



Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Isoladas de Área de Mineração de Carvão⁽¹⁾.

Paulo Ademar Avelar Ferreira⁽²⁾; Sabrina de Fátima Barbosa Dahmer⁽³⁾; Taís Backes⁽⁴⁾; Zaida Inês Antonioli⁽⁵⁾; Rodrigo Josemar Seminoti Jacques⁽⁵⁾; Andressa de Oliveira Silveira⁽⁵⁾.

(1) Trabalho executado com recursos do CNPq

(2) Estudante de pós-doutorado; Universidade Federal de Santa Maria; Santa Maria, RS; ferreira.aap@gmail.com;

(3) Estudante de doutorado; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ; email: sabrina.dahmer@gmail.com

(4) Estudante de mestrado; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS; email: taisbackes@gmail.com

(5) Professor; Universidade Federal de Santa Maria; Santa Maria, RS; e-mails: zantonioli@gmail.com; rodrigo@ufsm.br; aosilveira@hotmail.com.

RESUMO: A seleção e identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio de áreas de mineração de carvão pode ser uma alternativa para programas de reflorestamento. Este trabalho teve por objetivo selecionar e identificar bactérias fixadoras de nitrogênio em área de mineração de carvão. Foram coletadas amostras de solo na área de mineração de carvão situada no município de Candiota – RS nas seguintes áreas: A1: Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação Espontânea (Aplicação de 10.4 toneladas de calcário); A2: Solos Construídos – 6 anos - Acácia-negra; A3: Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação espontânea; A4: Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Eucalipto; A5: Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Acácia-negra e Eucalipto; A6: Rejeito estéril* – 20 anos – Eucalipto e A7: Campo nativo – Área referência. Foram utilizadas as espécies *Macroptilium atropurpureum* e *Vicia sativa* como planta isca para captura das bactérias fixadoras de nitrogênio. Foram obtidas 115 estirpes bacterianas, sendo 77 estirpes de nódulos de *M. atropurpureum* (DC) Urb. e 38 de nódulos de *V. sativa* L. A comparação das sequências do gene 16S rRNA das 18 estirpes avaliadas utilizando os dados disponíveis no GenBank revelaram que as mesmas são filogeneticamente relacionadas com as sequências de bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas e pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*. O isolamento e identificação de estirpes de área de mineração de carvão, podem ser uma alternativa para proporcionar aumentos no desenvolvimento de espécies de leguminosas hospedeiras resultante de uma fixação mais eficiente do N₂.

Termos de indexação: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Macroptilium atropurpureum*, *Vicia sativa*

INTRODUÇÃO

O carvão mineral constitui dois terços dos recursos energéticos não renováveis do Brasil, sendo suas reservas 20 vezes maiores do que as de petróleo e 75 vezes superiores as de gás natural. As reservas totalizam 847,5 bilhões de toneladas, quantidade suficiente para atender a produção atual por 130 anos (ANEEL, 2013). Durante as etapas de lavra e beneficiamento do carvão são produzidos resíduos sólidos estéreis e rejeitos ricos em sulfetos (pirita, marcassita, esfarelita, arseno-pirita, galena e calcopirita). Esses materiais expostos a presença de oxigênio, da água e da ação de bactérias *Thiobacillus ferroxidans*, oxidam-se gerando o processo de acidificação de drenagens ácida de mina (DAM).

Em consequência a esse processo, tem-se o risco de contaminação de fontes de águas superficiais e subterrâneas e do solo, sendo que a recuperação dessas áreas se torna mais cara devido à dificuldade de reflorestamento. A utilização de tecnologias biológicas, como o emprego de microrganismos como as bactérias fixadoras de N₂ (BFN), oferece uma alternativa eficiente e de baixo custo para a recuperação destas áreas de mineração (Wu et al., 2006; Vázquez et al., 2006). Estudos relacionados com a capacidade de remediação por estes microrganismos oferecem ainda, um grande potencial a ser explorado.

Bactérias fixadoras de nitrogênio nativas em solos com elevados teores de metais pesados e baixo pH encontram-se adaptadas a este tipo de estresse, por isso a seleção de bactérias isoladas nestas condições pode fornecer informações importantes acerca de genótipos mais adaptados (Trannin et al., 2001; Ferreira et al., 2012).

Este trabalho teve por objetivo selecionar e identificar bactérias fixadoras de nitrogênio em área de mineração de carvão.



MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo

O local de coleta das amostras de solo foi na área de mineração de carvão situada no município de Candiota no Rio Grande do Sul, Brasil, cujas coordenadas geográficas são 31° 33' 55,5"S e 53° 43' 30,6"W. A região apresenta um clima subtropical úmido, tipo Cfa, segundo a classificação de Köppen. A temperatura média anual é de 17,2 °C. O solo original da área de mineração é classificado como Argissolo Vermelho Eutrófico típico. Foram coletados solos nas seguintes áreas: A1: Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação Espontânea (Aplicação de 10,4 toneladas de calcário); A2: Solos Construídos – 6 anos - Acácia-negra; A3: Solos Construídos – 8 Anos – Vegetação espontânea; A4: Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Eucalipto; A5: Solos Construídos com rejeito – 20 Anos – Acácia-negra e Eucalipto; A6: Rejeito estéril* – 20 anos – Eucalipto e A7: Campo nativo – Área referência.

Isolamento e identificação de bactérias fixadoras de nitrogênio

Para o isolamento das bactérias fixadoras de nitrogênio foram utilizadas como plantas isca *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. (siratro) e *Vicia sativa* L. (ervilhaca) devido à abrangência de diversidade na simbiose de microrganismos. As espécies vegetais foram cultivadas em tubetes com capacidade de 110 cm³, em casa de vegetação climatizada no Departamento de Solos da UFSM, nos meses de abril a maio de 2012. Os tubetes continham uma mistura de vermiculita e areia (2:1), após o preparo dos mesmos, estes foram autoclavados por uma hora a 121 °C.

Para captura e isolamento das bactérias fixadoras de nitrogênio, foi seguida a metodologia descrita por Soares et al., 2006.

Foram avaliadas as seguintes características culturais dos isolados: taxa de crescimento medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (crescimento rápido – 2 -3 dia; intermediário – 4 a 5 dias; lento – mais que 7 – 9 dias) e modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutro) e estás foram agrupadas com base em suas características morfológicas.

Com base no agrupamento morfológico foram selecionadas 18 estirpes para a caracterização genética. Para a amplificação da região 16S do rRNA foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores 27F e 1492R (Lane, 1991). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando: PCR buffer 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTP, 0,2 µM primers, 0,02 U Taq DNA

polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), H₂O ultra-pura estéril e 1 µL de DNA, totalizando um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Techne® Endurance TC-312 com o seguinte perfil térmico: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 segundos, anelamento a 55 °C por 40 segundos, extensão a 72 °C por 1,5 minutos, e a extensão final a 72 °C por 7 minutos (Ferreira et al., 2012). O fragmento amplificado foi separado em gel de agarose 1% e visualizado sob luz UV, confirmando a amplificação. Posteriormente foi submetido à purificação utilizando o kit PureLink® PCR Purification Kit (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e sequenciado utilizando o equipamento ABI-PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). As sequências foram analisadas utilizando o programa Staden Package 2.0.0b (Staden et al., 2003) e após as mesmas foram submetidas ao BLAST para comparação com sequências do GenBank (NCBI). Além disso, foram sequenciados também estirpes de referência SEMIA 806 (*Mesorhizobium* sp.) e CIAT 889 (*Rhizobium tropici*) para ser utilizado como comparação positiva com os isolados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 115 estirpes bacterianas, sendo 77 estirpes de nódulos de *M. atropurpureum* (DC) Urb. e 38 de nódulos de *V. sativa* L. Foram isoladas 17, 9, 22, 10, 22, 17, 18 estirpes nas áreas A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7, respectivamente (Figura 1a).

As 115 estirpes avaliadas foram fenotipicamente agrupadas de acordo com a taxa de crescimento (tempo para aparecimento de colônias isoladas visíveis) e a capacidade de alterar o pH do meio de cultura (Figura 1b). Um total de seis grupos fenotípicos foram observados: crescimento lento, que alcalinizaram o meio (LAL), crescimento lento, que não alteraram o pH do meio (LN), crescimento lento, que alcalinizam o meio (LA), crescimento rápido, com capacidade de alcalinizar o meio (RAL), crescimento rápido e que não alteraram o pH do meio (RN) e crescimento rápido e com capacidade de acidificar o meio (RA). Apenas os isolados do *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. apresentaram crescimento lento, que não alteraram o pH do meio (LN) e crescimento rápido, com capacidade de alcalinizar o meio (RAL), e apenas os isolados de *Vicia sativa* L. apresentaram crescimento lento e pH ácido (LA).

Com base nos resultados das características morfológicas, foram selecionadas 18 estirpes (13 estirpes isoladas de *M. atropurpureum* e 5 estirpes isoladas de *V. sativa*) para identificação filogenética (Tabela 1).



A comparação das sequências do gene 16S rRNA das 18 estirpes avaliadas utilizando os dados disponíveis no GenBank revelaram que as mesmas são filogeneticamente relacionadas com as sequências de bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas e pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Burkholderia* e *Bradyrhizobium* (Tabela 1). As similaridades das sequências apresentadas pelas espécies estudadas com os acessos ao GenBank variaram de 96% a 99% (Tabela 1). As estirpes UFSM-B21, UFSM-B22, UFSM-B32, UFSM-B51, UFSM-B52, UFSM-B53, UFSM-B54, UFSM-B55, UFSM-B61, UFSM-B64, UFSM-B76 e UFSM-B77 são pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* e a estirpe UFSM-B74 pertencente ao gênero *Rhizobium* e, foram isoladas de nódulos de *Macropodium atropurpureum*. As estirpes isoladas de nódulos de *Vicia sativa* UFSM-B11, UFSM-B12 e UFSM-B65 são classificadas como do gênero *Rhizobium* e as estirpes UFSM-B33 e UFSM-B35 pertencentes ao gênero *Burkholderia*.

Foram isoladas estirpes de todas as áreas avaliadas, com maior número nas áreas com solos construídos a 8 anos com vegetação espontânea e solos construídos com rejeito a 20 anos com Acácia negra e Eucalipto (Figura 1a). Quanto a caracterização fenotípica é possível verificar a influência do hospedeiro na obtenção das estirpes (Figura 1b), na qual pode se observar que quando utilizou-se como planta-isca *V. sativa*, houve predominância de estirpes de crescimento rápido e com capacidade de acidificação do meio de cultura 79, característica típica do gênero *Rhizobium*. Já com *M. atropurpureum* houve maior número de estirpes e com maior diversidade fenotípica. Esta leguminosa é considerada promiscua em sua capacidade de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo capaz de capturar diversos gêneros de α e β -rizóbios (Lima et al., 2009). Das 13 estirpes selecionadas obtidas a partir de *M. atropurpureum*, 12 pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* e uma ao gênero *Rhizobium* (Tabela 1). A análise filogenética de 10 estirpes revelou que sete delas se agruparam ao subgrupo II na qual faz parte a tradicional espécie *B. elkanii* e três ao subgrupo I onde está *B. japonicum*, revelando uma diversidade entre as estirpes obtidas. No entanto, devido à alta similaridade do gene 16S rRNA, futuros testes são necessários para melhor caracterização destas estirpes.

Em áreas de mineração de carvão, toda cobertura florestal e a camada de solo mais fértil é removida para a exploração do mineral, acarretando assim, no rompimento do fluxo de nutrientes e energia. Dos nutrientes presentes na camada superficial, o nitrogênio torna-se um dos elementos mais limitante no processo de revegetação natural

(Vitousek & Howarth, 1991). A disponibilidade de N pode atuar como um mecanismo importante no processo de sucessão natural. Em áreas degradadas tropicais, onde a disponibilidade é normalmente baixa, as leguminosas herbáceas e arbóreas mostram-se como uma fonte primária de nitrogênio capaz de permitir a recolonização vegetal e o aumento da biodiversidade (Siddique et al., 2008), contribuindo com a recuperação do solo pela deposição de material vegetal com baixa relação C:N (Nardoto et al., 2008), aumentando a atividade biológica e atuando como agente formador e estabilizador da matéria orgânica do solo (Lavelle, 2000; Resh et al., 2002).

CONCLUSÕES

O isolamento e identificação de estirpes de área de mineração de carvão, podem ser uma alternativa para proporcionar aumentos no desenvolvimento de espécies de leguminosas hospedeiras resultante de uma fixação mais eficiente do N_2 , no entanto, é importante que a planta também esteja adaptada a essas condições de solo e, por isso, estudos relacionando a eficiência simbiótica e a tolerância a fatores ambientais adversos devem continuar.

AGRADECIMENTOS

À Fapers pelo financiamento da bolsa e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Energia Elétrica – (ANEEL). Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/>. Acesso em 20 de julho de 2013.

FERREIRA, P.A.A.; BOMFETI, C.A.; SILVA JÚNIOR, 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, 47:85-95, 2012.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In STACKEBRANDT, E. & GOODFELLOW, M., ed. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New York, NY, 1991. p 115–148.

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 atropurpureum*). Plant and Soil, 319:127–145, 2009.

NARDOTO, G.B.; OMETTO, J.P.H.B.; EHLERINGER, J.R.; BASTAMANTE, M.M.C.; MARTINELLI, L.A. Understanding the influences of spatial patterns on N



availability within the Brazilian Amazon Forest. *Ecosystems*, 11(8):1234–1246, 2008.

STADEN, R., JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K. Analysing sequences using the Staden Package and EMBOSS. In: KRAWETZ, S.A. & WOMBLE, D.D. (Eds.) *Introduction to bioinformatics*. Humana Press, Totowa, 2003. p. 393–410.

SIDDIQUE, I.; ENGEL, V.L.; PARROTTA, J.A.; LAMB, D.; NARDOTO, G.B.; OMETTO, J.P.H.B.; MARTINELLI, L.A.; SCHMIDT, S. Dominance of legume trees alters nutrient relations in mixed species forest restoration plantings within seven years. *Biogeochemistry*, 88(1):89-101, 2008.

TRANNIN, I.C.B.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LIMA, A.S. Tolerância de Estirpes e Isolados de *Bradyrhizobium* e de *Azorhizobium* a Zinco, Cádmiio e Cobre "In Vitro". *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 25:305-316, 2001.

VÁZQUEZ, S.; AGHA, R.; GRANADO, A.; SARRO, M.J.; ESTEBAN, E.; PEÑALOSA, J.M.; CARPENA, R.O. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air Soil Pollut*, 177:349–365, 2006

VITOUSEK, P.M.; HOWARTH, R.W. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13: 87-115, 1991.

WU CH, WOOD TK, MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Engineering plant-microbe symbiosis for rhizoremediation of heavy metals. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 1129-1134, 2006.

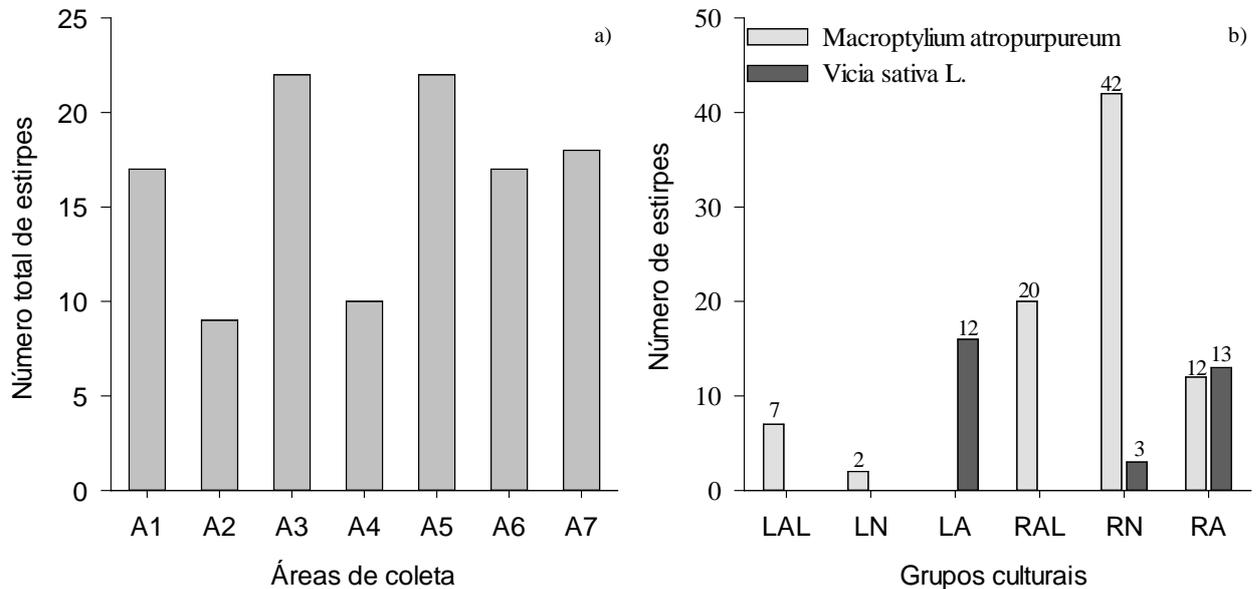


Figura 1 – Número de participantes por categoria: estudantes de graduação não-sócios e sócios; estudantes de pós-graduação não-sócios e sócios; e profissionais não-sócios e sócios, nas últimas três edições do Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (hipotético).

Tabela 1. Origem e identificação das estirpes isoladas de nódulos de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) e ervilhaca (*Vicia sativa*)

Estirpes	SUT	Planta isca	Identificação	Similaridade (%)
UFSM-B11	A1	Ervilhaca	<i>Rhizobium</i> sp..	99
UFSM-B12	A1	Ervilhaca	<i>Rhizobium</i> sp.	99
UFSM-B21	A2	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B22	A2	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B32	A3	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100
UFSM-B33	A3	Ervilhaca	<i>Burkholderia</i> sp.	96
UFSM-B34	A3	Ervilhaca	<i>Burkholderia</i> sp.	99
UFSM-B51	A5	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B52	A5	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B53	A5	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	98
UFSM-B54	A5	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B55	A5	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B61	A6	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	98
UFSM-B64	A6	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B65	A6	Ervilhaca	<i>Rhizobium</i> sp.	99
UFSM-B74	A7	Siratro	<i>Rhizobium</i> sp.	99
UFSM-B76	A7	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99
UFSM-B77	A7	Siratro	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99

SUT - Sistema de uso da terra: Solo construído – 8 anos – Vegetação espontânea (Aplicação de 10.4 toneladas de calcário) (A1), Solo construído – 6 anos – Acácia negra (A2), Solo construído – 8 anos – Vegetação espontânea (A3), Solo construído com rejeito – 20 anos – Eucalipto (A4), Solo construído com rejeito – 20 anos – Acácia negra e Eucalipto (A5), Rejeito estéril (A6) e Campo nativo – área referência (A7)