

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

HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.42, p. 1825-1831, 1978.

HUNGRIA, M.; Chueire, L.M.; Menna, P.; Bangel, E.V. Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. Comunicado Técnico 79 Embrapa (ISSN 1516-1752), 2008.

HYODO, H. Stress/wound ethylene. In *The plant hormone ethylene* (MATTOO A. K. e SHUTTLE J. C.), Boca Raton: CRC Press. Inoculants. Plant Management Network, pp. 65– 80. 1991.

INDIRAGANDHI, P.; ANANDHAM R.; MADHAIYAN M.; SA T. M. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamond back moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: *Plutellidae*). **Current Microbiology**, v.56, p. 327-333, 2007.

ISLAM, M.D.R; MADHAIYAN M.; HARI P. DEKA BORUAH, W YIM, W.; LEE, G.; SARAVANAN V.S.; FU, Q.; HU, H.; SA T. Characterization

of Plant Growth-Promoting Traits of Free-Living Diazotrophic Bacteria and Their Inoculation Effects on Growth and Nitrogen Uptake of Crop Plants **Journal Microbiology Biotechnology**, v.19, n.10, p. 1213–1222, 2009.

JARVIS, B.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.; NOUR, S.; FERNANDEZ, M.; CLEYET-MAREL, J.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.895-898, 1997.

JICA. Japan International Cooperation Agency. Interim report for the feasibility study on recuperation of mined out areas in south region of Santa Catarina in the Federative Republic Brazil. Criciúma: Fundação do Meio Ambiente (FATMA), 1997. 248p.

JIN, C.W.; YOU, G.Y.; ZHENG, S.J. The iron deficiency-induced phenolics secretion plays multiple important roles in plant iron acquisition underground. **Plant Signaling and Behavior**, v.3, p.60–61, 2008.

JOHN, R.C; ITAH, A.Y.; ESSIEN, J.P; IKPE, D.I. Fate of Nitrogen-Fixing Bacteria in Crude Oil Contaminated Wetland Ultisol. **Bull Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.87, p.343-353, 2011.

JORDAN, D. Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 234-256, 1984.

JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous **Plants. International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.

JOSHI, P.; BHATT, A.B. Diversity and function of plant growth promoting rhi-zobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalayan Region. **International Journal of Environmental Science**, v.1, p.1135–1143, 2011.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of anaerobic facultatively methylotrophic, legume root-nodulatinforming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2269-2273, 2004.

KHAN, M.S.; ZAIDI A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.27, p.29–43, 2007.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A.; OVES, M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. **Environmental Chemistry Letters**, v.7, p.1–19, 2009.

KIM, J.T.; KIM, S.D. Suppression of bacterial wilt with *Bacillus subtilis* SKU48-2strain. Kor. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.36, p.115–120, 2008.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.44, p. 301-307, 1954.

KISS, T.; FARKAS, E. Metal-binding ability of desferrioxamine **Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition**, v.32, p.385–403, 1998.

KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: *Azospirillum/Plant Associations* (Okon, Y.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p.111–118, 1994.

KLOEPPER, J.W. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biological controlagents. In: *Soil Microbial Ecology* (Metting Jr., F.B.), Marcel Dekker Inc., NewYork, p. 255–273, 1993.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, v.71, p. 1020–1024, 1981.

KUCEY, R.; HYNES, M. Populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *viciae* in fields of bean and pea in rotation with nonlegumes. **Canadian Journal of Microbiology**. v.35, p. 661-667, 1989.

LAMB, D.; ERSKINE, P.D.; PARROTTA, J.A. Restoration of degraded tropical forest landscapes. **Science**, v.310, p.1628-1632, 2005.

LARA, C.; OVIEDO, L.; ALEMÁN. Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. **Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v.9, n.1, p.17-23, 2011.

LASTE, K.C.D.; GONÇALVES, F.S.; FARIA, S.M. Estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, 2008. 8p. (Embrapa CNPAB. Comunicado Técnico, 115).

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. **Horticultural Science**, v.32, p.188–192, 1997.

- LIMA, A.S.; NÓBREGA, R.S.A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D.F.; MOREIRA, F.M.S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium zatropurpureum*). **Plant and Soil**, v.319, p.127-145, 2009.
- LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R.; MOREIRA, F.M.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.
- LOPER, J. E.; BUYER, J. S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, p. 5-13, 1991.
- LUCA, DE N.G.; WEXLER, M.; PEREIRA, M.J.; YEOMAN, K.H.; JEOMAN, K.H.; JOHNSTON, A.W.B. Is the fur gene of *Rizobium leguminosarum* essential? **FEMS Microbiology Letters**, v.168, p.289-295, 1988.
- LUDOVIC, V.; GROLEAU, M.C.; DEKIMPE, V.; DÉZIEL E. *Burkholderia* Diversity and Versatility: An Inventory of the Extracellular Products. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.17, n.9, p.1407-1429, 2007.
- LUGTENBERG, B., KAMILOVA F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review Microbiololy**, v.63, p.541-556, 2009.
- MA, J. F. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 4, p. 267-281, 2005.
- MA, W.; PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 947-954, 2002.
- MANTELIN, S.; FISCHER-LE S.M.; ZAKHIA, F.; BÉNA G.; BONNEAU, S.; JEDER H., DE LAJUDIE, P.; CLEYET-MAREL, J.C. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.56, p. 827-839, 2006.
- MARCHESI JR, SATO T, WEIGHTMAN AJ, MARTIN TA, FRY JC, HIOM SJ, DYMOCK D, WADE WG. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S

rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MARQUINA, M.E.; GONZÁLEZ, N.E.; CASTRO, Y. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. **Revista biología tropical**, v.59, n.3, p. 1017-1036, 2011.

MARRA, L.M.; OLIVEIRA, S.M.; SOARES, C.R.F.; MOREIRA, F.M.S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola** v.68, p.603-609, 2011.

MATHESIUS, U.; SCHLAMMAN, H. R. M.; SPAINK, H. P.; SAUTTER, C.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC M. A. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides, **Plant Journal**, v. 14, n. 1, p. 23-34, 1998.

MATHEW, A.; EBERL, L.; CARLIER, A.L. A novel siderophore-independent strategy of iron uptake in the genus *Burkholderia* **Molecular Microbiology** v.91, n.4, p. 805-820, 2014.

MATHEW, A.; EBERL, L.; CARLIER, A.L. A novel siderophore-independent strategy of iron uptake in the genus *Burkholderia*. **Molecular Microbiology**, v.91, p.805-820, 2014.

MATTOO, A.; SUTTLE, J. The plant hormone ethylene. CRC Press, Boca Raton, 1991.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings, **Journal of Plant Growth Regulation**, v.18, n. 2, p. 49-53, 1999.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growthpromoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiol. Biochem.** v.42, p.565-572, 2004.

MCKENZIE, R.H.; ROBERTS, T.L. Soil and fertilizers phosphorus update. In: Proceedings of Alberta Soil Science Workshop, Edmonton, Alberta, p. 84-104, 1990.

MEHNAZ, S.; MIRZA, M.S.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; BANO, A.; MALIK, K.A. Isolation and 16S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 110-117, 2001.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.;SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam

caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.30, p.235-246, 2006.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.85-93, 2004.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de áreas de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.267-276, 2003.

MOILIN, M.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the b sub-class of Proteobacteria. **Nature**, v. 411, p. 335-351, 2001.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2a edição atualizada e ampliada. Lavras, Editora UFLA, 2006. 729p.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature** v.411, p.948-950, 2001.

MOURA, G.G.D.; ARMAS, R.D.; WENDT, N.C.; MEYER, E.; SOARES, C.R.F.S. Nodulação e Absorção de Nitrogênio por Leguminosas Arbóreas Inoculadas com Rizóbios Isolados de Áreas de Mineração de Carvão. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, SBCS, Florianópolis, 2013 (submetido para o evento).

MUNEES, A.; MULUGETA, K. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University Science**, v.26, p.1-20, 2014.

NASCIMENTO, C. W. A.; BIONDI, C. M. Fitorremediação de solos contaminados por metais pesados. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (ORGS.). Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 463-486.

NASCIMENTO, F.; BRÍGIDO, C.; ALHO, L.; GLICK, B. R.; OLIVEIRA, S. "Enhanced chickpea growth promotion ability of a mesorhizobia expressing an exogenous ACC deaminase gene." **Plant and Soil**, v.353, n. 1-2, p. 221-230, 2012.

NASCIMENTO, F.X.I, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase em estirpes de *Mesorhizobium*: prevalência e efeito na simbiose com *Cicer arietinum*. (Dissertação). Universidade de Évora, 2011.

NAVARRO-NOYA, Y.; HERNÁNDEZ E. M.; MORALES, J.J.; JAN, J. R.; MARTÍNEZ, E.R.; HERNÁNDEZ, C. R. 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.

NAVEED M.; ZAHIR, Z.A.; KHALID, M.; ASGHAR, H.N.; AKHTAR, M.J.; ARSHAD Rhizobacteria containing acc-deaminase for improving growth and yield of wheat under fertilized conditions, **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 3, p. 1231–1241, 2008.

NEILANDS, J. B. Iron absorption and transport in microorganisms. **Annual Review of Nutrition**, v.1, p. 27–46, 1981.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal. Biological Chemistry**, v.270, p.26723–26726, 1995.

NEUBAUER, U.; FURRER, G.; KAYSER, A.; SCHULIN, R.; Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. **International Journal of Phytoremediation**, v.2, p.353–368, 2000.

NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA F.M.S.; SIQUEIRA J.O. ; LIMA A.S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira. Ciência do Solo**, v.28, p.269-279, 2004.

O'DONNELL, P.; CALVERT, C.; ATZORN, R.; WASTERACK, C.; LEYSER, H.; BOWLES, D. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**, v.274, p.1914–1917, 1996.

OCHOA, M.S.; PEDRAZA, R.M.; TRUJILLO, M.M.; ABUD, Y.C. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones biológicas. **Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, v.12, n.1, p. 65–71, 2010.

OLIVEIRA-LONGATTI a, S.M.; MARRA, L.M.; SOARES, B.L.; BOMFETI, C. A.; DA SILVA K.; FERREIRA, P.A.A.; MOREIRA, F.M.S. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v.30, p.1239-1250, 2013.

OLIVEIRA-LONGATTI b, S.M.; MARRA, L.M.; MOREIRA, F.M.S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal Microbioly Research**, v.7, p. 948–959, 2013.

ONOFRE-LEMUS, J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; GIRARD, L.; CABALLERO-MELLADO, J. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants, **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n. 20, p. 6581–6590, 2009.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

PARK, M., CHUNGWOO, K., YANGA, J., HYOUNG-SEOK, L., WANSIK, S., SEUNGHWAN, K. and TONGMIN, S. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, v.160, p.127-133, 2005.

PASCUAL, J.O. Cuatro décadas en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Discurso leído en el acto de su recepción como académico numerario. Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada, 2003.

PATREZE, C.M.; CORDEIRO, L. Nitrogen-fixing and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. **Forest Ecology and Management**, v.196, p.275-285, 2004.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207–220, 1996.

PENNINCKX, I.; THOMMA, B.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.; BROEKAERT, W. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.10, p.2103–2113, 1998.

PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 368–372, 2001.

- PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiology Plant**. v.118, p. 10-15, 2003.
- PERRET, X., STAEHELIN, C., BROUGHTON, W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.
- PETERS, N.; CRIST-ESTES, D. Nodule formation is stimulated by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine. **Plant Physiology**, v.91, p. 690-693, 1989.
- PHI, Q.T.; PARK, Y.M.; SEUL, K.J.; RYU, C.M.; PARK, S.H.; KIM, J.G.; GHIM, S.Y.; Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.20, p.1605–1613, 2010.
- PIEX, A. A.; RIVAS, A.B.; MATEOS P.F.; RODRIQUEZ, C.; MARTINEZ, M.E.B.; VELÁSQUEZ E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.103-110, 2001.
- PRADHAN, N.; SUKLA, L.B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, 5:850-854, 2005.
- PYWELL, R.; BULLOCK, J.; ROY, D.; WARM, L.; WALKER, K.; ROTHERY, P. Plants traits as predictors of performance in ecological restoration. **Journal of Applied Ecology**, v.40, p.65-77, 2003.
- QUADROS, P. Diversidade e composição de comunidades microbianas de solos construídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. 38p. (Dissertação de Mestrado).
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Áustria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2013.
- RAIJ, B. V. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: *Fósforo na Agricultura Brasileira* (YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S.). Piracicaba, Potafos, p.107-115, 2004.
- RAJKUMAR, M.; AE, N.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v.28, p.142–149, 2010.

REDMOND, J., BATLEY, M., DJORDJEVIC, M., INNES, R., KUEMPEL, P., ROLFE, B. Flavones Induce Expression of Nodulation Genes in *Rhizobium*. **Nature**, v.323, p.632–635, 1986.

REGENSBURGER, B. Recuperação de áreas degradadas pela mineração de argila através da regularização topográfica, da adição de insumos e serrapilheira, e de atratores da fauna. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 97p. (Dissertação de Mestrado).

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAÍNO, N.; SUBBARAO, N.; METEOS, P.F.; GILLIS, M.; DAZZO F.D.; MARTINEZ-MOLINA E.; A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p.5217-5222. 2002.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBARAO, N.; METEOS, P. F.; DAZZO, KROPPESTEDT, R. M.; MARTINEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VIZCAINO, N. Description of *Devosia neptiniae* sp.nov. that nodulates and fix nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, and aquatic legume from India. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 47-53. 2003.

ROBISON, M.; GRIFFITH, M.; PAULS, K.; GLICK, B. Dual role of ethylene in susceptibility of tomato to *Verticillium* wilt. **Journal of Phytopathology**. v.149, p385– 388, 2001.

ROCHA-NICOLEITE, E.R.; CAMPOS, M.L.; CITADINI-ZANETTE, V.; SANTOS, R.; MARTINS R.; SOARES, C.R.F.S. Mata Ciliar: implicações técnicas sobre a restauração após a mineração de carvão. Criciúma: SATC, 2013. 80p

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

RODRIGUEZ, T.H.; GONZALEZ, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp, **Naturwissenschaften**, v.91, n. 11, p. 552–555, 2004.

ROJAS, A.; HOLGUIN, G.; GLICK, B.R.; BASHAN, Y. “Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere,” **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 2, p. 181–187, 2001.

ROMAN, G.; LUBARSKY, B.; KIEBER, J.; ROTHENBERG, M. ECKER, J. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*:

five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. **Genetics**, v.139, p. 1393-1409, 1995.

RUBIO, J. Aspectos ambientais no setor minero-metalúrgico. Em: Capítulo 13 do livro "Tratamento de Minérios"; A.B. da Luz, M.V. Possa e S. L. de Almeida (Eds), CETEMCNPq- MCT, p.537-570, 1998a.

RUBIO, J. Environmental applications of the flotation process. Em: Effluent Treatment in the Mining Industry. 389p. (S.H.Castro, F. Vergara and M. Sanchez, Eds), University of Concepción-Chile, Chapter 9, p.335-364, 1998b.

SANCHEZ, J.C.D.; FORMOSO, M.L.L. Utilização do carvão e meio ambiente. Boletim Técnico. Porto Alegre, n.20, 1990. 34p.

SANCHEZ, N.B; VIÑALES, A.M; PADRÓN, C.M. Prueba de especies forestales en áreas devastadas por minería a cielo abierto en Holguín. Centro Agrícola. Año 30 n.1 p. 80-83, 2003.

SANGEETA, M.; NAUTIYAL, C.S. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Current Microbiology**, v.43, p.51-56, 2001.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L.I.A.; ESTELLE, M.; Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. **Nature Chemical Biology**, v.5, p.301-307, 2009.

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

SARMIENTO, G. Biocultivos. Curso internacional. Producción de Biofertilizantes desde el laboratorio al campo, Memorias. Universidad Nacional de Colombia, COLCIENCIAS- CABBIO-BIOCULTIVOS, Instituto de Biotecnología (IBUN), Santafé de Bogotá, p.19-25, 2006.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba: ESALQ/USP, 1979.

SATURNO, D.F.; NOVAES, A.G.; LIMA FILHO, A.; DORIGO, O.F.; ANDRADE, D.S. Ocorrência de microrganismos simbióticos fixadores de nitrogênio em solos cultivados e sob floresta. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil. p.1-4, 2009.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K, LISBOA, B.B; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C. Influence of rhizobial inoculation on seedling vigor and germination of lettuce. **Ciência Rural** v.38, p.658-664, 2008.

SCHWYN, R.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for detection and estimation of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47–56, 1987.

SIDDIKKEE, M.A.; CHAUHAN, P.S.; ANANDHAM, R.; GWANG-HYUN, H.; SA, T. Isolation, Characterization, and Use for Plant Growth Promotion Under Salt Stress, of ACC Deaminase-Producing Halotolerant Bacteria Derived from Coastal Soil. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 20, n. 11, p.1577–1584, 2010.

SILVA, L.C.R.; CORRÊA, R.S. Evolução da qualidade do substrato de uma área minerada no cerrado revegetada com *Stylosanthes* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.8, p.835–841, 2010.

SILVEIRA, A.N.; SILVA, R.D.R.; RUBIO, J. Técnicas para tratamento e aproveitamento de águas ácidas residuais da mineração de carvão. III Workshop Gestão e Reuso de Água na Indústria. Florianópolis, 2007. p.1-6.

SIQUEIRA, A. B. P. Efeito de Diferentes Fontes e Níveis de Nitrogênio no Crescimento Inicial de *Mimosa bimucronata* (DC.) kuntze e de *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae). Seropédica, UFRRJ, 38p. Monografia, 2005.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília, Empresa de Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1994. 142p.

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 sub-tropicais. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole Editora Ltda, 2008, v. 1, p. 495-524.

SOARES, P.S.M.; SANTOS, M.D.C.; POSSA, M.V. Carvão Brasileiro: Tecnologia e Meio Ambiente. Rio de Janeiro: CETEM, 2008. 289p.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v.30, p. 205–240, 2004.

SON, J.S.; SUMAYO, M.; KANG, H.U.; KIM, B.S.; KWON, D.K.; GHIM, S.Y. Induced systemic resistance against gray leaf spot in pepper by *Enterobacter* species isolated from family Gramineae plants in Dokdo. Kor. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 40, p.135–143, 2012.

- SON, J.S; SUMAYO, M.; HWANG, Y.J; KIM, B.S GHIM, S.Y. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. **Applied Soil Ecology**, v.73, p. 1–8, 2014.
- SOUSA, C.A. Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas. (Dissertação) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. “Auxin and plant-microbe interactions” **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 4, 2011.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 31, p. 425–448, 2007.
- SPAINK, H. Ethylene as a regulator of *Rhizobium infection*. **Trends in Plant Science**, v.2, p. 203- 204, 1997.
- STAHL, P. D., PERRYMAN, B. L., SHARMASARKAR, S., MUNN, L. C. Topsoil stockpiling versus exposure to traffic: A case study on In situ Uranium wellfields. **Restoration Ecology**, v.10, n.1, p.129-137, 2002.
- STAUFFER, M.D.; SULEWSKI, G. Fósforo-Essencial para vida. In: *Fósforo na agricultura brasileira*. (YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S) Potafos Piracicaba-SP. 2004, 726p.
- STEARNS, J.; GLICK, B. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. **Biotechnology Advances**, v.21, p. 193–210, 2003.
- STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbioses do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.3, p.1107–1120, 2008.
- SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.39–45, 2001.
- SWAIN, M.R.; NASKAR, S.K.; RAY, R.C. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of Yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisets by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. **Polish Journal of Microbiology**, v.56, p.103–110, 2007.

- TAMIMI, S.; TIMKO M. Effects of ethylene and inhibitors of ethylene synthesis and action on nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v. 257, p.125-131, 2003.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D, FILIPSKI A., KUMAR S MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.
- TAO, G. C.; TIAN, S. J.; CAI, M. Y.; XIE, H. Phosphate solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. 1 project supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, the Ministry of Education of the P.R. China, **Pedosphere**, v. 18, n. 4, p. 515–523, 2008.
- TAULÉ, C.; ZABALETA, M.; MAREQUE, C.; PLATERO, R.; SANJURJO, L.; SICARDI, M.; FRIONI, L.; BATTISTONI, F.; FABIANO, E. New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 1692–1700, 2012.
- TEODORO, R.B.; LUIZ DE OLIVEIRA, F.; NATAL DA SILVA, D.M.; FÁVERO, C.; QUARESMA, M.A.L. Leguminosas herbáceas perenes para utilização como cobertura permanentes de solo na Caatinga Mineira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 292-300, 2011.
- TEYSSIER, C.; JUMAS-BILAK, E. *Ochrobactrum* in molecular detection of bacterial pathogens. Edited by Dongyou Liu. Taylor's and Fancis. 2010.
- THEUNIS, M. IAA biosynthesis in rhizobia and its potential role in symbiosis. **Ph.D. thesis**, Universiteit Antwerpen (2005).
- THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673–4680, 1994.
- TIMMUSK, S.; WAGNER, E.G. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 951–959, 1999.
- TSAVKELOVA E. A.; KLIMOVA S. Y.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006.

TSAVKELOVA, E.A.; CHERDYNTSEVA, T.A.; KLIMOVA, S.Y., SHESTAKOV, A.I.; BOTINA, S.G.; NETRUSOV, A.I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. **Archives of Microbiology**, v.188, p.655–664, 2007.

VACHOT-GRIFFIN, A.M.; THIES, J.E. Fingerprinting the Australian rhizobial inoculant mother cultures using refined PCR protocols yields beneficial inoculant management applications. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45,p.141-150, 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA A.; IGUA J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.63, p. 2344-2350, 2003.

VAN BERKUN, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1132-1136, 2002.

VAN LOON, L.; GLICK, B. Increased plant fitness by rhizobacteria. In *Molecular ecotoxicology of plants* (SANDERMANN H.), Berlin: Springer-Verlag, pp. 177–205, 2004.

VERISSIMO, E.W.; VALCARCEL, R. Recuperação de áreas degradadas por mineração de manganês no morro de Urucum-MS. In: Simposio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas, Curitiba, Paraná, Universidade Federal de Paraná I. Anais 520p, p.264-272, 1992.

VERONEZI, J.A. eficiência agrônômica da associação de ervilhaca com isolados de rizóbios (Dissertação). Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, 2011.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v.255, p.571–586, 2003.

VINCENT, J.M.A. Manual for the Pratical Study of root-nodule bactéria. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International biological programme handbook, 15).

VOET, D.; VOET, J. Biochemistry. 2nd edition. John Wiley & sons, Inc., New York, 1995.

WCI. World Coal Institute. The coal resource: a comprehensive overview of coal. London: WCI, 2005. 44p. Disponível em: <<http://www.worldcoal.org>>. Acesso em 02 ago 2010.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p.100-151, 2000.

XI, C., SCHOETERS, E., VAN DER LEYDEN, J., MICHELS, J. Symbiosis-Specific Expression of *Rhizobium etli* *casA* Encoding a Secreted Calmodulin-Related Protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p. 11114 – 11119, 2000.

XIE, H.; PASTERNAK, J. J.; GLICK, B. R. "Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid," **Current Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 67–71, 1996.

YANG, S, HOFFMAN, N. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**. v.35, p.155-189, 1984.

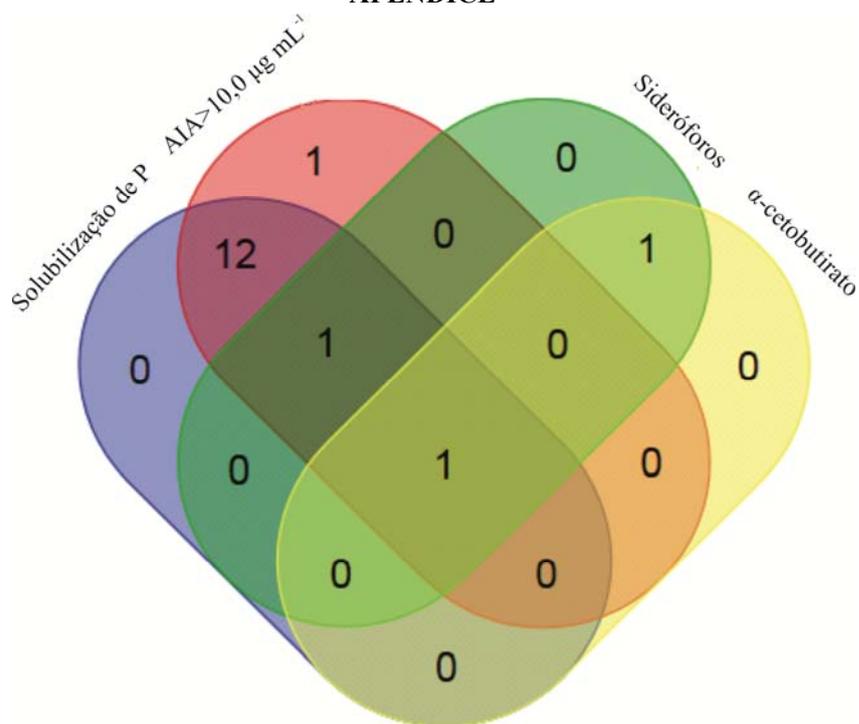
YAO, P., VINCENT, J. Host Specificity in the Root Hair "Curling Factor" of *Rhizobium* sp. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.22, p.413-423, 1969.

ZAHIR, A. Z.; GHANI U.; NAVEED M.; NADEEM S. M.; ASGHAR H. N. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. **Archives of Microbiology**, v.191, p. 415-424, 2009.

ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; AHMAD, M.; OVES, M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica**, v.56, p.263–284, 2009.

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**, v.23, p.476–487, 2011.

APÊNDICE



Apêndice A: Diagrama de Venn que mostra o número de isolados que compartilharam os mecanismos de promoção do crescimento: Solubilização de fósforo, produção de AIA, produção de sideróforos e produção de α -cetobutirato.