

## Caracterização de rizóbios isolados de solo degradado pela mineração de carvão sob leguminosas arbóreas.

Ginaini Grazielli Doin de Moura<sup>(1)\*</sup>, Rafael Dutra de Armas<sup>(2)</sup> Cláudio Roberto Fônsaca Sousa Soares<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Acadêmica do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>(2)</sup> Pós-Doutorando em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. Co-orientador

<sup>(3)</sup> Professor Adjunto, Depto de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade. Caixa Postal 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

\* Autor correspondente – E-mail: [gi\\_grazielle@hotmail.com](mailto:gi_grazielle@hotmail.com)

### Resumo

Objetivou-se com este trabalho caracterizar rizóbios isolados de solo degradado pela mineração de carvão no município de Criciúma, SC, sob leguminosas arbóreas de crescimento rápido. Um experimento de cultura armadilha foi conduzido com feijão caupi (*Vigna unguiculata*) como planta-isca e solo da área presente abaixo de acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild), maricá (*Mimosa bimucronata* (DC) Kuntze) e bracinga (*Mimosa scabrella* Benth). As bactérias isoladas a partir dos nódulos de caupi foram crescidas em meio YMA e avaliadas culturalmente. Os isolados também foram submetidos a reações de BOX-PCR para avaliação dos perfis eletroforéticos e posterior agrupamento. Os isolados foram rearranjados em três grupos de similaridade, apresentando como características principais a acidificação do meio, crescimento rápido e grande produção de exopolissacarídeos. Características culturais agruparam 40% dos isolados com as estirpes-referência pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*, enquanto a BOX-PCR agrupou 25% dos isolados com as estirpes-referência. Os agrupamentos baseados em características culturais e nos padrões eletroforéticos estão de acordo, o que indica a eficácia dos dois métodos para o agrupamento de isolados de rizóbios.

**Palavras-chave:** Interação planta-bactéria, biorremediação, revegetação, nodulação

## Characterization of rhizobia isolated from soil degraded by coal mining under leguminous trees.

### Abstract

This study aimed to characterize rhizobia isolated from soil degraded by coal mining in Criciúma, Southern Brazil, under fast-growing leguminous trees. A trap crop experiment was carried out using cowpea (*Vigna unguiculata*) as trap plant and soil of this area under *Acacia mearnsii* De Wild, *Mimosa bimucronata* DC, Kuntze and *Mimosa scabrella* Benth. Bacteria isolated from cowpea nodules were grown in YMA medium and evaluated culturally. In addition, isolates were subjected to BOX-PCR reactions for evaluation of electrophoretic profiles and subsequent assembly. The isolates were rearranged into three similarity groups, presenting as main characteristics medium acidification, fast growth and high exopolysaccharides production. Cultural characteristics clustered 40% of the isolates with reference strains belonging to the genera *Burkholderia* and *Bradyrhizobium*, while BOX-PCR clustered 25% of the isolates with the reference strains. Grouping based on cultural characteristics and electrophoretic profiles are consistent with each other, which indicate the effectiveness of both methods to group rhizobia isolates.

**Key words:** plant-bacteria interaction, bioremediation, revegetation, nodulation

### Introdução

No Brasil, cerca de dois terços das reservas energéticas não renováveis são compostas por carvão mineral, sendo que o país conta com um total de 32,6 bilhões de toneladas do minério (CPRM, 2010). Os principais estoques de carvão mineral no Brasil encontram-se nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com aproximadamente 28 e 3,4 bilhões de toneladas, respectivamente (SEMC, 2011).

Devido à remoção do solo, ao desmatamento, às modificações topográficas e à deposição de rejeitos, a mineração de carvão causa muitos efeitos negativos sobre as características físicas, químicas e biológicas dos solos, água e ar (SOARES et al., 2008). Um dos principais problemas relacionados à essa atividade, sobretudo no estado de Santa Catarina, é a drenagem ácida de mina (DAM), um processo que pode ser acelerado por espécies bacterianas, principalmente as pertencentes ao gênero *Acidithiobacillus* (anteriormente conhecido como *Thiobacillus*, KELLY e WOOD, 2000), as quais ocasionam a oxidação da pirita e posterior formação de ácido sulfúrico e íons ferroso e

férrico, o que gera redução significativa do pH do solo, além da solubilização de grande parte dos compostos contendo elementos-traço, sobretudo arsênio, cádmio, zinco, cromo, níquel, urânio, vanádio e cobre (BORMA e SOARES, 2002; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2011). A lixiviação desses elementos leva à consequente contaminação de mananciais de água (SOARES et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Como resultado desse processo, tem-se um substrato com alto grau de desestruturação, baixo pH, toxicidade de elementos-traço, como o cádmio e arsênio, e susceptibilidade à erosão (SIQUEIRA et al., 2008). Além disso, nesses locais, tem sido observada dificuldade de estabelecimento da vegetação autóctone (DIAS et al., 1999), o que gera a necessidade da ação antrópica para a recuperação ambiental.

Visando à reabilitação das áreas degradadas pela mineração de carvão, a revegetação das mesmas com espécies de leguminosas de rápido crescimento pode ser uma alternativa considerável, sobretudo porque essas espécies podem promover a ciclagem de nutrientes, ativar processos biológicos do solo, assim como incorporar carbono no solo de forma rápida por meio da biomassa e minimizar processos erosivos (FERREIRA et al., 2007; MACEDO et al., 2008).

O benefício gerado por essas espécies vegetais está relacionado a sua capacidade de associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio ou rizóbios (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; FERREIRA et al., 2012a), o que gera a capacidade de incorporação de nitrogênio via fixação biológica e a redução da relação C/N do material orgânico depositado, favorecendo sua mineralização, a ciclagem de nutrientes e o aumento do estoque de húmus (SIQUEIRA et al., 2007).

Entretanto, a capacidade das leguminosas em estabelecer simbiose com os rizóbios é variável, sendo mesmo possível conferir diferentes graus de eficiência para a interação entre as espécies (CARVALHO et al., 2008; HERNANDÉZ, 2015; MOURA et al., 2016). Isso também ocorre porque todas as três fases da simbiose entre rizóbio e leguminosa (pré-infecção, infecção e funcionamento) possuem mecanismos reguladores que variam em função do genótipo das plantas, dos microrganismos e também em função de fatores ambientais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; MARCHETTI et al., 2010; GUAN et al., 2013). Essa situação também muda após o transplante para o campo em função da adaptação às condições locais e pela competição com a população de rizóbios autóctones (GEETHA e JOSHI, 2013).

Considerando a importância da simbiose para o desenvolvimento das leguminosas arbóreas e a influência do ambiente sobre a eficiência da simbiose, fica evidente a necessidade do isolamento e da caracterização de genótipos bacterianos adaptados aos ambientes degradados e capazes de desenvolver a simbiose com as espécies de leguminosas que apresentam potencial de serem empregadas em programas de revegetação dos ambientes impactados.

A caracterização de organismos procariontes pode ser realizada de diferentes formas, seja por métodos fenotípicos/culturais ou genotípicos. A avaliação das características culturais pode ser considerada o primeiro passo para a identificação dos isolados, fornecendo informações importantes para o agrupamento dos mesmos. Ainda que apresente aplicabilidade limitada na definição da posição taxonômica, a caracterização fenotípica permite inferências complementares aos dados genotípicos, além de ser uma forma de controle de coleções de rizóbios a baixo custo e facilmente realizável (MOREIRA, 1991; JESUS et al., 2005; HUNGRIA et al., 2008).

A caracterização genética de procariotos envolve muitas técnicas, como amplificação de sequências de DNA e RNA a partir de reações de PCR ((FERNANDES et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2012; COSTA, 2016). A diferenciação entre isolados de rizóbios por meio dessa metodologia baseia-se no uso de oligonucleotídeos específicos para a amplificação de sequências repetidas do DNA bacteriano, o que leva à formação dos chamados perfis eletroforéticos, formando à “impressão digital do organismo” ou fingerprinting. Os nucleotídeos mais utilizados para essa finalidade são o BOX, o ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e o REP (Repetitive Extragenic Palindromic Sequences). A sequência repetitiva BOX contém 3 subunidades: boxA (57 pb), boxB (43 pb) e boxC (50 pb), porém, apenas a subunidade boxA é altamente conservada no genoma de muitas bactérias (VERSALOVIC et al., 1994). A técnica de BOX-PCR, que consiste na amplificação das sequências repetitivas BOX, é capaz de indicar alto grau de diversidade genética de rizóbios, diferenciando eficientemente isolados desse grupo de bactérias (FERNANDES et al., 2003; STOCCO et al., 2008).

Objetivou-se com este trabalho caracterizar por métodos moleculares e por cultivo rizóbios isolados a partir de solo de uma área degradada pela mineração de carvão na região carbonífera de Criciúma, SC, sob leguminosas arbóreas de crescimento rápido.

## Material e Métodos

### *Amostragem de solo e isolamento de rizóbios*

Amostras de um solo antropizado, caracterizado pela presença de rejeitos de mineração e inversão de horizontes, foram coletadas em uma área degradada pela atividade de mineração de carvão, nas proximidades da extinta Indústria Carboquímica Catarinense-ICC, Criciúma-SC, Brasil (28°44'18.40''S 49°24'42.62''W). A coleta do solo foi realizada na camada de 0 a 10 cm de profundidade na região próxima às raízes de três leguminosas arbóreas que foram implantadas para revegetação da área: 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, coletou-se uma amostra composta de 12 sub-amostras sob a projeção da copa de cada indivíduo das espécies vegetais selecionadas. As amostras de solo foram acondicionadas em caixa térmica com gelo para transporte até o Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foi realizado o isolamento de rizóbios.

Uma amostra composta de solo, representativa da área de mineração, foi analisada quimicamente, apresentando as seguintes características:  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$  3,8 e teores de elementos-traço, em  $\text{mg kg}^{-1}$  de: 8,60 para As, 17,3 para Cd, 125 para Pb e 422 para Zn.

Para a obtenção dos rizóbios foram utilizados tubetes previamente esterilizados, nos quais foram colocados 50 g de amostra de solo da área de mineração de carvão acrescida a uma mistura de areia e vermiculita (1:1, v/v) até atingir o volume final de 300  $\text{cm}^3$  do tubete. Em cada tubete foram adicionadas três sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) previamente desinfestadas por imersão em hipoclorito de sódio 2% por 2 min e lavadas seis vezes com água destilada estéril. O cultivo foi mantido em casa de vegetação por 60 dias com irrigações diárias com água destilada estéril e com aplicação a cada cinco dias de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída quatro vezes e com teor reduzido de N (5,25  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Após o crescimento das plantas, foram coletados aleatoriamente três nódulos por tubete, os quais foram cuidadosamente destacados das raízes e, em seguida, foi realizada a desinfestação da superfície dos mesmos por imersão em álcool 95% por 20 s, hipoclorito de sódio 2% por 2 min, formol 5% por 2 min e seis lavagens em água destilada estéril. Em seguida os nódulos foram esmagados com pinças em meio de cultura YMA (VINCENT,

1970) em placas de Petri e incubados a 28 °C por 14 dias. Após crescimento bacteriano, os isolados foram repicados para obtenção de culturas bacterianas puras e armazenados em meio YMA com glicerol 20% a -80 °C.

Para a confirmação da capacidade nodulífera, foi realizada a autenticação dos isolados obtidos por meio da inoculação de sementes de feijão caupi em tubetes de 300 cm<sup>3</sup> contendo substrato estéril composto de areia e vermiculita na proporção de 2:1 (v/v). Cada isolado foi crescido em meio YM (VINCENT, 1970) por 24 h sob agitação de 150 rpm a uma temperatura constante de 28 °C. Em seguida, foram adicionados 2 mL de inóculo por tubete e as plantas foram cultivadas em casa de vegetação por um período de 60 dias, quando foi avaliada a presença ou ausência de nódulos.

Tratamentos sem inoculação de rizóbios foram utilizados como controle negativo, com a finalidade de comprovar o sucesso do processo de esterilização do substrato, da água de irrigação e da solução nutritiva. Como controle positivo foi inoculada a estirpe INPA 03-11B (*Bradyrhizobium* sp.), recomendada para o feijão caupi.

#### *Caracterização dos isolados*

Os isolados de rizóbios autenticados quanto à capacidade nodulífera em feijão caupi foram avaliados quanto às características culturais a partir do plaqueamento em meio YMA (VINCENT, 1970), modificado pela adição de azul de bromotimol 0,5% (5mL L<sup>-1</sup> de solução), e incubados por 2 a 3 dias a 28 °C. A partir do crescimento bacteriano foram avaliados os seguintes parâmetros: forma da colônia (circular, irregular, puntiforme), elevação da colônia (plana, lente, convexa, drop-like, umbonada, umbilicada), borda da colônia (inteira, ondulada, lobada, denteada e filamentosa), superfície da colônia (lisa, rugosa, papilada), tempo de crescimento, capacidade de alterar o pH do meio de cultura YMA (acidificação, alcalinização ou sem alteração), produção de muco-exopolissacarídeos (escassa, pouca, moderada e abundante), consistência da massa (seca, aquosa, gomosa, viscosa e butírica), detalhes óticos da colônia (brilhante, opaca, translúcida), coloração (amarela, creme, rósea, branca) e absorção de indicador (sim ou não) conforme descritos por Moreira (1991) e Jesus et al. (2005). As estirpes BR3437 (*Burkholderia* sp), BR3454 (*Burkholderia* sp), BR3461 (*Burkholderia* sp), BR3470 (*Burkholderia* sp) e BR9002 (*Bradyrhizobium* sp.) cedidas pela Embrapa Agrobiologia – Seropédica, RJ foram incluídas como referência para comparação das características culturais.

Para diferenciar os isolados e agrupá-los por similaridade, foi extraído o DNA por lise térmica (HAGEN et al., 2002). Com essa finalidade, uma colônia de cada isolado foi repicada em tubos de 0,2 mL contendo 100 µL de água ultrapura e mantida à 100 °C durante 5 minutos. Em seguida, procedeu-se uma centrifugação a 13.000 g durante 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo de 0,2 mL e armazenado a -20°C.

A diferenciação dos isolados se deu pela técnica de BOX-PCR com o uso do iniciador BOX A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3'). A reação de amplificação foi realizada utilizando 1µL do DNA extraído, 50 pmol do iniciador BOX A1R, 2,5 µL de dNTPs 2 mM, 0,5 µL (1 U) de Taq DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil) e 5 µL de 5X Gitschier Buffer (83 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 335 mM de Tris-HCl pH 8,8; 33,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 33,5 µM de EDTA; 150 mM de β-mercapto-etanol), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol.L<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub>O ultrapura para um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram de 5 minutos a 95 °C; 30 ciclos de: 1 minuto a 92 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C; e extensão final de 72 °C por 10 minutos. (VERSALOVIC et al., 1994).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão 1X TAE (50 mM de Tris-HCl pH 8,8; 50 mM de ácido acético glacial; 25 mM de EDTA), a 80 V por 1 hora. A amplificação foi verificada por meio do espectro UV em transiluminador e fotografada por um fotodocumentador. Os perfis de amplicons foram analisados com o programa “Diversity Database” (BioRad, Hercules, CA, USA).

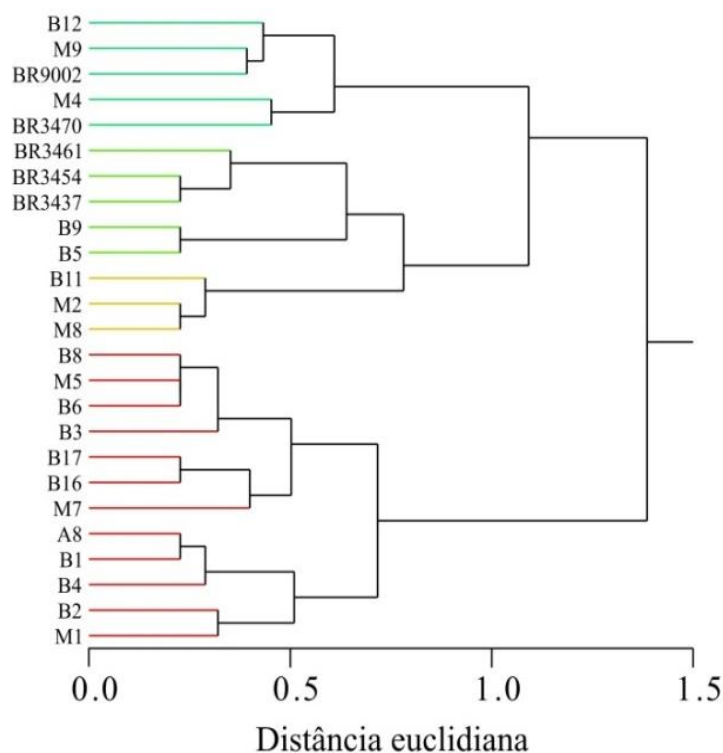
Características culturais e moleculares foram analisadas por agrupamento hierárquico utilizando-se o programa Systat 11.0, com base em dados binários (presença ou ausência de bandas e presença ou ausência de características), pelo método de concordância simples (“simple matching”), com algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

## **Resultados e Discussão**

Ao final do processo de captura, isolamento e autenticação, foram obtidos 20 isolados, A8 (obtido a partir de solo sob acácia negra); B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8, B9, B11, B12, B16 e B17 (obtidos a partir de solo sob bracatinga) e M1, M2, M4, M5, M7, M8 e M9 (obtidos a partir de solo sob maricá).

A partir da caracterização cultural das colônias formadas por cada isolado após cultivo em meio YMA + azul de bromotimol e agrupamento hierárquico, observou-se a

formação de três grupos distintos (Figura 1). O grupo 1 engloba os isolados B12, M9 e M4 (15% dos isolados), além das estirpes-referência BR-9002 e BR-3470. O grupo 2 é composto pelos isolados B9, B5, B11, M2 e M8 (25% dos isolados), os quais apresentam similaridade com as estirpes da Embrapa Agrobiologia BR-3461, BR-3454 e BR-3437. Um terceiro grupo formado pelos isolados B8, M5, B6, B3, B17, B16, M7, A8, B1, B4, B2 e B11 (60% dos isolados) não foi agrupado com nenhuma estirpe-referência. Esses isolados provavelmente pertencem ao gênero *Rhizobium*, um grupo importante de bactérias fixadoras de nitrogênio frequentemente isoladas de solos ácidos e com capacidade de acidificar o meio e produzir grande quantidade de exopolissacarídeos (FERREIRA et al., 2012 b).



**Figura 1-** Cluster gerado pela análise de agrupamento hierárquico das características culturais dos 20 isolados de rizóbio obtidos de solo degradado pela mineração de carvão em Criciúma, SC, sob leguminosas arbóreas e das cinco estirpes-referência fornecidas pela Embrapa Agrobiologia.

A distribuição dos isolados entre as características culturais avaliadas está apresentada na tabela 1, destacando-se principalmente as características de borda inteira e superfície lisa, a capacidade de desenvolver reação ácida em meio de cultura (100% dos isolados) e crescimento rápido, em 2 (90% dos isolados) ou 3 (10% dos isolados) dias. Além disso, 60% dos isolados apresentaram abundante produção de exopolissacarídeos e as colônias apresentaram coloração variando entre branco, creme e amarelo. As mesmas



apresentaram forma circular, com mais de 1 mm para 70% dos isolados e forma puntiforme para 30% dos isolados. Com relação à elevação 75% dos isolados apresentaram elevação drop-like e 25% apresentaram elevação convexa.

**Tabela 1.** Distribuição percentual das principais características culturais de rizóbios isolados de solo de uma área degradada pela mineração de carvão em Criciúma, SC, sob leguminosas arbóreas.

| <b>Característica</b>                 | <b>Distribuição (%)</b> |
|---------------------------------------|-------------------------|
| <b>Borda</b>                          | <b>Inteira</b> 100      |
| <b>Superfície</b>                     | <b>Lisa</b> 100         |
| <b>Modificação do pH do meio</b>      | <b>Acidificação</b> 100 |
| <b>Tempo de crescimento</b>           | <b>2 dias</b> 90        |
|                                       | <b>3 dias</b> 10        |
| <b>Produção de exopolissacarídeos</b> | <b>Abundante</b> 60     |
|                                       | <b>Moderada</b> 20      |
|                                       | <b>Pouca</b> 5          |
|                                       | <b>Escassa</b> 15       |
| <b>Consistência da massa</b>          | <b>Gomosa</b> 60        |
|                                       | <b>Viscosa</b> 30       |
|                                       | <b>Seca</b> 10          |
| <b>Forma</b>                          | <b>Circular</b> 70      |
|                                       | <b>Puntiforme</b> 30    |
| <b>Elevação</b>                       | <b>Drop-like</b> 75     |
|                                       | <b>Convexa</b> 25       |
| <b>Absorção do indicador</b>          | <b>Sim</b> 75           |
|                                       | <b>Não</b> 25           |

Trabalhando com isolados obtidos a partir de nódulos de bracinga de áreas compreendidas entre o Vale do Itajaí, Planalto Sul e Meio-Oeste de Santa Catarina, Brocardo (2013) observou colônias maiores do que 1,0 mm, com formato circular e borda lisa, com coloração de branca leitosa à amarela. Cerca de 69% das colônias apresentaram elevação convexa. Com a mesma espécie vegetal, Saturno e Andrade (2015) encontraram uma maioria de isolados de rápido crescimento, com colônias de forma circular, com grande produção de exopolissacarídeos, diâmetro maior do que 2 mm, bordas e superfícies lisas e que acidificam o meio de cultura. Portanto, a caracterização cultural de isolados obtidos a partir de solo sob bracinga apresentada nesse trabalho está de acordo com o observado em outros trabalhos com a mesma espécie vegetal.

Em estudos com acácia-negra, foram encontrados isolados de crescimento lento e que alcalinizam o meio de cultura, o que provavelmente indica a capacidade de acácia-

negra estabelecer simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (VARGAS et al., 2007). No presente trabalho, essas características culturais não foram observadas para o isolado obtido a partir de solo sob a mesma espécie vegetal (A8), sendo que a caracterização cultural indica que o mesmo provavelmente pertence ao gênero *Rhizobium*. Lafay e Burdon (2001) também constataram a capacidade de bactérias do gênero *Rhizobium* de nodular acácia-negra, mas bactérias desse gênero foram observadas em minoria no mesmo estudo (3% dos isolados).

Alguns dos isolados foram agrupados com a estirpe BR-9002 da Embrapa Agrobiologia, que pertence ao gênero *Bradyrhizobium*. Entretanto, esse gênero de bactérias fixadoras de nitrogênio tem por características principais o tempo de crescimento intermediário a lento e reação neutra a alcalina em meio de cultura com azul de bromotimol (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Portanto, as características culturais encontradas neste trabalho não comprovam a hipótese de que os isolados obtidos são pertencentes ao gênero citado, uma vez que os mesmos apresentaram reação ácida e crescimento rápido em meio de cultura. Além disso, a presença de muco é muito comum no gênero *Bradyrhizobium* (FURHMANN, 1990), o que não foi observado no presente trabalho. Os dados obtidos por Barnet e Catt (1991) com isolados da Austrália corroboram com os resultados encontrados neste trabalho. Os autores observaram colônias de *Bradyrhizobium* pequenas, com massa celular fortemente aderente e com pouca ou escassa produção de polissacarídeos extracelulares.

Alguns dos isolados obtidos neste trabalho apresentaram características culturais similares às de bactérias do gênero *Burkholderia*. A simbiose entre as leguminosas bracinga e maricá e bactérias desse gênero já foi relatada (CHEN et al., 2007). Colônias de bactérias do gênero *Burkholderia* têm sido descritas como pequenas e circulares, úmidas, esbranquiçadas e com bordas inteiras (REIS et al., 2002). Os isolados obtidos e agrupados com estirpes-referência do gênero *Burkholderia* diferenciam-se da descrição encontrada na literatura por apresentarem consistência de massa viscosa e coloração de branco leitoso à creme.

É importante ressaltar que algumas das características avaliadas provavelmente apresentam relação com o ambiente degradado do qual as bactérias foram isoladas. Em regiões nas quais os microrganismos são submetidos a estresse ambiental, é comum encontrar bactérias de crescimento rápido (SPRENT, 1994). Trabalhos de Barnet e Catt (1991) com bactérias isoladas de nódulos de raízes de *Acacia* spp. em diferentes regiões da

Austrália indicaram que os isolados são influenciados pela localização geográfica. Os autores observaram que os isolados de rápido crescimento foram obtidos em zonas áridas de difícil sobrevivência para os microrganismos. Santos et al (2007) também reforçam a hipótese de que o crescimento rápido dos isolados é uma estratégia de sobrevivência.

A produção de exopolissacarídeos também pode estar relacionada à sobrevivência das bactérias sob estresse relacionado a solo e clima (COUTINHO et al., 1999). De acordo com Rahmeier (2009), os exopolissacarídeos tornam as bactérias mais resistentes à antibióticos, aumentando sua capacidade de competição com outros microrganismos.

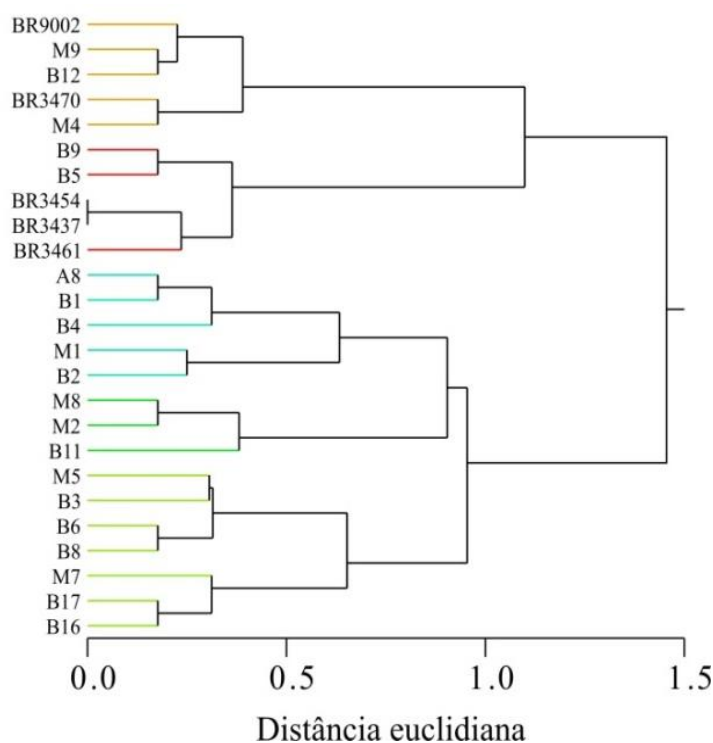
A produção de exopolissacarídeos pode ainda estar relacionada à acidez observada no solo das áreas degradadas. O efeito da acidez sobre o aumento da produção de exopolissacarídeos em bactérias do gênero *Bradyrhizobium* tem sido relatado (BARBERI et al., 2004; MIGUEL e MOREIRA, 2001). Trabalhando com solos ácidos do Cerrado brasileiro, Batista et al. (2007) observaram aumento da produção e excreção de exopolissacarídeos por bactérias do mesmo gênero. De acordo com Cunningham e Munns (1984), em *Rhizobium*, estirpes que produzem maior quantidade de exopolissacarídeos são mais resistentes a esse fator ambiental.

É possível que os níveis de elementos-traço tenham influência sobre a produção de exopolissacarídeos pelos rizóbios. Em áreas de mineração de ouro com altos níveis de arsênio, Rangel (2014) observou predominância de isolados que acidificam o meio, com produção abundante de exopolissacarídeos e rápido crescimento. Nesse mesmo estudo, os isolados que apresentavam crescimento intermediário a rápido, pouca produção de muco/exopolissacarídeos e alcalinizavam o meio de cultura eram, em geral, mais sensíveis aos níveis de arsênio. Os mesmos autores constataram aumento da produção de exopolissacarídeos pelos isolados à medida que a quantidade de As aumentava no substrato.

A adsorção de elementos-traço por exopolissacarídeos já foi relatada por Pereira et al. (2006). Os mesmos autores observaram um possível envolvimento de plasmídeos no controle da tolerância de rizóbios a elementos-traço e no controle da produção de exopolissacarídeos, sendo que os isolados mais tolerantes às concentrações de cádmio apresentaram em geral dois plasmídeos de 485 e 415kb a mais do que os isolados sensíveis, os quais apresentaram apenas outros dois plasmídeos comuns a todos os isolados.

A característica de produção abundante de exopolissacarídeos foi observada para a maioria dos isolados obtidos neste trabalho, podendo a mesma estar relacionada aos níveis de contaminação por elementos-traço e acidez do solo da área impactada pela atividade de mineração.

A partir do agrupamento hierárquico baseado nos dados obtidos pela BOX-PCR, foi possível distinguir três grupos. Os três grupos encontrados estão de acordo com o observado a partir da caracterização cultural (Figura 2) com a exceção de que os isolados B11, M2 e M8 não foram agrupados com nenhuma estirpe-referência por esse método. Portanto, de acordo com a BOX-PCR, 75% dos isolados não apresentaram similaridade com as estirpes-referência da Embrapa Agrobiologia.



**Figura 2-** Cluster gerado pela análise de agrupamento hierárquico dos dados da BOX-PCR dos 20 isolados de rizóbio obtidos de solo de área degradada pela mineração de carvão em Criciúma, SC, sob leguminosas arbóreas e das cinco estirpes-referência da Embrapa Agrobiologia.

A partir dos dados obtidos com a avaliação das características culturais e com a BOX-PCR dos isolados, é possível observar uma baixa especificidade entre as espécies de bactéria e de plantas, isso porque bactérias isoladas de solo sob de diferentes leguminosas estão no mesmo grupo de similaridade.

Em áreas degradadas, tem sido observada a predominância de  $\beta$ -rizóbios, o que está relacionado à maior adaptabilidade às condições ambientais locais, principalmente à acidez do solo, fator que limita a sobrevivência de  $\alpha$ -rizóbios (ZHANG et al., 2000). Neste trabalho, observamos a presença de bactérias pertencentes à ambos os grupos, assim como a predominância de isolados que provavelmente pertencem ao grupo dos  $\alpha$ -rizóbios.

Em solos de áreas construídas após a atividade de mineração de carvão, Quadros (2013) constatou a presença de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e ainda observou que bactérias do gênero *Burkholderia* eram predominantes na comunidade microbiana local após 19 anos de recuperação. Entretanto, esse autor não observou a presença de bactérias do gênero *Rhizobium*. Esses resultados não corroboram, portanto, o observado no presente trabalho. Em áreas degradadas pela mineração de bauxita, Melloni et al. (2006) isolaram bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* e *Allorhizobium*. Os mesmos autores não descrevem a presença de bactérias do gênero *Burkholderia* nessas áreas, gênero de bactéria observado neste trabalho.

Em trabalho recente realizado por Hernandez (2015) com os mesmos isolados de área de mineração de carvão, o sequenciamento parcial do gene 16S indicou a presença dos gêneros bacterianos *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Gluconobacter*, o que corrobora parcialmente com o obtido neste trabalho. O mesmo trabalho indica que os isolados M9 e B12, os quais foram agrupados com uma estirpe-referência do gênero *Bradyrhizobium*, pertencem ao gênero *Gluconobacter*, o que explica o fato de que esses isolados não apresentam as características culturais típicas do gênero *Bradyrhizobium*. O mesmo sequenciamento reforça a hipótese de que 60% dos isolados, os quais não foram agrupados por BOX-PCR ou por características culturais com nenhuma estirpe-referência, pertencem ao gênero *Rhizobium*.

Estudos complementares ainda devem ser realizados, sobretudo o sequenciamento completo do gene 16S, testes de tolerância a situações de estresse ambiental e avaliações de competição pela nodulação com rizóbios autóctones dos solos nos quais os isolados serão utilizados para estudos de recuperação ambiental.

## Conclusões

Os 20 isolados obtidos a partir solo da área de mineração de carvão foram agrupados em 3 grupos de similaridade, seja com base na caracterização cultural ou nos perfis eletroforéticos gerados a partir de BOX-PCR.

O agrupamento gerado a partir da BOX-PCR corroborou os resultados obtidos com o agrupamento gerado pela caracterização cultural, confirmando a eficácia dos dois métodos para a separação de isolados de rizóbios e estudo da diversidade.

Bactérias isoladas de solo sob diferentes leguminosas estão num mesmo grupo de similaridade, o que demonstra baixa especificidade entre as espécies vegetais e bacterianas estudadas.

As características mais comuns aos isolados foram o rápido crescimento, a grande produção de exopolissacarídeos e a acidificação do meio de cultura, o que pode estar relacionado à sobrevivência no ambiente do qual essas bactérias foram isoladas.

Verificou-se diversidade entre os isolados de rizóbios quanto às características culturais e genotípicas, apresentando características distribuídas nos gêneros das estirpes-referência, em que um total de 40% dos isolados foi agrupado pelas características culturais e 25% pela BOX-PCR com as estirpes-referência pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*.

### Referências bibliográficas

BARBERI, A.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 397, mar/abr. 2004.

BARNET, Y.M. ; CATT, P.C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. *Plant and Soil*, v.135, p.109-120, 1991.

BATISTA, J.S.S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; FERREIRA, M.C.; MENDES, I.C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microbial Ecology*, v.53, n.2, p.270-284, 2007.

BORMA, L.S.; SOARES, P.S.M. Drenagem ácida e gestão de resíduos sólidos de mineração, 295p. 2012.

BROCARD, N.C.M.E. Caracterização e avaliação da eficiência simbiótica de diazotróficos isolados de bracatinga. 2013. 76p. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

CARVALHO FG, Selbach P.A., Silva A.J.N. Especificidade hospedeira de variantes *Bradyrhizobium* spp. em soja (cvspeking e clark), caupi e guandu. *Rev. Bras. Ci Solo*, v. 32, p. 2701-2708, 2008.

CHEN, W.M. ; FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOTT, G.N.; 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, p.1055-1059, 2007.

COSTA, E.M. New *Bradyrhizobium* species from soils of different Brazilian regions: taxonomy and symbiotic efficiency. 2016. 170p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COUTINHO, H.L.D.; KAY, H.E.; MANFIO, G.P.; NEVES, M.C.P.; RIBEIRO, J.R.A.; RUMJANEK, N.G.; BERNGER, J.E. Molecular evidence for shifts in polysaccharide composition associated with adaptation of soybean *Bradyrhizobium* strains to the Brazilian Cerrado Soils, Environ Microbiol., v.1, 1999.

CPRM – Serviço Geológico do Brasil – Ministério de Minas e Energia. Disponível em [http://www.cprm.gov.br/publique/media/capXI\\_b.pdf](http://www.cprm.gov.br/publique/media/capXI_b.pdf) Acesso em 10 de fevereiro de 2016.

CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and Alumnum activity. Soil Sci. Soc. Am. J. v.48, 1984.

DIAS, L.E.; CAMPELLO, E.F.C.; RIBEIRO Jr., E.S. & MELLO, J.W.V. Initial growth of leguminous trees and shrubs in a cut gold mined area in Minas Gerais State, Brazil. In: NATIONAL MEETING FOR THE AMERICAN SOCIETY FOR SURFACE MINING AND RECLAMATION, 16., Scottsdale, 1999. Proceedings. Scottsdale, American Society for Surface Mining and Reclamation, 1999. p.316-321.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M., HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.38, n.8, p. 911-920, 2003.

FERREIRA P.A.A.; BOMFETI, C.A.; JUNIOR, R.S.; 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. Pesq Agropec Bras, v, 47,p. 85-95, 2012a.

FERREIRA, P.A.A., BOMFETI, C.A., SOARES, B.L., MOREIRA, F.M.S. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. World J Microbiol Biotechnol v.28, p.947–1959, 2012b.

FERREIRA, R.L.C.; LIRA JUNIOR, M.A.; da ROCHA, M.S.; SANTOS, M.V.F.; LIRA, M.A.; BARRETO, L.P. Deposição e acúmulo de matéria seca e nutrientes em serrapilheira em um bosque de sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth.). Rev Árvore, v.31, p.7-12, 2007.

FURHMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean Bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. Appl. And Environmental Microbiology, v.56, p.224-229, 1990.

GEETHA, S.J.; JOSHI, S.J. Engineering rhizobial bioinoculants: a strategy to improve iron nutrition. Sci World J, p.1-15, 2013.

GRONEMEYER, J.L.; KULKARNI, A.; BERKELMANN, D.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Identification and characterization of rhizobia indigenous to the Okavango region in Sub-Saharan Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* Setembro, 2014.

GUAN, D. ; STACEY, N. ; CHENGWO, L. ; JIANGQI, W. ; MYSORE, K.S. ; TORRES-JEREZ, I. ; VERNIÉ, T. ; TADEGE, M. ; ZHOU, C. ; WANG, Z. ; UDVARDI, M.K. ; OLDROYD, G.E.D. ; MURRAY, J.D. Rhizobial infection is associated with the development of peripheral vasculature in nodules of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, v.162, p. 107–115, 2013.

GUIMARÃES, A.A.; JARAMILO, P.M.D.; NÓBREGA, R.S.A.; FLORENTINO, L.A.; SILVA, K.B.; MOREIRA, F.M.S. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Applied and Environmental Microbiology*, v.78, n.18, p.6726-6733, setembro. 2012.

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, p. 398-400, 2002.

HERNANDÉZ, A.G. Promoção do crescimento de leguminosas herbáceas utilizando rizóbios isolados de áreas de mineração de carvão. 2015, 105p. Dissertação de mestrado (Biotecnologia e Biociências)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station. California: College of Agriculture, University of California, 1950.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MENNA, P.; BANGER, E.V. Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR. Comunicado Técnico, n.79. EMBRAPA: Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, 2008. 12p.

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

KELLY, D.P.; WOOD, A.P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen.nov., *Halothiobacillus* gen.nov. and *Thermithiobacillus* gen.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, p.511-516, 2000.

LAFAY, B. & BURDON, J.J. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:396-402, 2001.

MACEDO, M.O.; RESENDE, A.S.; GARCIA, P.C.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S.; CAMPELLO, E.F.C.; FRANCO, A.A. Changes in soil C and N stocks



and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. *Forest Ecology and Management*, v. 255, p.1516-1524, 2008.

MARCHETTI, M.; CAPELA, D.; GLEW, M.; CRUVEILLER, S.; CHANE-WOON-MING, B.; GRIS, C.; TIMMERS, T.; POINSOT, V.; GILBERT, L.B.; HEEB, P.; MÉDIGUE, C.; BATUT, J.; BOIVIN-MASSON, C. Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol* v.8, n.1, 2010.

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. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v.30, p.235-246, 2006.

MIGUEL, D. L. MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 4, p. 873-883, out./dez. 2001.

MOREIRA, F. M. S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. 1991. 158p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí

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

MOURA, G. G. D.; ARMAS, R. D. ; MEYER, E. ; GIACHINI, A. J. ; ROSSI, M. J. ; SOARES, C. R. F. S. . Rhizobia isolated from coal mining areas in the nodulation and growth of leguminous trees. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2016 (Aceito para publicação).

PEREIRA, S.I.A.; LIMA, A.I.G.; FIGUEIRA, E.M.A.P. Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* isolated from contaminated portuguese soils. *Microbial ecology*, v.52, p.176-186, 2006.

QUADROS, P.D. Diversidade de composição de comunidades microbianas de solos construídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas. 2013, 113p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RAHMEIER, W. Caracterização de isolados e eficiência de estirpes de rizóbio em feijão-caupi no cerrado, Gurupi-TO. 2009, 68p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

RANGEL, W.M. Simbioses de fungos micorrízicos arbusculares e de rizóbio com leguminosas em solo contaminado com arsênio. 2014, 121p. Dissertação (Mestrado em ciência do solo). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

REIS,V.M. ; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I. Ecologia, isolamento e identificação de bactérias diazotróficas. In: **Princípios e Técnicas Ecológicas Aplicadas à Agricultura**,

**v.9, 2002. Curso Intensivo em Agrobiologia. Seropédica:** Embrapa Agrobiologia, 2002, p.1-21.

SANTOS, C.E.R.E.S.; STAMFORD, N.P.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G.; BORGES, W.L.; BEZERRA, R.V.; FREITAS, A.D.S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Rev. Bras. de Ci. Agrárias*, v.2, n.4, p.249-256, 2007.

SATURNO, D.F.; ANDRADE, D.S. Diversidade de rizóbios que nodulam bracinga isolados de solos cultivados e de floresta. *Uniciências*, v.19, n.1, p.26-30, 2015.

SEMC- Secretaria de Energia, Minas e Comunicação do Estado do Rio Grande do Sul - SEMC. Disponível em: <http://www.semc.rs.gov.br/>. Acesso em 15 mai 2011.

SILVA, L.F.; WOLLENSCHLAGER, M.; OLIVEIRA, M.L.S. A preliminary study of coal mining drainage and environmental health in the Santa Catarina region, Brazil. *Environ Geoschem. Health*, v.33, p. 55-65, 2011.

SILVA, L.F.O.; OLIVEIRA, M.L.S.; BOIT, K.M.; FINKELMAN, R.B. Characterization of Santa Catarina (Brazil) coal with respect to human health and environmental concerns. *Environ Geochem. Health*, v.31, p.475-485. 2008.

SIQUEIRA, J.O.; SOARES, C.R.F.S.; SANTOS, J.G.D.; SCHNEIDER, J.; CARNEIRO, M.A.C. Micorrizas e a degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. In: Ceretta CA, Silva LS, Reichert, JM, editores. *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 5, p.219-306, 2007.

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. editores. *Fundamentos da matéria orgânica do solo - Ecossistemas tropicais e sub-tropicais*. 2ª ed. Porto Alegre: Metrópole Editora Ltda, p.495-524, 2008.

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

SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? *Plant and Soil*, v.161, p.1-10, 1994.

STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v.32, p.1107-1120, 2008.

STROSCHEIN, M.R.D. Caracterização de bactéria fixadora de nitrogênio em *Lupinus albus*. 2007, 83p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J.R.P.; JUNG, G.C.; GRANADA, C.E.; NEVES, A.G.; BRAGA, M.M.; NEGREIROS, T. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Ci. Solo*, v.31, p.647-654, 2007.

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

VINCENT, J.M.A. *Manual for the Practical Study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific; 1970.

ZHANG, H. ; HANADA, S. ; SHIGEMATSU, T. ; SHIBUYA, K. ; YAMAGATA, Y. ; KANAGAWA, T. ; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.50, p.743-749, 2000.