

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM MANEJO DO SOLO**

DENNIS GÓSS DE SOUZA

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SOLOS RECONSTRUÍDOS APÓS
A MINERAÇÃO DE CARVÃO, NA BACIA CARBONÍFERA
CATARINENSE**

LAGES - SC

2011

DENNIS GÓSS DE SOUZA

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SOLOS RECONSTRUÍDOS APÓS
A MINERAÇÃO DE CARVÃO, NA BACIA CARBONÍFERA
CATARINENSE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
em Manejo do Solo como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Julio Cesar Pires Santos
Co-orientador: Osmar Klauberg Filho

LAGES - SC

2011

DENNIS GÓSS DE SOUZA

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM SOLOS RECONSTRUÍDOS APÓS
A MINERAÇÃO DE CARVÃO, NA BACIA CARBONÍFERA
CATARINENSE**

Universidade do Estado de Santa Catarina; Mestrado em Manejo do Solo; Caracterização, Conservação e Uso dos Recursos Naturais. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Manejo do Solo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Banca Examinadora

Orientador:

Prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos
Universidade do Estado de Santa Catarina

Co-orientador:

Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Profa. Dra. Carolina Riviera Maluche Baretta
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Profa. Dra. Siu Mui Tsai
Universidade de São Paulo

Membro:

Profa. Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho
Universidade Federal de Santa Catarina

Lages (SC), 28/02/2011.

A todos aqueles que viveram pela ciência e tornaram possíveis os avanços dos quais gozamos hoje. Aos meus pais e às minhas duas irmãs, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, pela vida e saúde.

Aos meus Pais, Donizette e Joanira, pelo Amor, Educação e Ensinos de vida transmitidos.

Às minhas irmãs Danise e Daniele, pelo Amor e Carinho, além dos inesquecíveis momentos que compartilhamos.

Ao meu orientador e amigo, prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos, pelo exemplo de profissional e homem de caráter puro que é. Foi um privilégio conviver, trabalhar e aprender com esta figura durante quase sete anos. Sua amizade tem valor inestimável.

À profa. Dra. Siu Mui Tsai, por ter aberto as portas de seu laboratório com tanto carinho. Pela sua orientação e incentivo, além de todos os ensinamentos passados, meus sinceros agradecimentos, pois sem sua ajuda não seria possível a realização desse trabalho.

À profa. Dra. Carolina Riviera Maluche Baretta e à profa. Dra. Cileide Maria Medeiros Coelho, pelas dicas e sugestões na elaboração e desenvolvimento desse projeto.

Aos professores Dr. David José Miquelutti e Dr. Osmar Klauberg Filho, pelo constante apoio logístico e intelectual nesses dois anos de convívio, e pelos ensinamentos transmitidos.

À Capes, pela concessão da bolsa.

Ao Proap, na pessoa do prof. Dr. Luciano Colpo Gatiboni, que não mediu esforços para conseguir auxílio, sempre que necessário.

Aos professores Paulo Roberto Ernani, Jaime Antônio de Almeida, Jackson Adriano Albuquerque, Álvaro Luiz Mafra, Paulo Cesar Cassol, Ildegardis Bertol, Mari Lúcia Campos, Fátima Maria de Souza Moreira, Claudio Roberto de Souza, João Fert Neto e Cleimon Dias do Amaral, pelos ensinamentos transmitidos.

À Fapes, pela concessão dos recursos para custear o desenvolvimento do projeto.

À Universidade de São Paulo, mais especificamente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela estrutura que me foi disposta pra a realização desse trabalho.

Aos laboratoristas do Departamento de Solos e Recursos Naturais, Henrique e Thiago, pela dedicação e apoio.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP, Elias, Ludmila, Fábio, Vagner, Francisco, Ademir, Clóvis, Acácio, Felipe, Caio, Enéas, Ézio, Wellington, Valter, Peter, Aline, Lilian, Lina, Bianca, Marcela, Jane, Marília, Daniele, Beatriz,

Ana Beraldo, Maria Julia, Mariana Redondo e Mariana Germano, pelo convívio e saberes trocados. Em especial ao Lucas e ao Daniel, pela amizade e apoio na execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Fauna do Solo do CAV/UDESC, Luis Carlos, Diego, Fernando, James, Alexandre, Adilson, Vitor, Gessiani, Dayana, Elaine, Anelize, Janaína, Margareth, Priscila, Jerusa, Sabrina, Dayse, Paula, Dalciana, Larissa, Luciana, Celso, David, Leonel e Andreas, pelo convívio e amizade.

Em especial, aos bolsistas Vinicius e Talita, pela perseverança, apoio e amizade.

Ao amigo Mauricio, pelos ensinamentos e amizade em toda a minha jornada acadêmica.

RESUMO

SOUZA, Dennis Góss de. **Bactérias diazotróficas em solo reconstruídos após mineração de carvão, na Bacia Carbonífera Catarinense.** 2011. 103p. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo - Área: Caracterização, Conservação e Uso dos Recursos Naturais) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Manejo do Solo, Lages, 2011.

Poucos dados na literatura enfocam a dimensão dos impactos da atividade mineradora, bem como a eficiência das estratégias de recuperação das áreas degradadas pela atividade. Bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos radiculares (BFNINR) presentes nessas áreas podem ser utilizadas estrategicamente, auxiliando no processo de recuperação do solo e atuando como componentes para uso como bioindicadores da qualidade do solo. O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar a abundância e a diversidade de BFNINR em simbiose com *Phaseolus vulgaris*, utilizando solos oriundos de áreas com diferentes estratégias de manejo do solo reconstruído após a mineração, na Bacia Carbonífera Catarinense. Foram coletadas três amostras de solo no perfil de 0-10 cm de cada uma das áreas: testemunha (TR); aplicação de calcário (CA); calcário + *Brachiaria* spp. (CB); calcário + cama de aves + *Brachiaria* spp. (CCB); resíduo alcalino Dregs (DR); sucessão fumo/aveia (FA); *Brachiaria* monocultivo (BR); e duas áreas comparativas, campo naturalizado (CN) e mata nativa (MN). Foi conduzido um experimento em delineamento inteiramente casualizado, em casa de vegetação por 23 dias, com diluições de solo (10^1 a 10^5) em quatro repetições, inoculado em *Phaseolus vulgaris*. Após a colheita, foi obtida a abundância de BFNINR, através do número mais provável (NMP - células por grama de solo seco). Os isolados de nódulos obtidos foram caracterizados fenotipicamente em meio batata-ágar e filogeneticamente pela técnica PCR-RISA. Representantes dos principais grupos filogenéticos tiveram seus genes 16S sequenciados. A maior abundância foi encontrada na área em FA ($1,645 \times 10^5$), MN ($5,622 \times 10^4$), CN ($9,244 \times 10^3$) e TR ($1,352 \times 10^4$). A menor abundância foi encontrada em BR ($2,557 \times 10^0$), CA ($1,406 \times 10^1$), CB ($4,990 \times 10^0$), CCB ($2,404 \times 10^1$) e DR ($8,573 \times 10^1$). O maior índice de diversidade alfa fenotípica foi encontrado na área FA, seguido de MN, TR e CN. Os menores índices foram encontrados em BR, CCB, CB, DR e CA, respectivamente. O maior índice de diversidade alfa filogenética foi encontrado na área TR, seguido de CA, DR, MN, FA e CCB. Os menores índices foram obtidos em CN e CB. A densidade e a diversidade foram influenciadas pelo processo de reconstrução do solo e pelo manejo após a reconstrução. A área FA apresentou os maiores valores de resultados, compilando-se os valores de abundância, diversidade fenotípica e diversidade filogenética. *Phaseolus vulgaris* demonstrou sua capacidade de utilização como planta-armadilha. Os diazotróficos simbiotes mostraram-se capazes de separar as áreas e podem ser utilizados como componentes de bioindicadores da qualidade do solo. O sequenciamento evidenciou a presença de bactérias das classes α , β e γ -proteobactéria, com predomínio de *Burkholderia* sp. A análise de redundância (RDA) mostrou-se uma ferramenta capaz de captar a variabilidade entre as áreas reconstruídas e as áreas referenciais.

Palavras-chave: Beta-rhizobia. Drenagem ácida. Proteobactéria. Reconstrução do solo. PCR-RISA.

ABSTRACT

SOUZA, Dennis Góss de. **Diazotrophic Bacteria in rebuilt soils after coal mining, at Santa Catarina's Coal Basin.** 2011. 103p. Dissertation (Masters Course in Soil Management - Area: Characterization, Conservation and Use of Natural Resources) – Santa Catarina State University. Graduate Program in Soil Management, Lages, 2011.

Few data in the literature have focused the dimension of the mining activity impacts, as well as the efficiency of the strategies of restoration of the degraded areas by the activity. Diazotrophic Bacteria present in these areas can be used strategically, helping soil restoration process and acting as soil quality bioindicator composers. The main goal of this work was to evaluate the abundance and the diversity of nitrogen fixing Bacteria isolated from root nodules (NFBIRN) of *Phaseolus vulgaris*, utilizing soils originated of areas with different soil management strategies of the rebuilt soil after the coal mining, at Santa Catarina's Coal Basin. Three soil samples were collected in the 0-10 cm profile of each area: witness (TR); limestone (CA); limestone + *Brachiaria* spp. (CB); limestone + poultry manure + *Brachiaria* spp. (CCB); cellulose dregs (DR); tobacco/oat succession (FA); *Brachiaria* monoculture (BR); and two comparative areas, naturalized field (CN) and native forest (MN). A 23-day experiment was conducted in a completely randomized design, in green house with soil dilutions (10^1 to 10^5) in four replicates, inoculated in *Phaseolus vulgaris*. After the harvest, the abundance of NFBIRN was obtained, through the most probable number (MPN – cells per gram of dry soil). The isolates of nodules obtained were characterized phenotypically (potato-agar medium) and phylogenetically (RISA-PCR). Representative isolates of the main groups had their 16S genes sequenced. The highest abundance was found in FA ($1,645 \times 10^5$), MN ($5,622 \times 10^4$), CN ($9,244 \times 10^3$) e TR ($1,352 \times 10^4$). The smallest density was found in BR ($2,557 \times 10^0$), CA ($1,406 \times 10^1$), CB ($4,990 \times 10^0$), CCB ($2,404 \times 10^1$) e DR ($8,573 \times 10^1$). The highest phenotypic alfa diversity indexes were found in FA, MN, TR e CN. The smaller indexes were found in BR, CCB, CB, DR and CA. The highest phylogenetic alfa diversity index was found in TR, followed by CA, DR, MN, FA e CCB. The smaller indexes were obtained in BR, CN and CB. The density and the diversity were influenced by the soil management after rebuilding. FA area showed higher values, compiling both density, phenotypic diversity and phylogenetic diversity. *Phaseolus vulgaris* showed its capability to be utilized as trap-plant. Symbiont diazotrophics showed their capability of distinguishing areas and can be used as soil quality bioindicator composers. The sequencing demonstrated the presence of both α , β e γ -proteobacteria classes, predominantly *Burkholderia*. The redundancy analysis (RDA) proved to be a tool capable of capturing the variability in both reconstructed and reference areas.

Key-words: Beta-rhizobia. Acid drainage. Proteobacteria. Soil rebuilding. RISA-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: NMP de diazotróficos nas diferentes áreas, com solo reconstituído após a mineração de carvão, em Lauro Muller, SC. Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test, REGWQ = 0,05; $R^2 = 0.916$; CV = 27,49%; F = 24,80; $\ln \text{NMPm}_t = 5.442$49
- Figura 2: Diversidade fenotípica dos diazotróficos oriundos de solos reconstruídos após a mineração de carvão, na Bacia Carbonífera Catarinense. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.....52
- Figura 3: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área TR. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.....52
- Figura 4: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CA. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal e Michener..... 53
- Figura 5: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CB. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.....53
- Figura 6: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CCB. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.....54
- Figura 7: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área DR. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal e Michener.....54
- Figura 8: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área FA. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.....55
- Figura 9: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CN. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.....55
- Figura 10: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área MN. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.....56
- Figura 11: Diversidade filogenética geral dos diazotróficos. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.....60
- Figura 12: Diversidade filogenética dos diazotróficos na mina do apertado. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.....61
- Figura 13: Diversidade filogenética dos diazotróficos na área FA. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.....62

Figura 14: Diversidade filogenética dos diazotróficos na área CN. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.....	63
Figura 15: Diversidade filogenética dos diazotróficos na área MN. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.....	63
Figura 16: Relação evolucionárias dos taxos inferida utilizando o algoritmo UPGMA. A árvore otimizada à um comprimento de ramo de 0,703 é mostrada. As distâncias evolucionárias foram computadas usando o método de Máxima Verossimilhança Composta (<i>Maximum Composite Likelihood</i>). A análise envolveu 37 sequências de nucleotídeos. Todas as posições de códon com “gaps” ou os nucleotídeos não alinhados foram eliminados. O conjunto de dados final resultou em sequências de 316 nucleotídeos.....	66
Figura 17: Distribuição dos isolados de diazotróficos entre classes, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S.....	67
Figura 18: Frequência relativa dos isolados de diazotróficos entre gêneros, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S.....	68
Figura 19: Frequência relativa dos isolados de diazotróficos por gênero entre as áreas reconstruídas após a mineração de carvão, na Bacia Carbonífera Catarinense, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S. A área <i>Brachiaria</i> monocultivo (BR) obteve apenas um isolado classificado como <i>Burkholderia</i> sp.....	77
Figura 20: Análise de redundância (RDA), com uma matriz de dados biológicos e uma matriz de dados ambientais, utilizando o teste de Monte Carlo para 499 permutações.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos flavonoides indutores de genes <i>nod</i> em soja e feijoeiro.....	23
Tabela 2. Temperatura e umidade do solo nas áreas amostradas, com três repetições no perfil de 0-10 cm.....	38
Tabela 3. Atributos químicos do solo reconstruído nas áreas afetadas pela exploração de carvão mineral, na Bacia Carbonífera de Santa Catarina.....	39
Tabela 4. Exemplo de valores discretos de NMP obtidos da tabela de McCrady. Diluições seriais com quatro repetições.....	41
Tabela 5. Número mais provável (NMP) de diazotróficos, pelo método indireto, utilizando o teste de comparação múltipla de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch. Valores transformados em base logarítmica natural. Nível de significância: 5%.....	48
Tabela 6. Número de isolado de BFNINR obtidos por área, dos solos reconstruídos após a mineração de carvão, em Lauro Muller, SC.....	51
Tabela 7. Índice de diversidade de Gleason para a comparação fenotípica dos isolados de diazotróficos simbiotes realizada em meio batata-ágar, em solos reconstruídos após a mineração de carvão.....	56
Tabela 8. Índice de diversidade de Gleason para a comparação filogenética obtida pelo perfil de RISA-PCR dos isolados de diazotróficos simbiotes, em solos reconstruídos após a mineração de carvão.....	64
Tabela 9. Análise de redundância (RDA), com uma matriz de dados biológicos e uma matriz de dados ambientais, utilizando o teste de Monte Carlo para 499 permutações.....	80
Tabela 10. Análise de similaridade (ANOSIM), formada pelo conjunto de variáveis biológicas e ambientais, utilizando o índice de beta diversidade de Bray-Curtis com 999 permutações. A matriz de dissimilaridade gerada por ranqueamento mostra que para valores iguais a 1 ($R = 1$) os grupos são distintos; valores maiores que 0,75 e menores que 1 ($0,75 < R < 1$) indicam uma clara de separação entre grupos; valores maiores de que 0,5 até 0,75 ($0,5 < R \leq 0,75$) indicam grupos separados com alguma sobreposição; valores maiores que 0,25 até 0,5 ($0,25 < R \leq 0,5$) indicam grupos fracamente separados com grande sobreposição e valores menores que 0,25 ($R \leq 0,25$) indicam que quase não há diferenças entre grupos.....	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1.1. O carvão mineral e o processo de mineração.....	16
1.1.2. Impactos ambientais passivos da exploração de carvão.....	18
1.1.3. O papel do nitrogênio nos ecossistemas.....	19
1.1.4. Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL).....	20
1.1.5. Estratégias de recuperação de áreas degradadas pelo processo de mineração.....	23
1.1.6. Métodos de avaliação da densidade e diversidade de microrganismos no solo.....	28
1.1.6.1. Ocorrência e abundância.....	28
1.1.6.2. Diversidade fenotípica.....	29
1.1.6.3. Diversidade genética e filogenética.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. LOCALIZAÇÃO E CLIMA.....	34
2.2. COLETA DO MATERIAL AMOSTRAL.....	37
2.3. ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO.....	37
2.4. ISOLAMENTO DOS DIAZOTRÓFICOS.....	40
2.5. ABUNDÂNCIA DOS DIAZOTRÓFICOS.....	41
2.6. DIVERSIDADE FENOTÍPICA.....	42
2.7. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	42
2.7.1. Extração do DNA bacteriano.....	42
2.7.2. PCR universal do gene ribossomal 16S.....	43
2.7.3. Presença do gene <i>nifH</i>	43
2.7.4. PCR-RISA dos isolados.....	44
2.7.5. Sequenciamento completo do gene ribossomal 16S.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.1. NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP).....	46
3.2. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO FENOTÍPICO.....	51
3.3. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO FILOGENÉTICO.....	60
3.4. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO GENÉTICO.....	65
3.5. ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA (RDA).....	78
3.6. ANÁLISE DE SIMILARIDADE (ANOSIM).....	82

4. CONCLUSÕES.....	85
5. REFERÊNCIAS.....	87
6. ANEXOS.....	103

1. INTRODUÇÃO

A mineração de carvão a céu aberto é uma das principais atividades degradadoras de solos no Estado de Santa Catarina, causando problemas ambientais significativos e restringindo o aproveitamento destas áreas após a atividade mineradora. A principal região atingida pela exploração do carvão é o Sul do Estado, mais especificamente os municípios de Siderópolis, Urussanga, Criciúma e Lauro Muller (cidades mais importantes da Bacia Carbonífera Catarinense).

A degradação do ambiente causa restrições ao estabelecimento de espécies florestais arbóreas, como também de plantas arbustivas e herbáceas, em muitas tentativas de revegetação das áreas, favorecendo assim o processo erosivo dos solos e o assoreamento dos leitos do rio nas proximidades das áreas mineradas. A contaminação das camadas superficiais do solo pela oxidação da pirita provoca intensa acidificação e acelera a intemperização de minerais, elevando os teores de alumínio e manganês a níveis acima dos tolerados.

As informações sobre o resultado das tentativas de recomposição de solos após a mineração de áreas de carvão a céu aberto são escassas, embora se conheçam os efeitos prejudiciais da deposição de resíduos da mineração do carvão sobre a superfície do solo ou, ainda, da recomposição inadequada das áreas mineradas. O tipo de preparo e cultivo do solo e o crescente aumento das áreas degradadas por mineração de carvão a céu aberto podem afetar negativamente os atributos físicos, químicos e biológicos do solo, inclusive a microbiota edáfica, onde estão inseridas as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. A inexistência de trabalhos avaliando a ocorrência, a diversidade e o papel dos diazotróficos na recuperação de áreas degradadas ou reconstituídas após a atividade mineradora, representa um campo vasto para obtenção de conhecimento e posterior aplicação de técnicas, que auxiliarão nas estratégias de manejo do solo e da vegetação, em uma área de expressiva representatividade nos ecossistemas Catarinenses.

O solo é um sistema aberto com equilíbrio dinâmico e complexo, onde diferentes organismos desempenham papéis fundamentais para a manutenção e a sobrevivência de comunidades vegetais e animais nos ecossistemas. Os avanços das técnicas moleculares, bioquímicas e fisiológicas para o estudo de comunidades microbianas dos solos tornaram possível avaliar a diversidade e a composição destas comunidades complexas. Isso tudo tem possibilitado compreender o papel dos indivíduos inseridos no sistema solo, bem como sua composição e variabilidade espacial e temporal em ambientes naturais ou impactados, em resposta aos distúrbios e atividades de manejo destes ecossistemas (LECKIE, 2005).

A inexistência de estudos de diversidade de diazotróficos em solos afetados pela mineração de carvão, faz com que a exploração do potencial das bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos radiculares (BFNINR) na recuperação destas áreas degradadas leve a possível identificação de grupos capazes de responder ao manejo empregado na revegetação e reconstituição, os quais possam ser utilizados em estratégias de recuperação do solo.

A diversidade funcional da microbiota do solo é determinada pela diversidade genética e está associada à ocorrência de processos essenciais para a manutenção de sua qualidade. Portanto, supõe-se que a diversidade genética pode ser usada como indicadora da qualidade dos solos (LAMBAIS et al., 2005), permitindo o entendimento da complexidade da ligação entre diversidade microbiana e suas funções no solo e a compreensão das relações entre diversidade genética e estrutura de comunidades (NANNIPIERI et al., 2003).

Os trabalhos envolvendo bioindicadores de qualidade do solo são limitados, principalmente pela baixa capacidade de avaliação da diversidade da microbiota pelos métodos comuns de análise e, pela dificuldade de se empregar técnicas mais avançadas, como as de biologia molecular, que requerem equipamentos e treinamento específicos. Além disso, poucos são os trabalhos de levantamento e recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão, que levam em conta a diversidade dos diferentes grupos funcionais de microrganismos do solo.

Baseadas nessas informações foram desenvolvidas as seguintes hipóteses: i) Há uma grande diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico em áreas em diferentes estádios de sucessão ecológica, na região carbonífera do Sul de Santa Catarina; ii) A ocorrência e a diversidade dos diazotróficos é influenciada pelo estágio de sucessão ecológica e manejo do solo, no qual se encontram; iii) Há indivíduos adaptados às condições impactantes causadas pelo processo de mineração de carvão na região sul de Santa Catarina e esses formam simbiose ou associação efetiva com plantas superiores com potencial na reabilitação de áreas degradadas.

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar a densidade e a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) em simbiose com *Phaseolus vulgaris*, utilizando solos oriundos de áreas com diferentes estratégias de manejo do solo reconstruído após a mineração, na Bacia Carbonífera Catarinense. Os objetivos específicos foram: i) verificar a ocorrência de β -proteobactérias nas áreas reconstituídas após a mineração de carvão à céu aberto; ii) estabelecer relação entre o grupo de diazotróficos predominante em

cada área e o manejo empregado após a reconstituição do solo, e; iii) avaliar a capacidade da leguminosa *Phaseolus vulgaris* atuar como plantas-isca na obtenção de isolados de diazotróficos simbiontes.

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. O carvão mineral e o processo de mineração

O carvão mineral é uma rocha sedimentar combustível formada pela mistura e deposição de componentes orgânicos sólidos, fossilizados ao longo do tempo. Sua qualidade, a qual define seu valor econômico é determinada pelo conteúdo de carbono, o qual varia de acordo com o tipo e estágio de deposição dos componentes orgânicos. A turfa constitui um dos primeiros estágios de deposição do carvão e possui baixo conteúdo carbonífero, com teor de carbono de aproximadamente 45 %. O linhito possui conteúdo carbonífero que varia de 60 a 75 %. O carvão betuminoso ou hulha, amplamente utilizado como combustível contém de 75 a 85 % de carbono. Já o antracito, o mais puro dos carvões, apresenta conteúdo carbonífero superior a 85 % (BP, 2008).

De maneira semelhante, os depósitos de carvão mineral variam de camadas relativamente próximas à superfície do solo e de fácil extração e, conseqüentemente de baixo custo, até camadas profundas muitas vezes com litologia complexa, o que dificulta a extração e incrementa os custos de extração.

O carvão corresponde atualmente a cerca de 8 % de toda energia consumida no globo e é responsável pela geração de aproximadamente 39 % da energia elétrica. Atualmente o carvão continua sendo uma importante fonte de energia. Dentre os motivos que destacam sua importância no cenário energético mundial estão (BP, 2008):

i) Abundância de reservas - o carvão é o combustível fóssil com a maior disponibilidade no mundo. As reservas totalizam cerca de 847,5 bilhões de toneladas, quantidade suficiente para suprir a demanda energética por esse produto por mais 130 anos.

ii) Distribuição das reservas - ao contrário do que acontece com a maioria dos combustíveis fósseis, a exemplo do petróleo e do gás natural, as reservas estão amplamente difundidas por todo globo, com ênfase para o hemisfério norte. O carvão mineral pode ser encontrado em 75 países sendo que três deles, Estados Unidos (28,6 %), Rússia (18,5 %) e China (13,5 %) – concentram mais de 60 % do volume total.

iii) Baixo custo e estabilidade no preço - comparativamente a outros combustíveis fósseis e mesmo alguns de origem vegetal, como é o caso do etanol, o carvão mineral apresenta um baixo custo de exploração e pequena oscilação de preços ao longo do tempo. Mesmo em tempos de crise a exploração se dá de maneira constante e sofre menos com ações de cunho especulativo e político, o que é evidenciado principalmente quando se trata de petróleo e gás natural.

Embora as fontes renováveis de energia, como eólica solar e biomassa venham ganhando espaço no cenário mundial nos últimos anos, o carvão mineral deverá continuar sendo o principal insumo para produção de energia elétrica, com ênfase nos países em desenvolvimento (AIE, 2007). Mas, para que isso ocorra de maneira equilibrada, é preciso avançar em alguns aspectos da cadeia produtiva, visando atender a alguns requisitos básicos aos quais a indústria de exploração carbonífera deve se adequar, tais como:

- i) Melhorar a eficiência de conversão;
- ii) Reduzir impactos ambientais, principalmente no tocante a emissão de dejetos e poluentes;
- iii) Aumentar a competitividade frente às fontes de energia já consolidadas no mercado, principalmente aquelas que detêm capital especulatório (e.g. petróleo).

No Brasil as principais reservas de carvão mineral estão localizadas no Sul do País, notadamente no Estado do Rio Grande do Sul, que detém mais de 89 % das reservas nacionais, sendo que em uma única reserva, a de Candiota, está localizado 38 % do carvão brasileiro. Em 2002, as reservas nacionais de carvão giravam em torno de 12 bilhões de toneladas, correspondendo a mais da metade das reservas Sul-americanas e a 1,2 % das reservas mundiais (BP 2008).

Apesar de ser em geral uma fonte de custo relativamente baixo, o uso energético do carvão mineral no Brasil é ainda bastante restrito, tomando parte de apenas 6,6 % da matriz energética nacional. A depreciação e o baixo aproveitamento do produto ocorrem principalmente por fatores físico-químicos relacionados aos altos teores de cinza e enxofre, da ordem de 50 % e 2,5 %, respectivamente (BRASIL, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2003).

O carvão mineral se constitui em dois terços dos recursos energéticos não-renováveis nacionais, dos quais Santa Catarina detém 4,3 bilhões de toneladas de reserva o que corresponde a 10 % do total do país (SANCHEZ & FORMOSO, 1990). No Estado de Santa Catarina a exploração de carvão é feita em minas subterrâneas e a céu aberto.

O tipo de exploração é dependente da litologia e do grau de deposição do resíduo. Outro fator secundário é a que influencia é a disponibilidade de equipamentos e mão-de-obra especializada para a extração do minério. Levando em consideração essas ponderações, a exploração de carvão mineral pode se dar à céu aberto ou em lavra subterrânea.

A extração a céu aberto inicia com a remoção da cobertura vegetal, solo, rochas, material inerte e outros, sobrejacentes à camada de carvão depositada. Geralmente esse método é o preferencial, quando a camada de carvão depositada está próxima à superfície.

A exploração com lavra subterrânea exige a perfuração ao longo do perfil do solo, com a abertura de galerias inclinadas com câmaras apoiadas em pilares (KOPPE & COSTA, 2002). Geralmente são utilizados explosivos e as camadas de solo superficial são removidas separadamente do substrato sobrejacente ao depósito de carvão (camada estéril), sendo dispostos em pilhas em superfície. O carvão é retirado e posteriormente lavrado. O método de lavra subterrânea é o mais utilizado em Santa Catarina.

A resolução 001 de 23/01/1986 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), que institui a obrigatoriedade de EIA/RIMA (Estudo de Impacto Ambiental/Relatório de Impacto Ambiental) para licenciamento desse tipo de empreendimento, exige que as camadas de solo e substrato sobrejacente às camadas de carvão sejam retiradas e dispostas em pilhas separadas. Após a retirada do carvão, a cava deve ser preenchida com o resíduo piritoso e com os fragmentos das rochas sobrejacentes, recobrindo-os com parte do regolito. A última camada depositada deveria ser o solo vegetal proveniente do material estocado. Por fim, é recomendada a drenagem do terreno e a semeadura de espécies vegetais para fixação do solo.

1.1.2. Impactos ambientais passivos da exploração de carvão

Ambos os métodos de exploração do carvão mineral acarretam problemas ambientais, pois modificam a estrutura do meio natural, pela disposição inadequada dos rejeitos da mineração, causando contaminação de águas superficiais e subterrâneas, promovendo alterações na atmosfera ao redor das minas pela geração de gases e poeiras e perda do solo fértil (SANCHEZ & FORMOSO, 1990).

Um dos problemas mais sérios é o da drenagem ácida, um evento químico de oxidação da pirita (FeS_2), que libera íons hidrogênio e acidifica o solo e os mananciais (LEDIN & PEDERSEN, 1996), o que resulta em comprometimento do desenvolvimento da maioria das espécies vegetais superiores, pelo baixo potencial de estabelecimento das mesmas nessas

áreas. Os altos níveis de acidificação do solo resultantes da oxidação da pirita provocam dissolução de alguns minerais, elevando a concentração de Al, Mn e de outros metais pesados a níveis tóxicos e promovendo forte lixiviação de bases (BARNISHEL et al., 1982; LEDIN & PEDERSEN, 1996). Isso afeta de forma negativa as estratégias de re-vegetação das áreas exploradas, resultando em grandes parcelas de solo desnudo, baixo estabelecimento de espécies florestais e de gramíneas, erosão em sulcos e assoreamento dos cursos de água adjacentes.

O desenvolvimento de microrganismos, principalmente de bactérias fica comprometido pelo efeito direto do pH (LEDIN & PEDERSEN, 1996; CASTRO-SILVA, 2003), que traz consigo efeitos indiretos, como a escassez de nutrientes essenciais na solução do solo, a exemplo do fósforo (ERNANI, 2008), e a competição com outros microrganismos, principalmente com fungos nativos do solo.

No entanto, os diferentes sistemas de manejo do solo e de recomposição utilizados pelas mineradoras, aliados às dificuldades de fiscalização, levam as áreas à degradação em diferentes níveis, mesmo após serem recompostas. A contaminação das camadas superficiais com resíduo piritoso pode atingir graus elevados e tornar-se o maior entrave as ações conservacionistas de solo e de vegetação (CAMPOS, 2000).

Hoje cerca de 6.000 ha que direta ou indiretamente foram afetados pela atividade mineradora se tornaram terras improdutivas. Concomitantemente com o problema da degradação do solo, acontece a degradação dos mananciais hídricos causando preocupante redução da disponibilidade de água potável para a população da região. Esse ciclo vicioso de degradação solo, água e ar se traduz pela aceleração do processo de perda do solo superficial por meio de erosão hídrica e eólica, com decréscimo acentuado do conteúdo de matéria orgânica e, conseqüentemente, aumento da liberação de dióxido de carbono para a atmosfera.

1.1.3. O papel do nitrogênio nos ecossistemas

O nitrogênio é um macronutriente essencial ao desenvolvimento das plantas superiores. As culturas de interesse agrônômico e florestal geralmente necessitam de quantidades superiores a $100 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ desse elemento para a manutenção do seu metabolismo, bem como para o seu crescimento e reprodução. O nitrogênio, corresponde a cerca de 78% da atmosfera, mas apenas 0,04 % do N total existente no globo se encontra nas formas combinadas orgânicas e inorgânicas nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Os animais, os vegetais e a maioria dos microrganismos dependem dessa pequena parcela de N

nas formas combinadas, pois o N atmosférico não está disponível nutricionalmente a todos os eucariotos (incluindo as plantas) e à maioria dos procariotos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Além da escassez de N nas formas combinadas, o dispêndio energético para a produção de adubos nitrogenados em escala industrial é altíssimo. Além das elevadas quantidades de energia (combustíveis fósseis, etc.), esse processo demanda altos níveis de temperatura e pressão. Isso resulta em um alto custo operacional e de produção, tornando-se um dos fatores limitantes ao desenvolvimento dos sistemas agrícolas e agroflorestais, bem como de estratégias de recuperação de áreas degradadas, tais como as de mineração de carvão.

Apenas uma pequena parcela dos procariotos consegue reduzir o N₂ atmosférico para a forma inorgânica combinada NH₃ (amônia), assimilável pelas plantas. Esses organismos são denominados fixadores de nitrogênio ou diazotróficos e o processo do qual são mediadores é chamado de “Fixação Biológica de Nitrogênio” - FBN (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

1.1.4. Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL)

Os benefícios promovidos pelo crescimento de plantas leguminosas no solo vêm sendo observados desde os tempos pré-cristãos. Teofrasto, que viveu no século 3 a.C., descreve uma leguminosa, conhecida como fava (*Vicia sativa*) utilizada pelos gregos para enriquecer o solo. No início do século XIX, Sir Humphry Davy escreveu no jornal "*Agricultural Chemistry*" que também as leguminosas ervilha e feijão ajudavam a preparar a terra para a posterior semeadura do trigo, e que o azoto que essas plantas absorviam parecia ser de origem atmosférica.

É sabido que em locais onde plantas leguminosas são cultivadas, algum nitrogênio pode ser liberado no solo, pela decomposição da palha, tornando-se disponível para outras culturas e isso poderia explicar a origem do nitrogênio absorvido pelo trigo. Hoje em dia, é rotina a realização de rotação de culturas de leguminosas com outras plantas de interesse agrícola não leguminosas, a exemplo da rotação de feijão com milho ou da rotação milho, soja e trigo.

Durante muitas décadas se imaginou que todas as bactérias capazes de nodular leguminosas eram pertencentes à família Rhizobiaceae. Até o início da década de 1980 apenas seis espécies haviam sido descritas, todas pertencentes ao gênero *Rhizobium*. O avanço da

Biologia Molecular e o estudo de novas simbioses possibilitaram a descrição de novas espécies. Hoje são conhecidos 13 gêneros, com um total de 54 espécies descritas.

As técnicas moleculares e de microscopia possibilitaram aos pesquisadores a expansão do conhecimento sobre a real diversidade das BFNNL. Até o ano de 2001, acreditava-se que as bactérias capazes de nodular leguminosas estavam restritas à classe das α -proteobactérias. Atualmente sabe-se que membros da classe γ -proteobacteria, especificamente *Pseudomonas* (SHIRAISHI et al., 2010) e β -proteobactéria, particularmente dos gêneros *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001; SHIRAISHI, 2010) e *Cupriavidus* (sin. *Ralstonia* ou *Wautesia taiwanensis*) (CHEN et al., 2001) podem estabelecer simbiose com essas plantas. Chen et al. (2005), trabalhando com isolados do Brasil e da Venezuela e utilizando plantas do gênero *Mimosa* como iscas, provaram que estirpes de *Burkholderia* sp. formam simbiose de forma efetiva com leguminosas, e que o gênero *Mimosa* tem uma afinidade particular para nodulação com essas estirpes.

Genótipos de *Burkholderia* e *Cupriavidus* formaram nódulos e fixaram nitrogênio em *Mimosa pigra* e *Mimosa pudica* em três locais na Costa Rica, e essa simbiose resultou em um significativo aumento no crescimento das plantas e na atividade da nitrogenase, quando comparado ao desempenho das plantas inoculadas com estirpes de *Rhizobium* (α -proteobacteria) (BARRET & PARKER, 2006).

As β -proteobactérias ocorrem em ambientes onde a maioria α -proteobactérias têm estabelecimento ou desenvolvimento dificultado ou simplesmente não ocorrem. A presença de β -proteobactérias em ambientes extremos (CHEN et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; REIS-JÚNIOR et al., 2010; CHIEN et al., 2010), tanto por condições edáficas, como climáticas ou mesmo em ambientes onde foram depositados rejeitos tóxicos e metais no solo, leva à suposição de que essas bactérias diazotróficas possam ocorrer em áreas degradadas, como os solos reconstruídos após a mineração de carvão, em Santa Catarina.

Sugere-se que as β -proteobactérias tenham adquirido os genes *nod* responsáveis pela nodulação, das α -proteobactérias. Tendo em vista que as seqüências β caem em duas classes diferentes, é provável que essas estirpes de β -proteobactérias, como as que nodulam *Mimosa* spp. tenham adquirido seus genes *nod* via múltiplas transferências horizontais de genes de α -proteobactérias (MOULIN et al., 2001).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma planta arbustiva, anual, que pode apresentar crescimento determinado ou indeterminado, com hábito ereto, semi-ereto, trepador ou semi-trepador. É importante na dieta humana, principalmente para a população de baixa renda, devido ao elevado conteúdo de proteínas (teor varia de 20-30 % no grão), com baixo

custo. É uma das leguminosas mais estudadas quanto à capacidade de estabelecimento de simbiose com bactérias fixadoras de N.

A promiscuidade do feijoeiro em relação à nodulação é evidenciada pelo fato de estabelecer simbiose efetiva com uma gama diversificada de microsimbiontes (HERRERA-CERVERA et al., 1999). A diversidade de diazotróficos nodulando o feijoeiro comum é consideravelmente maior do que em outras leguminosas, a exemplo da soja (ALBERTON et al., 2006). Isolados de *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. etli* (ANDRADE et al., 2002; MOSTASSO et al., 2002; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003; GRANGE & HUNGRIA, 2004), *R. giardinii* (MOSTASSO et al., 2002), *Sinorhizobium* spp., *Mesorhizobium* spp. (GRANGE & HUNGRIA, 2004), e *Bradyrhizobium* (HUNGRIA et al., 1993), *Burkholderia phymatum* (TALBI et al., 2010), *Burkholderia nodosa* (WONG-VILLARREAL & CABALLERO-MELLADO, 2010), assim como outros isolados que podem representar novas espécies (GRANGE & HUNGRIA, 2004; STOCCO et al., 2008), em simbiose com *Phaseolus vulgaris*, vêm sendo descritos.

Um dos fatores preponderantes para isso é a alta diversidade de moléculas sinal emitidas pelas raízes do feijoeiro, principalmente flavonoides, os quais atuam como agentes quimiotáxicos, enviando sinais para um amplo espectro de diazotróficos do solo, quando comparado com a soja e outras leguminosas (tabela 1). Essas moléculas sinais atuam como indutores dos genes *nod* responsáveis pela nodulação, sendo conhecidos como fatores *nod*. Os genes *nod* (nodulação) são encontrados na bactéria, sendo responsáveis pela produção das proteínas que recebem o sinal químico da planta hospedeira (os flavonóides) e pela produção das enzimas que sintetizam o fator de nodulação.

Tabela 1. Identificação dos flavonoides indutores de genes *nod* em soja e feijoeiro (HUNGRIA & ARAUJO, 1995).

Simbionte	Flavonóide	Nome comum
Soja	7,4-di-hidroxi-isoflavona	Daidzeína
	5,7,4-tri-hidroxi-isoflavona	Genisteína
	4,2,4-tri-hidroxi-chalcona	Isoliquiritigenina
Feijoeiro	3-0-glucosídeos de 3,5,7,3,4,5-hexa-hidroxi-flavilium	Delfinídia
	3,5,7,4,5-penta-hidroxi-flavil	Cianidina
	3,5,7,4-tetra-hidroxi-flavil	Malvidina
	3-0-glucosídeos de 3,5,7,3, 4,5-hexa-hidroxi-flavona	Miricetina
	3,5,7,3,4-penta-hidroxi-flavona	Quercetina
	3,5,7,4-tetra-hidroxi-flavona	Kampeferol
	5,4-di-hidroxi-isoflavona-7-0-glucosídeo	Genisteína-7-0-glucosídeo
	5,7,3,4-tetra-hidroxi-flavona	Eriodictiol
	5,7,4-tri-hidroxi-flavona	Naringenina

No processo da formação de nódulos em plantas leguminosas, induzidos por bactérias diazotróficas simbiotes são considerados, além dos genes *nod*, outros três grupos de genes: *NOD*, *nif* e *fix*. Os genes *NOD* são encontrados na planta leguminosa, sendo responsáveis pela síntese de proteínas denominadas nodulinas. As nodulinas desempenham papel importante na formação e manutenção do nódulo radicular. O exemplo mais conhecido de nodulina é a leghemoglobina, produzida pelas células vegetais da região central do nódulo.

Os genes *nif* são responsáveis pela síntese do complexo nitrogenase, enquanto os genes *fix* produzem as moléculas que regulam o processo de fixação. Um exemplo é o gene *fixX* que codifica para a produção de ferridoxina nos diazotróficos.

O gene *nifH* é o gene funcional mais amplamente estudado e utilizado para estudos filogenéticos em diazotróficos simbiotes (HERRERA-CERVERA et al., 1999.; GRANGE et al., 2007; LEI et al., 2008; ESTRELA et al., 2009; ZHAO et al., 2010; SHIRAIISHI et al., 2010). Os estudos filogenéticos utilizando esse gene geralmente são realizados em conjunto com os estudos de genes estruturais (e.g. 16S) (TAN et al., 1999; MANDHI et al., 2002).

1.1.5. Estratégias de recuperação de áreas degradadas pelo processo de mineração

Os processos biológicos e bioquímicos mediados pela comunidade microbiana do solo como a fixação do N₂, a nitrificação, a mineralização da matéria orgânica do solo, a amonificação, entre outros, são de fundamental importância na recuperação dos solos degradados e na manutenção da qualidade e produtividade dos solos (CATELLAN &

VIDOR, 1990). O tamanho e a atividade da microbiota do solo são influenciados por fatores físicos (temperatura, umidade, aeração, luz), fatores químicos (pH, disponibilidade de nutrientes, salinidade, etc.) e fatores biológicos (competição, associação, antagonismo, parasitismo, etc.) que por sua vez sofrem modificações em função da forma de uso e manejo do solo (TSAI et al., 1992, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Devido à sensibilidade da microbiota do solo às modificações nas condições químicas e físicas do solo, os parâmetros microbiológicos e bioquímicos edáficos são apontados como bioindicadores potenciais da qualidade do solo (PANKHURST & LYNCH, 1994).

A matéria orgânica do solo modula a estrutura do solo, influenciando na capacidade de retenção e de infiltração de água e, algumas vezes, tendo efeitos indiretos sobre a porosidade e o grau de compactação do solo. A conservação ou a melhoria da sua qualidade é vital para a sustentação da atividade produtiva. A associação entre espécies de leguminosas com gramíneas, dentre outras, pode ser uma alternativa para manter satisfatórios os níveis de MOS e aumentar o índice de sobrevivência de plantas superiores, tanto pelo estabelecimento de espécies arbóreas, como de outras espécies vegetais arbustivas ou rasteiras, beneficiadas pelo nitrogênio advindo da fixação biológica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A deposição das folhas e o crescimento das raízes estabilizam o solo, aumentam sua atividade biológica e criam condições propícias para o estabelecimento de outras espécies de plantas mais exigentes. Além disso, o solo de áreas degradadas colonizadas por leguminosas capazes de se associarem com BFNNL apresenta maior diversidade e biomassa em relação aqueles não possuem espécies vegetais que formam associação com BFNNL (CAMPELLO, 1998).

Embora sejam conhecidos os efeitos desastrosos da deposição de resíduos da mineração do carvão sobre a superfície do solo ou, ainda, da recomposição inadequada das áreas mineradas para a poluição do ar atmosférico e dos mananciais hídricos, existem escassas informações acerca do resultado das tentativas de recomposição do solo e da vegetação nas áreas exploradas pela mineração de carvão, principalmente a médio e longo prazo, em Santa Catarina. Entre os trabalhos realizados no estado acerca desse tema destacam-se os de Pfadenhauer e Winkler (1978), Citadini-Zanette (1982), Citadini-Zanette e Boff (1992), Boff et al. (2000), Citadini-Zanette (1999), Campos (2000), Santos (2003), Santos et al. (2004), Remor (2004), Martins (2005) e Klein et al. (2005) e Neto (2006).

Pfadenhauer & Winkler (1978) estudaram a vegetação em áreas de deposição de rejeitos de mineração em Siderópolis, SC, abordando aspectos do relevo e do solo. Este

estudo forneceu uma breve lista das espécies encontradas, limitando-se à quantificação do crescimento e do desenvolvimento de *Eucalyptus* spp.

Citadini-Zanette (1982) realizou levantamento expedito da vegetação nativa espontânea em áreas mineradas a céu aberto, em Siderópolis, SC. Relacionou 69 espécies, incluindo herbáceas, arbustivas e arbóreas. Citadini-Zanette & Boff (1992) realizaram estudos florísticos e fitossociológicos em áreas mineradas a céu aberto no município de Siderópolis, SC. Descreveram e ilustraram 97 espécies nativas, seguidas por observações ecológicas, fenológicas e de importância econômica, quando conhecida.

Citadini-Zanette (1995) estudou a florística, a fitossociologia e aspectos da dinâmica de um remanescente de mata atlântica na microbacia do Rio Novo, município de Orleans, SC. Foi o primeiro levantamento completo em floresta primária da região, demonstrando a grande diversidade e riqueza específica para a Floresta Ombrófila Densa.

Citadini-Zanette (1999) apresentou um histórico da recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão no Sul de Santa Catarina, descrevendo os projetos implementados na região carbonífera e as tendências atuais para recuperação de áreas degradadas. Nesse trabalho o autor ressalta a importância e a necessidade de estudos experimentais visando o crescimento e desenvolvimento das espécies e salienta que muitas ações foram realizadas para impulsionar a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão, principalmente pela lavra a céu aberto.

Atualmente, muitos locais iniciaram o processo com a ajuda do homem ou pela própria natureza. No entanto, restam ainda extensas áreas a recuperar que devem ser objeto de planejamento dentro de critérios que contemplem ações imediatas e efetivas que favoreçam a resiliência, principalmente de processos biológicos nas áreas afetadas.

Boff et al. (2000) avaliaram as espécies arbóreas introduzidas em blocos experimentais instalados no Projeto M - Recuperação Piloto de Áreas Mineradas a Céu Aberto, implementado nos anos de 1981 e 1982, na localidade Alto Rio Fiorita, município de Siderópolis, SC. Este projeto foi a primeira tentativa planejada para recuperar áreas de mineração a céu aberto na região carbonífera, caracterizado como marco inicial do processo para a região.

Campos (2000) avaliou o impacto de três diferentes processos de reconstrução do solo após a mineração de carvão à céu aberto, no município de Lauro Muller, SC, sobre algumas propriedades químicas, físicas e mineralógicas do solo. Relata que a Mina do Apertado sofreu uma reconstrução deficiente, provavelmente devido à disposição inadequada dos resíduos da atividade mineradora. Verificou também impactos negativos nas propriedades físicas e

químicas do solo nessas áreas. A autora afirma que os processos de construção de um solo devem ser avaliados, para que se possa evitar a contaminação das camadas superficiais do solo construído com os resíduos do carvão e para que sejam determinadas as influências destes processos sobre os atributos físicos dos mesmos (CAMPOS et al., 2003).

Mendonça (2002) concluiu que a utilização de calagem e adição de esterco animal aumentou os teores de carbono da biomassa microbiana e melhorou as características biológicas do solo reconstruído, em pesquisa realizada na Mina do Apertado, em Lauro Muller, SC.

Visando à reabilitação de ecossistemas degradados pela mineração de carvão a céu aberto em Santa Catarina, Santos (2003) cita 125 espécies de Magnoliophyta arbustivo-arbóreas distribuídas em 94 gêneros e 44 famílias, com indicação das categorias sucessionais, síndrome de polinização e de dispersão, além de informações sobre floração e frutificação das espécies amostradas em dois fragmentos florestais, em estágio médio e avançado de regeneração natural.

Santos (2003) estudou ainda a vegetação espontânea sobre pilhas de estereis da mineração de carvão a céu aberto na região sul catarinense, onde selecionaram áreas em que ocorreu regeneração, sendo amostradas 83 espécies pertencentes a 28 famílias botânicas. Foi ressaltada a necessidade de intensificar pesquisas aplicadas à reabilitação ambiental na região carbonífera, principalmente na adequação de espécies vegetais aos solos construídos após a mineração (SANTOS et al. 2004). Remor (2004) avaliou aspectos da regeneração natural que ocorreu sob plantio de *Mimosa scabrella* Benth. (bracatinga), em áreas de mineração a céu aberto.

Santos et al. (2004) trazem métodos adotados em mapeamento geológico geotécnico de áreas degradadas pela mineração de carvão, que fornecem um retrato das condições físicas do local e subsídios para proposição de medidas de reabilitação. Lopes et al. (2004) demonstraram que o processo de contaminação de solos, devido à degradação ambiental em áreas de mineração a céu aberto para extração de carvão é, sem dúvida, um sério problema na região da Depressão Carbonífera Catarinense. Demonstraram ainda, a influência de diferentes tipos de cobertura vegetal e da aplicação de agentes alcalinizantes no solo, sobre a drenagem ácida de mina, causada pela oxidação da pirita (GALLATO et al., 2007).

A mitigação dos impactos causados pela exploração de carvão depende da efetividade das medidas de reabilitação implantadas nessas áreas, as quais, por sua vez, devem ser propostas com base em diagnóstico ambiental preciso que possibilite o entendimento dos processos geoquímicos, bioquímicos e físicos, além da caracterização estrutural do local

pesquisado. Estudos sobre regeneração também fazem-se necessários para caracterizar o desenvolvimento de espécies vegetais em áreas degradadas pela mineração de carvão.

Martins (2005) realizou estudo florístico e fitossociológico em um remanescente florestal periférico a áreas mineradas, enfatizando a probabilidade de encontros interespecíficos, para gerar subsídios à recuperação ambiental de áreas degradadas pela mineração de carvão a céu aberto no sul do Estado de Santa Catarina.

Klein (2006) realizou um levanto florístico-fitosociológico em quatro zonas distintas, com diferentes processos de reconstrução e re-vegetação, após o processo de mineração, no município de Urussanga, SC. Foram identificadas 113 espécies, pertencentes a 43 famílias botânicas, com predomínio de Magnoliophyta Pteridophyta. Este estudo possibilitou a avaliação do processo de sucessão ecológica após 28 anos. O autor observou que nas diferentes zonas o desenvolvimento é influenciado pelas características do local e pequenas alterações são relacionadas à geologia do local e, conseqüentemente aos atributos do solo.

Neto (2006) avaliou o efeito de corretivos de acidez (calcário dolomítico e Dregs) com relação à correção do solo e à disponibilidade de nutrientes em solos reconstruídos após mineração de carvão a céu aberto, na mina do Apertado, município de Lauro Muller, SC. Avaliou também atributos físicos do solo como estabilidade dos agregados, densidade, porosidade, granulometria e disponibilidade de água.

Correia (2010) avaliou a densidade, abundância e riqueza da macro e da mesofauna do solo por diferentes métodos de amostragem e em diferentes épocas, e sua relação com os atributos químicos do solo. As ordens mais abundantes na média das amostragens da macrofauna, nas áreas reconstruídas foram Hymenoptera e Oligochaeta. Os grupos mais abundantes da mesofauna foram Acarina e Hymenoptera, sendo que a densidade de ácaros, foi alta em todas as áreas. Ao final, concluiu que a fauna e seus atributos podem ser monitorados e utilizados como bioindicadores da qualidade do ambiente em áreas com solos reconstruídos após a mineração de carvão.

Como observado, a maioria dos trabalhos de levantamento e das estratégias de recuperação das áreas afetadas pela mineração de carvão em Santa Catarina, levam em consideração principalmente atributos químicos e físicos do solo, ecologia da paisagem e estabelecimento de espécies pioneiras arbóreas. Nenhum estudo apresentou dados evidenciando a importância das BFNNL no processo de recuperação do solo e da paisagem ou como bioindicadores da qualidade do solo.

Estratégias de recuperação de áreas degradadas utilizando bactérias fixadoras de N_2 consistem em alternativas ecologicamente corretas, resultando em redução significativa dos

custos energéticos e financeiros, quando comparados à utilização de adubos na forma mineral. Além disso, a biodiversidade do solo é geralmente incrementada nas áreas onde esses microrganismos atuam.

Isso faz com que os diazotróficos adquiram importante papel nos diferentes estádios de sucessão ecológica e na manutenção do equilíbrio dinâmico dos ecossistemas terrestres, sendo de fundamental importância conhecer sua diversidade genética e características morfofisiológicas, para que no futuro possam ser selecionados os microrganismos mais eficientes no processo de FBN. Isso poderá resultar na produção de inoculantes bacterianos, que poderão ser aplicados nessas áreas, formando simbiose ou associação efetiva com espécies de leguminosas e outros, importantes no processo de recuperação do solo afetado pela ação antrópica.

1.1.6. Métodos de avaliação da abundância e diversidade de microrganismos no solo

As medidas de abundância e diversidade microbiana em áreas de mineração de carvão e alguns ecossistemas agrícolas catarinenses, ainda são incipientes. Estudos que envolvam o levantamento da diversidade de procariotos em ambientes naturais ou impactados são importantes para o entendimento e compreensão dos processos ecológicos que governam o seu funcionamento e do papel funcional dessa diversidade. Além de identificar alterações ambientais associadas a distúrbios, esses estudos aumentam o conhecimento sobre os recursos genéticos disponíveis e sua distribuição geográfica.

1.1.6.1. Ocorrência e abundância

O solo pode conter até mais de 10^{12} células bacterianas por grama de solo, se determinado por técnicas de microscopia. Muitas dessas bactérias não são cultiváveis seja em meios comuns com ágar ou em meios seletivos complexos e nunca foram identificadas por devido aos seus requerimentos estenobióticos em relação à composição do meio, presença de fatores específicos de crescimento (e.g. vitaminas) ou condições ambientais favoráveis (pH, pO_2 , umidade, etc.). Assim, o número real de certo grupo de bactérias, actinobactérias e mesmo de fungos não pode ser obtido usando meios com base em ágar. As contagens nesse tipo de meio geralmente cobrem de 0,1 a 10 % (excepcionalmente 50 %) do número total de propágulos observados com técnicas especiais de microscopia (LORCH et al., 1995).

A contagem em placas é amplamente utilizada para contagem de células em preparo de inoculantes microbianos. Além da contagem em placas, a abundância populacional de grupos funcionais de bactérias pode ser estimada pelo número mais provável (NMP), sem que seja necessária a contagem de células individuais ou colônias. Esse método é baseado na presença ou ausência de bactérias usando uma série de diluições em um meio seletivo, em tubos ou frascos contendo uma solução nutritiva especial, de acordo com as exigências de cada grupo de microrganismo. Um pré-requisito para a utilização deste método é o de que os microrganismos a serem enumerados seletivamente devam ser capazes de produzir alguma característica metabólica (e.g. produção de gás) ou um produto que possa ser detectado facilmente por um reagente específico ou mesmo uma estrutura modificada que possa indicar a presença de tal microrganismo no meio ou na solução (e.g. formação de nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de plantas leguminosas). Os dados obtidos são comparados com tabelas de probabilidades (MEYNELL & MEYNELL, 1965; DE MAN, 1983; SOMASEGARAM & HOBEN, 1985)

Essas técnicas podem ser usadas comparativamente a técnicas mais avançadas como as de biologia molecular (e.g. PCR em tempo real), mas deve ser levado em consideração que esses métodos indiretos de avaliação da abundância microbiana geralmente resultam em valores subestimados (BOONEN et al., 2010). Apesar de avaliar a densidade populacional de maneira indireta, essas técnicas podem dar uma ideia inicial desta medida para um grupo específico de microrganismos. Por isso até hoje são usadas, principalmente quando se deseja comparar tratamentos entre si e áreas com diferentes sistemas de manejo.

1.1.6.2. Diversidade fenotípica

A sistemática bacteriana é definida com sendo o processo de caracterização e arranjo da diversidade em uma maneira ordenada, reconhecendo grupos de organismos similares em uma hierarquia, cuja entidade básica é a espécie (DELLAGLIO et al., 2004). De acordo com Cowan (1968), a sistemática inclui a taxonomia e aspectos da ecologia, bioquímica, genética, patologia, biologia molecular e microscopia. No entanto, o termo sistemática é comumente utilizado como sinônimo de taxonomia.

Os estudos de diversidade em procariotos são complexos, uma vez que não existe um consenso dentro da comunidade científica sobre a definição de espécie microbiana (WOESE, 1987; ROSELLÓ-MORA & AMANN, 2001; COHAN, 2002; GEVERS et al., 2005). A

diversidade de microrganismos é o resultado de dois componentes. O primeiro é número de espécies ou riqueza, e o segundo é a abundância relativa de espécies (MAGURRAN, 1988).

Durante muitas décadas, a caracterização de microrganismos ficou restrita a observação de caracteres morfológicos e a descrição de processos fisiológicos e bioquímicos, sendo que a diferenciação entre grupos, gêneros e espécies era por vezes feita de forma arcaica. A descrição de certa espécie de microrganismo, principalmente os causadores de doenças e simbiontes geralmente tinha ligação com a espécie hospedeira. A avaliação de caracteres fenotípicos vem sendo aprimorada principalmente depois dos anos 1960, com experiências e proposições de novos meios de cultura, e a ideia de que os microrganismos poderiam utilizar fontes de C e energia diversificadas, de acordo com o meio onde estivessem sendo cultivados, ou de acordo com pressões exercidas pelo meio (VINCENT, 1970).

As características a serem avaliadas dependem do objetivo, sendo que a produção de exopolissacarídeos, tamanho, formato e velocidade de crescimento das colônias, geralmente estão entre os caracteres observados. Esses estudos trazem respostas significativas na avaliação e seleção de isolados em áreas que sofreram algum tipo de perturbação ou degradação ou, ainda em ambientes extremos (MOHAMED et al., 2000; CHAUDRI et al., 2000; MELLONI, 2006).

A avaliação das características fenotípicas, no caso de bactérias depende de suas exigências nutricionais, como fatores de crescimento (vitaminas, micronutrientes, hormônios, etc.), bioquímicas (pressão osmótica celular, pH, toxicidade por elementos químicos (Pb, Cd, Hg), tolerância a antibióticos, dentre outros.

A caracterização fenotípica pode auxiliar na descrição prévia de microrganismos e no *screening* de isolados de interesse, para posterior caracterização genética ou utilização em ensaios de competitividade entre estirpes contrastantes.

1.1.6.3. Diversidade genética

Análises de diversidade genética microbiana baseadas na extração de DNA direta ou indiretamente do solo têm prometido resolver muitas dúvidas relacionadas ao modo com que a perturbação pode afetar as populações de microrganismos. Uma discussão sobre a evolução desses métodos e os estudos atuais de ecologia molecular microbiana foi feita por Ogram (2000).

Grandes esforços foram empreendidos pelos microbiologistas do solo para identificar os microrganismos que vivem nesse complexo ambiente. Entretanto, a maioria das bactérias

obtidas de amostras ambientais não pode ser cultivada em meios artificiais (AMANN et al., 1995), incorrendo no fato de que apenas pequena porção da comunidade microbiana é avaliada. Estima-se que de 80 a 99 % dos microrganismos do solo permaneçam sem identificação (ALEXANDER, 1977).

O emprego de técnicas de DNA recombinante, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar genes comuns a todos os organismos, possibilita a identificação daqueles até agora desconhecidos. Várias técnicas baseadas na amplificação de regiões do DNA, aleatória ou específica, foram desenvolvidas com o emprego da técnica da PCR e permitem melhor discriminação de microrganismos. O gene comumente amplificado para esse propósito entre os procariotos é o que codifica a região 16S do RNA ribossômico (rRNA) (WOESE, 1987).

Recentes avanços no campo da biologia molecular tornaram possível o desenvolvimento de técnicas de *fingerprint*, com as quais se pode monitorar as comunidades microbianas sem a necessidade de isolamento e cultivo. Esses métodos envolvem a extração de DNA *in situ* da comunidade microbiana ou de isolados microbianos, a amplificação de sequências de interesse e análise de parte da informação genética. A diversidade das sequências amplificadas é visualizada por migração eletroforética diferencial em gel de agarose ou poliacrilamida, baseada no seu tamanho, como no caso do T-RFLP (*terminal-restriction fragment length polymorphism*) e RISA (*ribosomal intergenic spacer analysis*) ou ainda com base na sequência, como no caso do DGGE (*denaturing gel gradient electrophoresis*) ou do TGGE (*thermal gel gradient electrophoresis*).

Essas técnicas chamadas de *fingerprint* provêm perfis de bandas representativos da estrutura genética de uma comunidade como um todo ou parte dela, dependendo dos *primers* selecionados. Esses métodos são ferramentas válidas para a caracterização de comunidades bacterianas complexas e detecção de alterações de padrões em ambientes que sofreram perturbações. Além disso, sua aplicação dispense menor tempo e trabalho, quando comparados as técnicas de clonagem e formação de bibliotecas, tais como SST (*small-subunit rRNA*). Bandas individuais podem também ser cortadas de um perfil de bandas de *fingerprint*, clonadas e seqüenciadas, ou ainda cortadas com enzimas de restrição, possibilitando uma série de informações sobre os grupos filogenéticos que constituem uma comunidade (RANJARD et al., 2000a).

A técnica de RISA-PCR explora a variabilidade no comprimento do espaço intergênico entre a subunidade pequena 16S e subunidade grande 23S do RNA ribossomal. Esse método tem sido usado com sucesso para acessar a estrutura de comunidades bacterianas

no solo (RANJARD et al., 2000b) e para avaliar mudanças no perfil dessas após tratamentos com antibióticos (ROBLETO et al., 1998), *stress* por metais pesados (RANJARD et al., 2000c), e desmatamento (BORNEMAN & TRIPLETT, 1997).

Após a amplificação dos fragmentos, estes podem ser digeridos com enzimas de restrição, como também acontece nas técnicas de ARDRA-PCR e RFLP-PCR, ou podem ser sequenciados, sendo comum a combinação de técnicas de fingerprint, digestão e sequenciamento.

A separação pelos perfis de *fingerprint* do gene ribossomal 16S por si só, pode subestimar os valores de distâncias filogenéticas entre isolados no gel, gerando dificuldades para a separação e definição de grupos. Isso ocorre por que o gene 16S é um gene estrutural altamente conservado, e que varia pouco em termos de número de bases de uma espécie bacteriana para outra. Aliado a esse fato as poucas deleções, adições e trocas de bases geralmente ocorrem em códons internos do gene, e não nos códons das extremidades, que são aqueles geralmente amplificados pelos *primers* externos nas reações de amplificação. Isso pode levar a um resultado de agrupamento filogenético em que isolados diferentes serão agrupados no mesmo *cluster* (GEVERS et al., 2005).

Por isso, nesses casos se justifica a utilização da técnica de RISA-PCR para separar grupos de isolados de diazotróficos, pelo fato de que esta gera uma informação mais concisa e uma separação mais nítida entre *fingerprints*, permitindo sua marcação e posterior agrupamento com maior facilidade, pelo fato de que a distância entre a subunidade ribossomal pequena 16S e a subunidade grande 23S tem uma variação maior entre isolados do que quando se considera apenas a variação de um desses genes separadamente. Além disso, em casos em que não se pode sequenciar os isolados posteriormente, a informação gerada é de grande utilidade, pois se baseia em distância, ou seja, tamanho do espaço intergênico (16S-23S) e não na sequência de bases em si, como no caso do sequenciamento.

As técnicas de sequenciamento têm sido largamente utilizadas, principalmente devido ao fato de que os dados podem ser submetidos a bancos de dados em todo mundo, permitindo a comparação com resultados anteriores. Essas sequências possibilitam também a revisão de sequências já depositadas nesses bancos de dados, bem como a evolução da taxonomia em procariotos pela realocação de microrganismos em grupos diferentes aos que estavam situados e pela divisão de grupos maiores em subgrupos (SPRENT, 2001; YOUNG, 2004).

O principal gene utilizado nas reações de sequenciamento é o gene ribossomal 16S. As razões que justificam a utilização prioritária desse gene são inúmeras. A primeira se refere ao fato de ser um gene universal em procariotos. Aliado a isso, esse gene tem a propriedade de

funcionar como marcador universal ou relógio molecular, pelo fato de ser um gene estrutural com baixa taxa de mutações bem sucedidas. Por isso, o gene se mantém conservado ao longo das gerações, tanto estruturalmente como funcionalmente, transmitindo a informação genética codificada, mesmo em situações em que outros genes do microrganismo sofrem mutações, seja por pressões do meio ou por processo adaptativo evolutivo. Muitas vezes, ainda esses genes são perdidos, por transferência lateral, principalmente quando estão localizados em organelas como os plasmídeos (e.g. genes *nif*) (MOULIN et al., 2001).

Essas propriedades inerentes ao gene ribossomal 16S, possibilitaram a formação de bancos de dados de procariotos em larga escala. Esses bancos de dados surgiram, a princípio, de um esforço na área médica em identificar os agentes causais de doenças que acometem os seres humanos. Depois esses bancos foram se expandindo e hoje abrangem as mais diversas áreas da ciência, chegando até a área de biodiversidade e recursos genéticos, com enfoque em biodiversidade do solo, na qual estão alocados os estudos em diversidade microbiana do solo.

Os principais bancos de dados de procariotos são: o NCBI – *National Council for Biological Information*, que possui várias plataformas com sequências parciais ou completas do mundo todo, tanto de procariotos como de eucariotos. Esse banco de dados possui várias ferramentas que possibilitam a tradução de uma sequência de nucleotídeos em sua sequência esperada de aminoácidos, e vice-versa (Plataforma *Blast*), além de possibilitar o alinhamento e agrupamento de várias sequências. Além disso, possui uma vasta coleção de artigos e livros indexados, que podem ser acessados pelo usuário; O RDP – *Ribossomal Database Project* possui ferramentas semelhantes as da plataforma *Blast* do NCBI, com o diferencial de que o usuário pode montar um banco de dados único para suas próprias sequências depositadas no banco de dados através da plataforma “*My RDP*”. Pode ser feito o alinhamento de sequências e a construção de árvores filogenéticas, comparando as sequências obtidas pelo usuário com aquelas existentes na base de dados; O *Greengenes* é um banco de dados amplamente utilizado e especializado, com uma base de sequências do gene ribossomal 16S, revisadas e filtradas. Por isso, geralmente é utilizado quando se deseja gerar arquivos comparativos entre as sequências obtidas pelo sequenciamento e as constantes nesta base de dados. Os arquivos podem ainda ser exportados em formatos compatíveis com programas especializados na formação de árvores filogenéticas baseadas em sequências de nucleotídeos (e.g. MEGA 5.0).

Esses bancos de dados são de acesso público e estão disponíveis em sítios na rede mundial de computadores, sendo ferramentas de grande utilidade na investigação da diversidade microbiana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCALIZAÇÃO E CLIMA

A área principal de coleta do solo está situada no distrito de Guatá, município de Lauro Muller-SC (coordenadas geográficas: 28°20' S e 49°20' W), sob um Argissolo Vermelho-Amarelo alítico típico. O clima da região é mesotérmico úmido sem período de seca e com verões quentes (Cfa), segundo a classificação de Köppen. A precipitação anual média é de 1400 mm e a temperatura média é de 19 °C.

A estruturação do experimento atualmente constitui-se de um delineamento em blocos ao acaso, com três repetições e parcelas com dimensões de 12,5 m x 9 m, aqui denominadas: Testemunha reconstruída (TR); Calcário (CA); Calcário + *Brachiaria brizantha* (CB); Calcário + cama de aviário + *Brachiaria brizantha* (CCB); Dregs (DR).

A área Fumo/Aveia (FA) é uma área reconstruída após a exploração de carvão, em 1996, que passou a ser manejada com cultivo em sucessão de leguminosas, principalmente feijão (*Phaseolus vulgaris*), gramíneas, com destaque para a aveia (*Avena sativa*), e fumo (*Nicotiana tabacum* = Solanaceae). A área foi reconstruída com solo a montante na mesma topossequência. A adubação na área geralmente ultrapassa a recomendação. Não há informações sobre a quantidade de calcário aplicada nos anos que sucederam a reconstrução do solo. Por tanto todos os comparativos com essa área dão como referencial a análise química realizada (tabela 3), haja vista a dificuldade de obtenção do histórico completo da área.

A área BR também passou pelo processo de reconstrução do solo após a mineração, e desde então é cultivada a gramínea *Brachiaria brizantha* em sistema de monocultivo. A área foi reconstruída em 1996, com solo de um morro adjacente. Esporadicamente é adicionado N em cobertura na forma de uréia. Essa área é próxima à área FA, sendo as duas separadas em aproximadamente 500 m, das demais áreas amostrais.

Além dessas áreas, foram utilizadas uma área de remanescente de mata nativa (MN) e uma área de campo naturalizado (CN), ambos antropizados, como referência.

A área denominada Mina do Apertado passou pelo processo de reconstrução do solo após a mineração de carvão no ano de 1996. Para o processo de reconstrução foi utilizado solo de uma área a montante, de um morro decapado. Em 1999 foi estabelecido um experimento para a avaliação dos atributos químicos e físicos do solo (CAMPOS, 2003). Consequentemente vieram outros trabalhos para a avaliação do efeito da calagem e da

adubação orgânica nas propriedades químicas e sua implicação no estabelecimento de gramíneas (MAÇANEIRO, 2001), avaliação dos atributos biológicos do solo (MENDONÇA, 2002), avaliação dos atributos químicos e correção do solo (NETO, 2006), avaliação da ocorrência e diversidade da fauna do solo (CORREIA, 2010) e avaliação da comunidade de Oligochaetas e sua capacidade bioacumulativa de metais pesados (BORNHAUSEN, 2010).

O solo reconstruído apresenta degradação intensa e erosão hídrica acentuada por escoamento superficial, devido à cobertura vegetal incipiente. Neste processo foram utilizados solo e subsolo de um morro vizinho à área, que foi decapado. A área reconstruída vem servindo de base experimental para estudos científicos sobre a variabilidade espacial de propriedades químicas e físicas do solo (CAMPOS, 2000), do efeito da calagem e da adubação orgânica nas propriedades químicas e no estabelecimento de gramíneas (MAÇANEIRO, 2001), propriedades biológicas (MENDONÇA, 2002) e avaliação de atributos químicos e necessidade de calcário para a elevação do pH do solo, no período de 2001 e 2005 (NETO, 2006).

Em Fevereiro de 2001, foi iniciado o manejo do solo para a implantação do experimento, com escarificação, remoção manual de pedras da área, e incorporação parcial de corretivos, seguida de gradagem para incorporação final de corretivos de acidez (NETO, 2008). Em novembro desse mesmo ano foram aplicados os tratamentos. O aporte de cama de aves constou de dose única (6 Mg ha⁻¹ de peso seco) e a dose de calcário dolomítico (PRNT 100%) para a correção do pH com base no valor SMP (pH = 6,0) foi de 25 Mg ha⁻¹. A testemunha reconstruída foi mantida sem nenhum tipo de adubação. Na instalação do experimento, em toda a área, o solo foi suplementado com N, P e K (66 kg ha⁻¹ de N, 110 kg ha⁻¹ de P₂O₅, 110 kg ha⁻¹ de K₂O), com base na recomendação pela Comissão de Química e Fertilidade da Região Sul (CQFS RS/SC, 1999). A semeadura de gramíneas foi feita à lanço, estipulando uma massa de 6,0 kg de sementes ha⁻¹. A espécie escolhida foi *Brachiaria brizantha*, já que apresentou melhor capacidade de estabelecimento e desenvolvimento do que as espécies *Setaria anceps*, *Axonopus afinis*, e *Paspalum saurea* (MAÇANEIRO, 2001).

Em toda a área experimental, foram transplantadas mudas de *Eucalyptus saligna* em toda a área do experimento, espaçadas entre si de 1,5 x 2,5 m. Em cada cova foram adicionados 40 g de calcário dolomítico. Mesmo após a aplicação de adubos minerais e orgânicos, assim como de corretivos de acidez, a espécie não apresentou desenvolvimento satisfatório, provavelmente devido a um somatório de restrições físicas, químicas e biológicas existentes no solo reconstruído.

Em uma nova tentativa de estabelecer um padrão de sucessão ecológica e recuperar a área, foram reaplicados, em agosto de 2004, os mesmos tratamentos químicos e corretivos de outrora, com a introdução de um novo tratamento que constou da aplicação de Dregs¹ (resíduo alcalino da indústria de papel e celulose). Este resíduo é um excedente do processo de beneficiamento da madeira transformada em papel. Devido à grande quantidade de resíduo que é produzida, este é geralmente descartado em aterros sanitários e, portanto, tem valor comercial insignificante.

Isso poderia se tornar um passivo ambiental importante, mas acabou resultando em uma nova estratégia de correção de acidez do solo, em consórcio, e por vezes em substituição ao calcário, principalmente nas circunvizinhanças de indústrias de papel e celulose. O Dregs foi utilizado como corretivo de acidez do solo, porém cabe informar que este resíduo apresenta elevado teor de óxidos de cálcio, associado ou não a altas concentrações de sódio em sua constituição, podendo prejudicar a estrutura do solo, pela dispersão da fração argila (WALDEMAR & HERRERA, 1986; ALBUQUERQUE et al., 2002).

A calagem foi efetuada com base no valor SMP (pH = 6,0) (SBCS/CQFS - RS/SC, 2004), em dose equivalente a 13 Mg ha⁻¹ de calcário dolomítico, aplicado em superfície. A dose do resíduo Dregs, efetuada a correção da umidade, foi de 0,225 Mg por parcela, equivalente a uma dose de 14 Mg ha⁻¹. O aporte de cama de aves constou novamente de dose única (9 Mg ha⁻¹ de peso seco).

Em agosto de 2004, em todos os tratamentos, exceto na testemunha reconstruída, foram aplicadas as doses de N, P e K correspondentes a 50 kg ha⁻¹ de N na forma de uréia, 110 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato triplo e 110 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio (KCl), à lanço e sem incorporação. Nos tratamentos correspondentes, foram semeados 6 Kg ha⁻¹ de *Brachiaria brizantha*, à lanço e sem incorporação.

Em outubro de 2004 foram transplantadas mudas de *Pinus taeda* e *Eucalyptus saligna*, em todos os tratamentos, em covas de 0,2 x 0,2 x 0,2 m. Em cada cova foram adicionados 72 g de calcário, 0,44 g de P₂O₅ e K₂O e 0,2 g de N. Nas parcelas que continham tratamento com Dregs, a dose de NPK foi misturada a 108 g do resíduo. Tanto os adubos químicos, quanto os corretivos de acidez foram homogeneizados com a matriz do solo. O espaçamento de 1,5 m x

¹ O Dregs é um material sólido de cor escura, sedimentado e removido na clarificação do licor verde. Tem sua formação pronunciada na queima do licor negro no processo de recuperação dos licores residuais gerados no polpeamento da madeira. Este material, após o tanque clarificador de licor verde passa ao tanque de adensamento e é enviado para um filtro tipo tambor para posterior descarte (do inglês Dregs: escória, resíduo, refugo ou sedimento).

2,5 m, totalizando 30 mudas parcela⁻¹, sendo exemplares 15 de *Pinus taeda* e 15 de *Eucalyptus saligna*.

No mês de dezembro do mesmo ano, foram realizadas capinas ao redor das mudas transplantadas. Procedeu-se também o corte raso das gramíneas, devido ao exagerado desenvolvimento inicial, sendo a palhada mantida sobre o perfil do solo nas parcelas experimentais. Uma dose correspondente a 40 kg ha⁻¹ de N em cobertura, na forma de uréia, foi aplicada, à lanço e sem incorporação.

Como era de se esperar em uma área que sofreu um processo de degradação intenso, como consequência do desequilíbrio físico, químico e biológico, passivo da intervenção e exploração antrópica pelo processo de mineração, o panorama experimental da área da Mina do Apertado passou por constantes transformações. Estas foram resultantes das tentativas de elaboração de estratégias por parte dos pesquisadores que ali trabalharam, em corrigir erros passados e acelerar o processo de re-vegetação e estabelecimento de plantas superiores na área.

2.2. COLETA DO MATERIAL AMOSTRAL

Foi coletada uma amostra composta por três amostras simples homogêneas, em cada área supracitada, com auxílio de um trado de rosca, no perfil de 0-10 cm de solo. No momento da coleta foi aferida a temperatura utilizando-se um geotermômetro (tabela 2). As amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis Nasco[®] e acondicionadas em uma caixa térmica, hermeticamente fechada e refrigerada (aproximadamente 4°C). Depois de efetuada a coleta em todos os pontos, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Fauna do Solo do Departamento de Solos e Recursos Naturais do CAV/UDESC, onde foram mantidas sob refrigeração em geladeira industrial (aproximadamente 4°C).

2.3. ATRIBUTOS QUÍMICOS DO SOLO

As amostras de solo para avaliação dos atributos químicos do solo foram coletadas nos mesmo pontos amostrais de onde se retiraram as amostras para avaliação dos atributos biológicos, no perfil de 0-10 cm. Parte do solo foi separada para quantificação do teor de umidade (tabela 2).

Tabela 2. Temperatura e umidade do solo nas áreas amostradas, com três repetições no perfil de 0-10 cm.

Área	Temperatura (°C)	Umidade (%)
Testemunha 1 (TR1)	19,5	22,03
Testemunha 2 (TR2)	18,3	20,98
Testemunha 3 (TR3)	19,1	22,71
Calcário 1 (CA1)	19,3	23,59
Calcário 2 (CA2)	19,2	24,01
Calcário 3 (CA3)	18,7	26,28
Calcário + <i>Brachiaria</i> 1 (CB1)	19,4	24,70
Calcário + <i>Brachiaria</i> 2 (CB2)	19,1	25,33
Calcário + <i>Brachiaria</i> 3 (CB3)	19,2	22,39
Calcário + Cama + <i>Brachiaria</i> 1 (CCB1)	19,5	25,03
Calcário + Cama + <i>Brachiaria</i> 2 (CCB2)	18,3	25,25
Calcário + Cama + <i>Brachiaria</i> 3 (CCB3)	18,6	26,83
Dregs 1 (DR1)	18,6	24,21
Dregs 2 (DR2)	18,8	22,11
Dregs 3 (DR3)	18,4	27,18
Sucessão Fumo/Aveia 1 (FA1)	24,0	26,52
Sucessão Fumo/Aveia 2 (FA2)	24,5	25,10
Sucessão Fumo/Aveia 3 (FA3)	23,7	25,53
Brachiaria Monocultivo 1 (BR1)	24,3	31,47
Brachiaria Monocultivo 2 (BR2)	25,2	31,70
Brachiaria Monocultivo 3 (BR3)	24,7	28,32
Campo Naturalizado 1 (CN1)	22,4	36,90
Campo Naturalizado 2 (CN2)	22,7	40,51
Campo Naturalizado 3 (CN3)	22,8	33,70
Mata Nativa 1 (MN1)	18,2	29,24
Mata Nativa 2 (MN2)	17,8	35,94
Mata Nativa 3 (MN3)	17,5	32,73

Os atributos químicos analisados foram pH em água, pH SMP, Ca, Mg, Al, P, Na, K, Matéria orgânica (M.O.), além do teor de argila (atributo físico) (tabela 3). As alíquotas de Ca, Mg e Al trocáveis foram extraídos com solução neutra de KCl 1 mol L⁻¹. foram extraídos com HCl 0,1 mol L⁻¹. A determinação de Ca, Mg, foi a partir de espectrofotometria de absorção atômica por atomização de chama e o Al por titulometria de neutralização com NaOH. Na e K e P foram extraídos por Mehlich-1 (H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹ + HCl 0,05 mol L⁻¹). A determinação de Na e K foi realizada por fotometria de emissão atômica e P por fotocolometria. Essas análises seguiram o protocolo descrito por Tedesco (1995).

Tabela 3. Atributos químicos do solo reconstruído nas áreas afetadas pela exploração de carvão mineral, na Bacia Carbonífera de Santa Catarina.

Área	pH	SMP	Ca	Mg	Al	H + Al	CTC		V	S	M.O.	Argila	P	Na	K
							efetiva	pH 7,0							
----- cmol _c dm ⁻³ -----									----- % -----		----- mg dm ⁻³ -----				
TR1	3,70	3,70	1,14	0,76	6,00	61,20	8,26	63,46	72,64	3,56	1,40	43,00	10,00	11,00	141,00
TR2	3,80	3,80	0,53	0,21	6,23	54,50	7,20	55,47	86,53	1,74	1,00	30,00	3,40	6,00	89,00
TR3	3,20	3,20	0,20	0,20	10,16	108,60	10,81	109,25	93,99	0,60	0,90	62,00	5,10	5,00	98,00
Média	3,57	3,57	0,62	0,39	7,46	74,77	8,76	76,06	84,39	1,97	1,10	45,00	6,17	7,33	109,33
CA1	6,70	7,10	10,55	6,81	0,00	1,20	17,67	18,87	0,00	93,64	1,70	38,00	5,70	14,00	121,00
CA2	6,40	7,00	7,16	4,96	0,00	1,40	12,37	13,77	0,00	89,86	1,60	33,00	5,80	16,00	99,00
CA3	6,50	7,10	7,97	4,84	0,00	1,20	13,15	14,35	0,00	91,60	1,30	32,00	6,40	12,00	131,00
Média	6,53	7,07	8,56	5,54	0,00	1,27	14,40	15,66	0,00	91,70	1,53	34,33	5,97	14,00	117,00
CB1	6,40	6,90	11,30	7,58	0,00	1,60	23,60	20,85	0,00	92,31	3,60	3,80	5,00	19,00	143,00
CB2	6,60	7,00	9,38	6,21	0,00	1,40	15,91	17,31	0,00	91,91	2,90	46,00	14,30	16,00	125,00
CB3	6,70	7,00	11,38	7,35	0,00	1,40	19,08	20,48	0,00	93,15	2,80	33,00	11,70	15,00	136,00
Média	6,57	6,97	10,69	7,05	0,00	1,47	19,53	19,55	0,00	92,46	3,10	27,60	10,33	16,67	134,67
CCB1	5,90	6,40	4,34	3,08	0,00	1,26	7,96	9,38	0,00	85,16	1,84	35,00	56,38	4,00	90,00
CCB2	6,10	6,5	4,37	2,93	0,00	1,08	7,79	9,13	0,00	87,39	1,72	50,00	26,87	0,00	72,00
CCB3	6,1	6,5	4,81	2,72	0,00	1,12	8,05	10,51	0,00	86,44	1,75	44,00	52,31	5,00	79,00
Média	6,03	6,47	4,51	2,91	0,00	1,15	7,93	9,67	0,00	86,33	1,77	43,00	45,19	3,00	80,33
DR1	6,00	6,80	11,26	0,48	0,00	1,70	12,22	13,73	0,00	87,59	0,90	34,00	2,90	14,00	112,00
DR2	5,30	6,10	0,26	1,86	0,22	3,90	2,68	6,36	8,21	38,64	1,50	46,00	0,10	12,00	132,00
DR3	4,00	3,70	0,20	0,20	6,77	61,20	7,38	61,81	91,73	0,98	1,70	32,00	16,60	7,00	81,00
Média	5,10	5,53	3,91	0,85	2,33	22,27	7,43	27,30	33,31	42,40	1,37	37,33	6,53	11,00	108,33
FA1	6,20	6,90	8,69	6,23	0,00	1,60	15,31	16,80	0,00	90,45	2,40	38,00	6,90	15,00	108,00
FA2	6,90	6,90	9,39	5,13	0,00	1,60	15,54	16,33	0,00	90,23	1,80	38,00	9,60	25,00	84,00
FA3	6,60	6,60	8,31	5,46	0,00	2,20	14,27	16,37	0,00	86,54	2,50	42,00	12,70	16,00	155,00
Média	6,57	6,80	8,80	5,61	0,00	1,80	15,04	16,50	0,00	89,07	2,23	39,33	9,73	18,67	115,67
BR1	5,20	6,10	5,60	2,94	0,00	3,90	8,82	12,65	0,00	69,21	7,30	62,00	5,50	14,00	84,00
BR2	5,20	5,70	6,32	4,06	0,00	6,20	10,72	16,83	0,00	63,13	5,00	69,00	16,10	16,00	95,00
BR3	5,30	6,10	3,71	3,31	0,00	3,40	7,22	11,06	0,00	64,70	2,80	57,00	79,30	15,00	92,00
Média	5,23	5,97	5,21	3,44	0,00	4,50	8,92	13,51	0,00	65,68	5,03	62,67	33,63	15,00	90,33
CN1	4,10	4,20	0,87	0,20	4,68	34,50	5,89	35,71	79,46	3,39	1,30	32,00	0,80	13,00	55,00
CN2	4,10	4,00	1,18	0,20	4,40	43,30	5,95	94,85	73,95	3,46	5,10	24,00	0,30	14,00	68,00
CN3	4,30	4,20	1,82	0,36	3,59	34,50	5,96	36,87	60,23	6,42	3,00	22,00	1,30	12,00	73,00
Média	4,17	4,13	1,29	0,25	4,22	37,43	5,93	55,81	71,21	4,42	3,13	26,00	0,80	13,00	65,33
MN1	3,70	4,10	0,39	0,16	5,62	38,60	9,03	42,01	62,24	8,12	5,00	25,00	11,90	16,00	1118,00
MN2	3,60	3,80	0,26	0,16	5,62	54,50	6,19	55,07	90,79	1,03	3,30	24,00	7,70	9,00	57,00
MN3	3,70	3,70	0,40	0,08	6,56	61,20	7,28	61,92	90,11	1,16	3,60	33,00	8,70	14,00	94,00
Média	3,67	3,87	0,35	0,13	5,93	51,43	7,50	53,00	81,05	3,44	3,97	27,33	9,43	13,00	423,00

* TR - testemunha reconstruída após a mineração de carvão; CA- solo reconstruído com aplicação de calcário; CB - solo reconstruído com aplicação de calcário e sementeira de *Brachiaria brizantha*; CCB - solo reconstruído com aplicação de calcário, cama de aviário e sementeira de *Brachiaria brizantha*; DR - solo reconstruído com aplicação de dregs; FA - solo reconstruído com cultivo em sucessão de fumo/aveia/feijoeiro; BR - solo reconstruído com sementeira de *Brachiaria brizantha*; CN - campo naturalizado; MN - mata nativa.

2.4. ISOLAMENTO DOS DIAZOTRÓFICOS

Para o isolamento das BFNINR foi realizado um experimento em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial de 3x4x5x9, utilizando o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) como planta-armadilha. A cultivar utilizada foi a IPR-88 Uirapuru, do grupo dos feijões pretos, de porte ereto, com hábito de crescimento arbustivo indeterminado. O experimento foi conduzido no mês de abril de 2010.

As sementes foram desinfestadas por submersão, respectivamente, em uma solução de álcool etílico (70 %) por dois minutos e em uma solução de hipoclorito de sódio (1%) por três minutos. Em seguida, foram pré-germinadas em folhas de papel absorvente *Gear Box*[®], umedecidas com água destilada esterilizada, em câmara de fluxo do tipo B.O.D. a 25°C, até que houvesse a protrusão da radícula e a mesma alcançasse 2 cm de comprimento.

As amostras de solo foram submetidas a um processo de diluições sucessivas em solução salina (NaCl 0,85%). Para tanto, 10 gramas de cada amostra de solo foram colocados em erlenmeyer contendo 20 mL da solução diluente, e após a suspensão foi agitada durante 30 minutos, em agitador mecânico, horizontal, a 170 ciclos por minuto. Para a diluição foi transferido um mL da suspensão para um tubo de vidro contendo 9 mL da solução diluente esterilizada, em câmara de fluxo lateral, com quatro repetições. Cada tubo contendo a suspensão diluída (10^1) foi agitado em agitador de tubo tipo “vortex”, durante 30 segundos, antes de realizar as transferências das alíquotas. Para a diluição seguinte (10^2), foi transferido um mL da suspensão diluída 10^1 para um tubo contendo nove ml da solução diluente, agitando por 30 segundos, antes de realizar a próxima diluição. A operação foi repetida até que se obtivessem as diluições desejadas, que neste caso foram de 10^1 a 10^5 , já que se espera que a população de BFNNL seja baixa, devido à perturbação causada pelo processo de mineração e posterior à reconstrução do solo.

As alíquotas de suspensão obtidas foram inoculadas nas plântulas de feijoeiro recém-emergidas, respeitando um limite máximo de 30 minutos entre o processo de diluição e a inoculação, para garantir a viabilidade das células de BFNNL contidas na solução do solo.

Para o cultivo das plantas foram utilizados frascos de vidro âmbar contendo 800 ml de solução nutritiva sem N (SOMASEGARAM & HOBEN, 1985), diluída 2000 vezes que continha em sua solução inicial: 294 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; 136,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 4,47 g L⁻¹ de Fe-EDTA; 6,7 g L⁻¹ de Fe-Citrato; 123,3 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 87 g L⁻¹ de K₂SO₄; 0,338 g L⁻¹ de MnSO₄.H₂O; 0,247 g L⁻¹ de H₃BO₃; 0,288 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ de CuSO₄.7H₂O; 0,056 g L⁻¹ de CoSO₄.7H₂O; 0,048 g L⁻¹ de NaMoO₂.2H₂O.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação com controle de temperatura (25°C durante o dia), e foram colhidas após 23 dias. Na sequência, as raízes com nodulação tiveram seus nódulos destacados, procedendo-se ao isolamento de pelo menos um nódulo por planta, de acordo com o número de morfotipos encontrados. Os nódulos escolhidos foram desinfestados em uma solução de etanol 70% durante 30 segundos e em H₂O₂ por um minuto. Logo após, os nódulos foram macerados com auxílio de uma pinça esterilizada e riscados em placas de Petri contendo meio YM (VINCENT, 1970), com indicador vermelho congo e em pH 6,8 (FRED & WAKSMAN, 1928).

As bactérias foram cultivadas sob temperatura de 28°C em câmara B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*). A partir de dois dias de cultivo, as placas foram avaliadas e as colônias com crescimento típicas desejadas isoladas com o auxílio de uma alça de platina. Foram então repicadas para uma nova placa contendo o mesmo meio. Foram realizados cultivos sucessivos através de isolamento, seleção e plaqueamento, para a obtenção de colônias puras. Os isolados obtidos foram mantidos sob refrigeração a 4°C em meio batata-ágar (pH = 6,8).

2.5. ABUNDÂNCIA DOS DIAZOTRÓFICOS

A abundância de BFNINR foi avaliada pelo Número Mais Provável (NMP), de acordo com a manifestação ou não de nódulos radiculares, após a colheita das plantas de *Phaseolus vulgaris* (ANDRADE & HAMAKAWA, 1995). Para a comparação dos dados foi utilizada a tabela de McCrady, para diluições seriadas e quatro repetições (tabela 4). Os valores discretos de NMP encontrados na tabela foram corrigidos para base de solo seco, de acordo com a tabela 2. Os resultados foram transformados em base logarítmica, para linearização dos dados.

Tabela 4. Exemplo de valores discretos de NMP obtidos da tabela de McCrady. Diluições seriadas com quatro repetições.

Diluição					NMP
10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
3	3	1	0	0	3,406 x 10 ³
4	3	2	1	0	2,693 x 10 ⁴

No exemplo 1 é apresentado um valor de NMP discreto de 3,406x10³, resultante da combinação 3-3-1, sendo a diluição de 10³ a última com aparecimento de nódulos radiculares.

Já no exemplo 2, é apresentado um valor de NMP discreto de $2,693 \times 10^4$, resultante da combinação 3-2-1, sendo a diluição de 10^4 a última com aparecimento de nódulos radiculares.

Após isso, os resultados foram analisados pelo teste de comparação múltipla de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch, com auxílio do programa SAS[®] (SAS Inst., Inc., Cary, NC), à 5% de significância. Esse teste foi escolhido por controlar melhor os erros Tipo I e Tipo II, quando comparado aos testes utilizados habitualmente, como o de Tukey e o de Duncan, que só controlam efetivamente o erro Tipo I. Esse controle de erro mais rigoroso se fez necessário, entre outros motivos, pelo fato de que houve a transformação de uma variável discreta, com apenas alguns valores possíveis, em uma variável logarítmica e com um valor corrigido pela umidade.

2.6. DIVERSIDADE FENOTÍPICA

Após a purificação dos isolados foram avaliadas características morfofisiológicas, como: manifestação do crescimento; tamanho da colônia (mm); produção de muco; consistência da massa de crescimento; detalhes ópticos; forma da colônia; borda da colônia; elevação da colônia; superfície da colônia; alteração do pH do meio; cromogênese da colônia, e; absorção do indicador.

A avaliação foi feita a partir do segundo dia de cultivo em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um microscópio estereoscópio com lente de 40 aumentos, e seguiram até o sétimo dia. As características culturais e suas variáveis foram descritas de acordo com o modelo proposto por Hungria & Araújo (1995).

Foi conduzida a análise de agrupamento (EVERITT, 1974), com base nas características de colônia supracitadas. Os dados foram tabelados através de códigos binários (0 e 1) e a distância de ligação foi obtida pelo método aglomerativo hierárquico do vizinho mais distante (*Complete linkage*). As distâncias obtidas foram de tipo $d = \text{raiz}^2 (1-S)$ e o algoritmo utilizado foi o S de Sokal & Michener ($S_2 = (a+d) / (a+b+c+d)$), citado por Gower & Legendre (1986). As análises foram conduzidas utilizando-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

2.7. DIVERSIDADE GENÉTICA

2.7.1. Extração do DNA bacteriano

As colônias crescidas em meio YM foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para microplacas plásticas (96 poços) contendo 50 ul de H₂O ultra pura esterilizada. A placa foi selada com adesivo estéril e homogeneizada até formar uma suspensão uniforme de células. As células contidas nas placas foram lisadas em um termociclador (Applied Biosystems), a uma temperatura de 100°C por cinco minutos. As placas foram armazenadas a -20°C até a sua utilização nas reações de PCR.

2.7.2. PCR universal do gene ribossomal 16S

Para verificar a viabilidade do material diluído procedeu-se a reação de PCR da região que codifica para o gene ribossomal universal bacteriano 16S, que possui um fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases. Para a reação foram utilizados os *primers* universais Eubacteria 27F *forward*, sequência 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' e 1492R *reverse* 5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'.

Para as reações foram utilizados 2,5 ul de solução buffer 10X; 0,75 ul de MgCl₂ 50 mM; 0,25 ul de dNTP's (ACGT) 10 mM; 1 ul de *primer* 27F 5 pmoles/ul e 1 ul de *primer* 1492R 5 pmoles/ul; 1 ul de solução aquosa de DNA; 0,2 ul de taq polimerase platinum[®] 5U/ul (Invitrogen) e; 18,3 ul de H₂O ultra pura esterilizada; para um volume final de 25 ul por amostra.

As condições de amplificação consistiram de um período de pré-desnaturação a 96°C por 4 minutos; 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos, e; extensão final a 72°C por 10 minutos. Após isso as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C. O produto das reações foi verificado em gel de agarose a 1%, com corrente contínua 100V/90A por 30 minutos, em tampão TSB (BRODY & KERN, 2004).

2.7.3. Presença do gene *nifH*

A presença do gene *nifH*, que codifica para o síntese do complexo nitrogenase foi verificada, utilizando o *primer* M13F *forward*, sequência 5' GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG 3' e o *primer* M13R *reverse* 5' GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG 3', citados por Bürgmann et al. (2004).

Para as reações foram utilizados 2,5 ul de solução buffer 10X; 0,75 ul de MgCl₂ 50 mM; 0,25 ul de dNTP's 10 mM; 1 ul de *primer* M13F 5 pmoles/ul e 1 ul de *primer* M13R 5

pmoles/ul; 1 ul de solução aquosa de DNA; 0,25 ul de taq polimerase platinum 5U/ul Invitrogen[®] e; 18,25 ul de H₂O ultra pura esterilizada; para um volume final de 25 ul por amostra.

As condições de amplificação consistiram de um período de pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 60 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, e; extensão final a 72°C por 10 minutos. Após isso as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C. O produto das reações foi verificado em gel de agarose a 1%, com corrente contínua 100V/90A por 30 minutos, em tampão TSB (BRODY & KERN, 2004).

2.7.4. PCR-RISA dos isolados

Para amplificar a região espaçadora ribossomal intergênica 16S-23S foram utilizados os primers 1490-72F *forward*, sequência 5' TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT 3' desenhado por Normand et al. (1996) e 21-38R *reverse*, sequência 5' TGC CAA GGC ATC CAC CGT 3', desenhado por Garcia-Martínez et al. (1999).

Para as reações foram utilizados 5 ul de solução buffer 5X; 3 ul de MgCl₂ 25 mM; 0,5 ul de dNTP's 10 mM; 1 ul de *primer* 1490-72F 5 pmoles/ul e 1 ul de *primer* 21-38R 5 pmoles/ul; 1 ul de solução aquosa de DNA; 0,2 ul de taq polimerase platinum[®], e; 14,3 ul de H₂O ultra pura esterilizada; para um volume final de 25 ul por amostra.

As condições de amplificação consistiram de um período de pré-desnaturação a 95°C por 5 minutos; 25 ciclos de: desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, e; extensão final a 72°C por 10 minutos. Após isso as amostras eram mantidas sob refrigeração a 4°C.

Para separação dos isolados pelo método de *fingerprint*, foram aplicados 5 ul do produto de PCR em gel de agarose a 3%, com tampão TSB, corante *Gelred*[®], corrente constante de 100V/90A, durante 2,5 horas, utilizando o padrão 100 pb como referência. Os géis foram visualizados em transluminador ultravioleta e fotodocumentados.

As imagens foram exportadas para a plataforma gel 2D do Programa Bionumerics versão 5.1[®] (Applied Maths BVBA, Sim-Martens-Latem, Belgium). As bandas foram marcadas, alinhadas e submetidas à análise do agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância (H:S).

2.7.5. Sequenciamento completo do gene ribossomal 16S

Para a realização do sequenciamento completo do gene ribossomal 16S, o produto da reação de PCR foi purificado com o kit *GFX PCR DNA and Gel band Purification*[®] (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi adicionado ao produto de PCR 100 µl de *Capture Buffer Type 2* e a mistura foi transferida para uma coluna GFX com filtro, sendo centrifugada a 16000 x g por 30 segundos. O produto filtrado que passou pela coluna foi descartado. Na coluna GFX foram adicionados 500 µl de *Wash Buffer Type 1* e o procedeu-se nova centrifugação a 16000 x g por 30 segundos, descartando o filtrado. A coluna foi transferida para um novo tubo e, para a eluição do DNA, foram adicionados 15 µl de *Elution Buffer Type 4* no centro da membrana. A mistura foi incubada por 60 segundos à temperatura ambiente, sendo depois centrifugada a 16000 x g por 60 segundos para a obtenção do DNA purificado. Uma alíquota de 5 µl do DNA purificado foi analisada em gel de agarose a 1%, utilizando como padrão molecular de massa 2 µl de *Low Mass DNA Ladder*[®] (Invitrogen), com corrente contínua 100V/90A por 30 minutos, em tampão TSB.

Realizada a análise de agrupamento filogenético, foram escolhidos 23 isolados representativos dos principais grupos para o sequenciamento completo do gene ribossomal 16S. Para isso foram utilizados os *primers* RD1 5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3' , 1114F 5' GCA ACG AGC GCA ACC C 3' , 704F 5' GTA GSG GTG AAA TSC GTA GA 3' , 357F 5' CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' e FD1 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'.

Para cada isolado foram realizadas cinco reações diferentes, na obtenção do segmento completo do gene 16S (~ 1500pb). Em cada reação foram utilizados 2 µl de solução *buffer* 2,5X; 2 µl de *Dyamic*; 1 µl do *primer* 5 pmoles/µl; 1 µl do produto de PCR purificado (~ 100 ng de DNA), e; 4 µl de H₂O ultra pura esterilizada; para um volume final de 10 µl por amostra.

As condições de amplificação consistiram de 25 ciclos de: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 60 segundos. Após a amplificação as amostras mantidas a -20°C com privação de luminosidade.

Em seguida o produto foi purificado com 2 µl de uma solução de 1:1 v/v de acetato de sódio 1,5M e Na-EDTA 0,25M, acrescido de 60 µl de etanol absoluto. As placas foram centrifugadas a 2700 rpm por 45 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado. Em seguida foram aplicados 150 µl de etanol 70%, seguido de nova centrifugação

a 2700 rpm por 20 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e as placas foram novamente centrifugadas a 600 rpm por três minutos, à temperatura de 4°C, voltadas para baixo.

Após a centrifugação, as placas foram secas durante dez minutos em uma estufa à temperatura de 40°C, para a concentração do produto de PCR. A análise de sequenciamento foi feita em sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Para o carregamento das amostras no aparelho, o produto da reação precipitado foi ressuscitado em mistura contendo 9,75 ul de formamida *HiDi* e 0,25 ul de padrão de comprimento *GeneScan - 500 ROX[®] Size Standard* (Applied Biosystems). Antes do carregamento as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C e resfriadas a 0°C por 4 minutos.

Os dados do sequenciamento foram obtidos em forma de sequência de nucleotídeos em arquivos .FASTA. O alinhamento das sequências de cada isolado foi efetuado na plataforma “*Assembly*” do Programa Bionumerics 5.1[®] (Applied Maths BVBA, Sim-Martens-Latem, Belgium). Nessa plataforma verificou-se também a qualidade das sequências obtidas. Após o alinhamento as sequências obtidas foram exportadas para a plataforma “*Align*” da base de dados *Greengenes*, onde foram comparados com sequências constantes na base de dados.

Os arquivos foram exportados em formato .MEGA e analisados no programa Mega 5.0[®] (TAMURA et al., 2011), de onde foi obtida a árvore de agrupamento genético, utilizando o algoritmo UPGMA.

Para a comparação das áreas foi realizada a análise de redundância (RDA) com uma matriz de dados biológicos e outra matriz de dados ambientais, utilizando o teste de Monte Carlo, com 499 permutações com auxílio do programa CANOCO 4.5 (TER BRAAK & SMILAUER, Wageningen, The Netherlands). Para visualização numérica da separação dos dados a análise de similaridade ANOSIM (CLARKE, 1993) foi realizada com auxílio do programa Primer 5 (PRIMER-E Ltd., Plymouth, United Kingdom).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Alguns autores referem o limite de variação para dados biológicos em 30%, outros ainda tratam esse limite como sendo aceitável até 40%, diferentemente de quando se trata de dados químicos ou físicos do solo, nos quais o limite aceitável para o coeficiente de variação

em experimentos geralmente fica entre 10 e 15%. Como as áreas vêm sofrendo intensas modificações desde o processo de reconstrução, era de se esperar que o coeficiente de variação fosse maior. Assim, o coeficiente de variação de 27,49% obtido no experimento está dentro dos padrões para atributos biológicos.

Para a obtenção dos valores de abundância de BFNINR foi utilizado o teste de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch, pois este apresenta melhor controle dos erros tipo I e tipo II, quando comparado aos testes de Duncan e Tukey, que controlam bem apenas o erro tipo I.

Outro fator que reforça a validade dos dados é o R^2 que gera um valor aceito como o quanto da variação dos dados amostrais que poder explicado pela equação de regressão ou nesse caso pelos dados transformados em base logarítmica. De um valor de R^2 de 0,916 pode se traduzir que 91,6% da variação dos dados pode ser explicada pela equação proposta. Os dados de abundância através do Número Mais Provável (NMP) são apresentados na tabela 5.

Os maiores valores de abundância foram encontrados nas áreas sucessão fumo/aveia (FA), mata nativa (MN), campo naturalizado (CN) e testemunha reconstruída (TR). Os menores valores de abundância foram encontrados nas áreas *Brachiaria* (BR), calcário (CA), calcário + *Brachiaria*(CB), calcário + cama de aves + *Brachiaria* (CCB) e Dregs (DR) (figura 1).

A maior densidade na área FA provavelmente se deve à maior diversidade de substrato e fontes de carbono e energia. Os diferentes tipos de palhada ao longo dos ciclos de cultura possibilitam suprimento de carbono e nutrientes relativamente estável e contínuo, garantindo a sobrevivência e viabilidade dos organismos diazotróficos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Além disso, o suprimento de água nesse ambiente é facilitado, já que a palha funciona como uma barreira, evitando a incidência direta de luz e calor sobre o solo, diminuindo as perdas de água evaporação. A cobertura do solo garante também uma menor variação de temperatura, tanto entre o dia e a noite, como entre estações de cultivo, possibilitando melhores condições de sobrevivência e adaptabilidade aos microrganismos edáficos, dentre eles os diazotróficos (BROOS et al., 2005).

Tabela 5. Número mais provável (NMP) de diazotróficos simbiotes, pelo método indireto, utilizando o teste de comparação múltipla de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch. Valores transformados em base logarítmica natural. Nível de significância: 5%.

Área	NMP (células g solo seco ⁻¹)	NMPm	ln NMPm *
Testemunha 1 (TR1)	2,100 x 10 ⁴	1,352 x 10 ⁴	9,195 A
Testemunha 2 (TR2)	2,691 x 10 ³		
Testemunha 3 (TR3)	1,688 x 10 ⁴		
Calcário 1 (CA1)	1,950 x 10 ⁰	1,406 x 10 ¹	1,659 B
Calcário 2 (CA2)	1,940 x 10 ⁰		
Calcário 3 (CA3)	3,830 x 10 ¹		
Calcário + <i>Brachiaria</i> 1 (CB1)	1,920 x 10 ⁰	4,990 x 10 ⁰	1,439 B
Calcário + <i>Brachiaria</i> 2 (CB2)	8,410 x 10 ⁰		
Calcário + <i>Brachiaria</i> 3 (CB3)	4,640 x 10 ⁰		
Calcário + Cama + <i>Brachiaria</i> 1 (CCB1)	1,910 x 10 ⁰	2,404 x 10 ¹	1,837 B
Calcário + Cama + <i>Brachiaria</i> 2 (CCB2)	6,920 x 10 ¹		
Calcário + Cama + <i>Brachiaria</i> 3 (CCB3)	1,870 x 10 ⁰		
Dregs 1 (DR1)	1,210 x 10 ²	8,573 x 10 ¹	4,180 B
Dregs 2 (DR2)	1,990 x 10 ¹		
Dregs 3 (DR3)	1,163 x 10 ²		
Sucessão Fumo/Aveia 1 (FA1)	1,018 x 10 ⁵	1,645 x 10 ⁵	11,882 A
Sucessão Fumo/Aveia 2 (FA2)	2,884 x 10 ⁵		
Sucessão Fumo/Aveia 3 (FA3)	1,032 x 10 ⁵		
<i>Brachiaria</i> Monocultivo 1 (BR1)	4,100 x 10 ⁰	2,557 x 10 ⁰	0,856 B
<i>Brachiaria</i> Monocultivo 2 (BR2)	1,740 x 10 ⁰		
<i>Brachiaria</i> Monocultivo 3 (BR3)	1,830 x 10 ⁰		
Campo Naturalizado 1 (CN1)	1,151 x 10 ³	5,622 x 10 ⁴	9,885 A
Campo Naturalizado 2 (CN2)	1,042 x 10 ⁵		
Campo Naturalizado 3 (CN3)	6,332 x 10 ⁴		
Mata Nativa 1 (MN1)	1,027 x 10 ³	9,244 x 10 ³	8,052 A
Mata Nativa 2 (MN2)	1,184 x 10 ³		
Mata Nativa 3 (MN3)	2,552 x 10 ⁴		

* Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test, REGWQ = 0,05; R² = 0,916; CV = 27,49%; F = 24,80; ln NMPm_t = 5,442. TR - testemunha reconstruída após a mineração de carvão; CA- solo reconstruído com aplicação de calcário; CB - solo reconstruído com aplicação de calcário e semeadura de *Brachiaria brizantha*; CCB - solo reconstruído com aplicação de calcário, cama de aviário e semeadura de *Brachiaria brizantha*; DR - solo reconstruído com aplicação de dregs; FA - solo reconstruído com cultivo em sucessão de fumo/aveia/feijoeiro; BR - solo reconstruído com semeadura de *Brachiaria brizantha*; CN - campo naturalizado; MN - mata nativa.

O valor de densidade médio na área FA foi de 1,645x10⁵ células g solo seco⁻¹, que é um valor considerado alto para populações nativas de diazotróficos. Como medida de comparação, os inoculantes comerciais geralmente apresentam densidade de células de aproximadamente 10⁸ a 10⁹ células grama de turfa⁻¹ (inoculante turfoso) ou células ml⁻¹ (inoculante líquido).

As condições de solo, ao longo do tempo, são de fundamental importância para a manutenção do metabolismo e multiplicação das bactérias diazotróficas no solo, tendo visto que seu metabolismo é heterotrófico e que as colônias podem se desenvolver no solo, em períodos em que não haja um hospedeiro compatível para que ocorram os processos de infecção e formação de nódulos radiculares.

Segundo Hirsch (1996), células de bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium* apresentam grânulos de poli-b-hidroxibutirato, que podem ser catabolizados (WONG & EVANS, 1971) e utilizados como fonte de carbono e energia em situações de estresse. Assim, este mecanismo de adaptação pode contribuir para a sobrevivência e atividade destas bactérias por longos períodos, independentemente da presença de planta hospedeira.

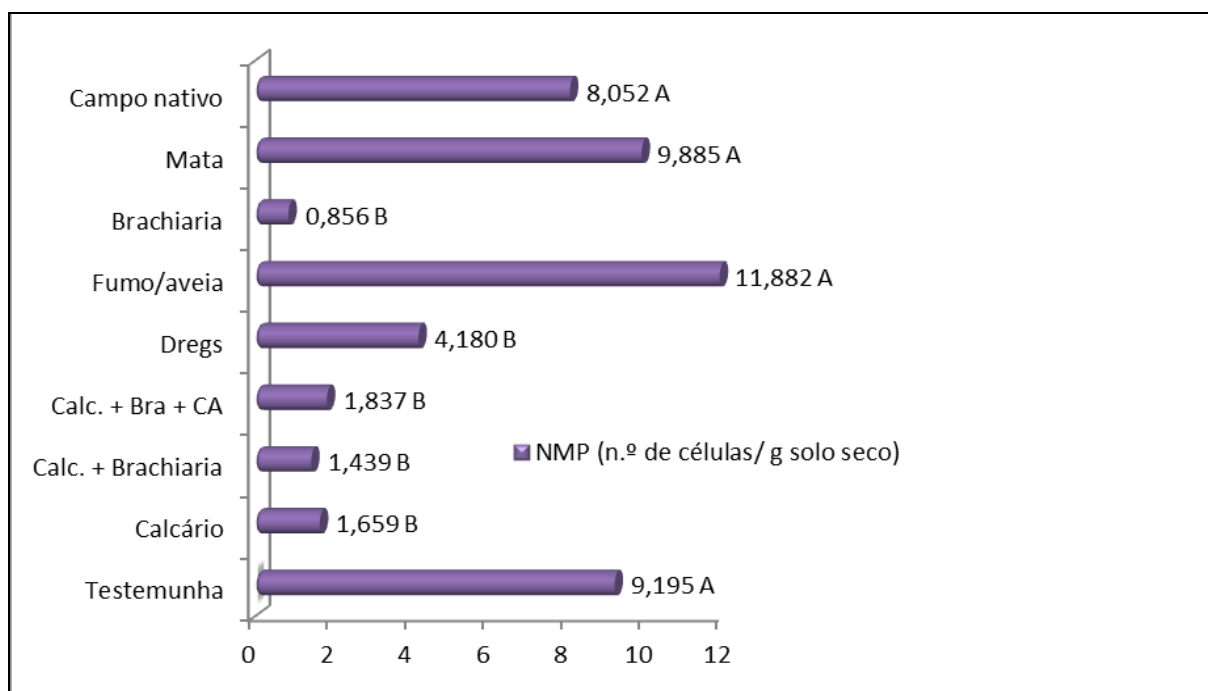


Figura 1: NMP de diazotróficos nas diferentes áreas, com solo reconstituído após a mineração de carvão, em Lauro Muller, SC. Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test, REGWQ = 0,05; $R^2 = 0.916$; CV = 27,49%; F = 24,80; $\ln \text{NMP}_t = 5,442$.

Na área MN a cobertura do solo e a densidade de plantas superiores, principalmente nas partes mais altas do dossel, possibilitam a ciclagem contínua de carbono e nutrientes no solo pela decomposição das folhas que caem, principalmente no período hibernal. No período estival, a decomposição da palha pela microbiota e a mineralização da matéria orgânica sofrem uma aceleração, garantindo o suprimento de carbono, energia e nutrientes no solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Além disso, o suprimento de água na mata geralmente é suficiente para garantir a manutenção do metabolismo e a multiplicação dos propágulos dos diazotróficos no solo. O valor de densidade médio de $5,622 \times 10^4$ células g solo seco⁻¹, assim como o valor encontrado em FA, é considerado alto para um ambiente antropizado, porém sem a inoculação com microrganismos selecionados.

Em CN o valor de densidade foi de $9,244 \times 10^3$ células g solo seco⁻¹, também considerado alto. O menor valor, comparado à mata e a área de sucessão fumo/aveia

provavelmente se deve ao fato de que o ambiente com predomínio de gramíneas, deva favorecer os microrganismos diazotróficos que não formam nódulos radiculares, mas que colonizam a rizosfera e o rizoplano das plantas superiores atuando como promotores do crescimento vegetal (VALVERDE et al., 2003).

Em se tratando de gramíneas, a relação simbiótica que elas realizam com bactérias diazotróficas se dá de forma endofítica, sem que haja a formação de nódulos radiculares e os benefícios que a planta obtém do microssimbionte são principalmente originados dos hormônios e vitaminas que a bactéria disponibiliza para a planta, e não necessariamente da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, que muitas vezes adquire um papel secundário nessas simbioses. Mesmo microrganismos que formam nódulos em plantas leguminosas, podem atuar como endofíticos de plantas não leguminosas (COENYE & VANDAMME, 2003).

O resultado do valor médio de densidade obtido na área TR foi de $1,352 \times 10^4$ células g solo seco⁻¹. Esse alto valor não era esperado de antemão, principalmente devido ao baixo pH dessa área, além da deficiência de nutrientes e o baixo teor de M.O. no solo. Provavelmente esses valores se devem a um processo adaptativo contínuo dos diazotróficos simbioses as condições extremas, principalmente de pH e saturação por Al^{3+} (TORSVIK & ØVREÅS, 2008). Entre os mecanismos fisiológicos de defesa desses microrganismos que podem estar atuando estão a proteção do sítio de fixação biológica pelo aumento do volume celular, mecanismos de translocação do Al^{3+} e proteção pela parede celular e seletividade de membrana (LIAO & XIE, 2007).

Na área de *Brachiaria* em monocultivo (BR) a densidade média foi de aproximadamente 26 células g solo seco⁻¹. Esse valor é considerado muito baixo e evidencia um ambiente desfavorável à manutenção e ao desenvolvimento das bactérias diazotróficas simbioses. Pelo fato de se tratar de um monocultivo de gramínea, e dessas plantas não formarem nódulos, pois não apresentam os genes *NOD* (fatores de nodulação da planta), provavelmente o ambiente selecionou microrganismos para outras funções ecológicas (SESSITSCH, A. & PUSCHENREITER). Além disso, existem microrganismos fixadores de nitrogênio nessas áreas, mas estes não formam simbiose efetiva, e são em geral bactérias que fixam nitrogênio em vida livre e na rizosfera, (SOUZA et al. 2009; KAN et al., 2007), podendo algumas delas colonizar as raízes endofiticamente (MELLONI et al., 2004), fixando nitrogênio atmosférico e, sobretudo atuando como promotores do crescimento vegetal, pela produção de hormônios e vitaminas (e.g. auxinas).

Já que esse ambiente favorece aos diazotróficos de vida livre, ao longo do tempo, os processos de seleção e competição interespecífica devem ter atuado selecionando os esses microrganismos, em detrimento das bactérias formadoras de nódulos radiculares (KAN et al., 2007).

3.2. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO FENOTÍPICO

Após a purificação foram obtidos 109 isolados de diazotróficos simbiotes dos nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* (tabela 6). Os isolados foram checados quanto à presença do gene *nifH*, sendo que todos amplificaram o gene em questão. Os isolados obtidos (tabela 6) foram utilizados tanto para a avaliação dos caracteres fenotípicos, quanto para a caracterização genética e filogenética.

Tabela 6. Número de isolado de BFNINR obtidos por área, dos solos reconstruídos após a mineração de carvão, em Lauro Muller, SC.

Área	N.º de isolados obtidos
Testemunha reconstruída (TR)	17
Calcário (CA)	3
Calcário + <i>Brachiaria</i> (CB)	6
Calcário + Cama de aves + <i>Brachiaria</i> (CCB)	6
Dregs (DR)	11
Sucessão fumo/aveia (FA)	31
<i>Brachiaria</i> monocultivo (BR)	1
Campo naturalizado (CN)	14
Mata (MN)	20
Total (Σ) =	109

Os perfis fenotípicos gerados pela matriz de dados binários levaram á uma diferenciação concisa entre áreas amostrais. Vale ressaltar que as ponderações e conclusões que serão abordadas na discussão dos dados levam em consideração o fato de que se obtiveram números diferentes de isolados, nas diferentes áreas.

A análise de agrupamento fenotípico geral dos isolados de diazotróficos demonstrou a formação de 22 grupos ao nível de 50% de similaridade, por ligação completa (figura 2).

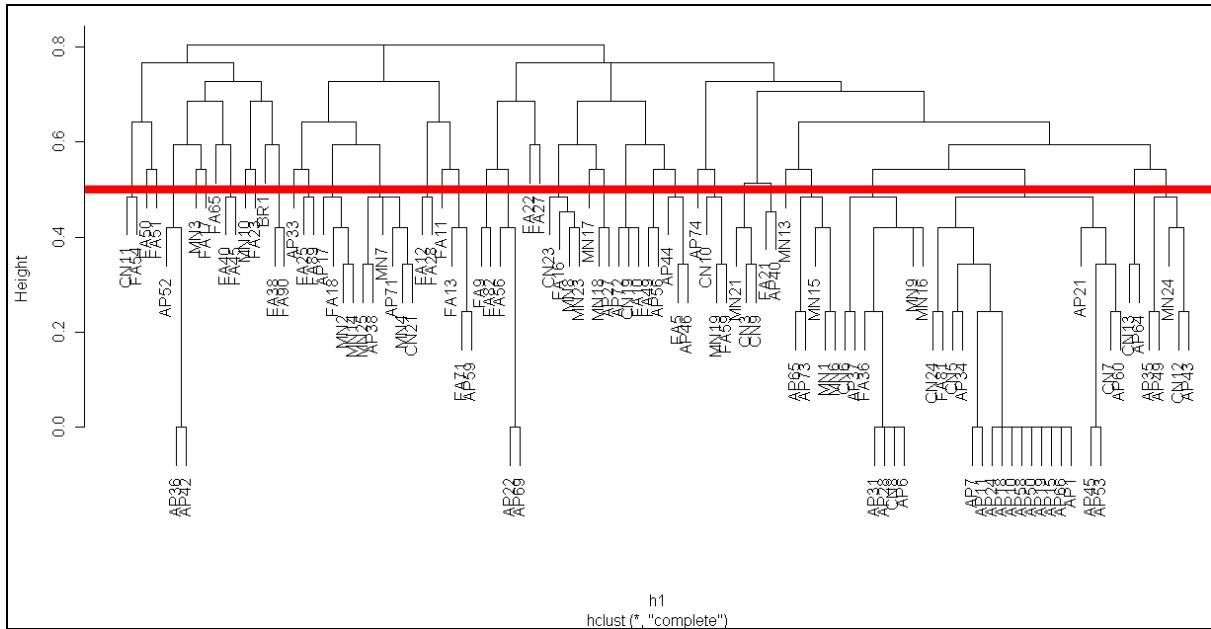


Figura 2: Diversidade fenotípica dos diazotróficos oriundos de solos reconstruídos após a mineração de carvão, na Bacia Carbonífera Catarinense. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

A análise de agrupamento fenotípico na área testemunha reconstruída, ao nível de similaridade de 50%, levou à formação de cinco grupos distintos (figura 3), em um total de 17 isolados obtidos.

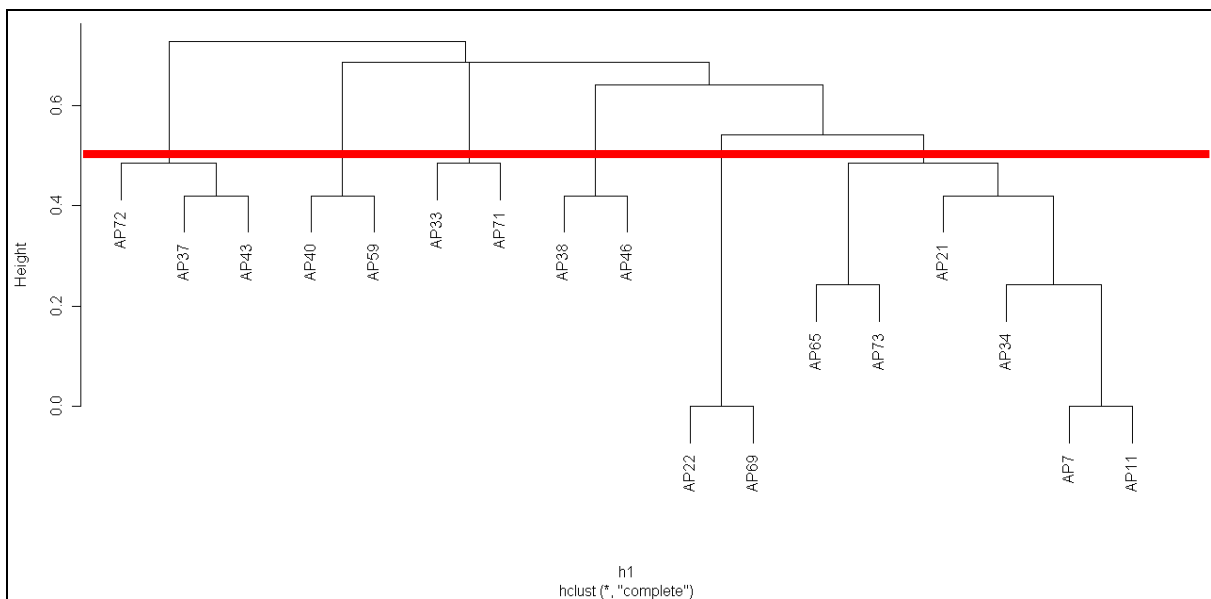


Figura 3: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área TR. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

A análise de agrupamento fenotípico para a área calcário levou à formação de um único grupo (figura 4).

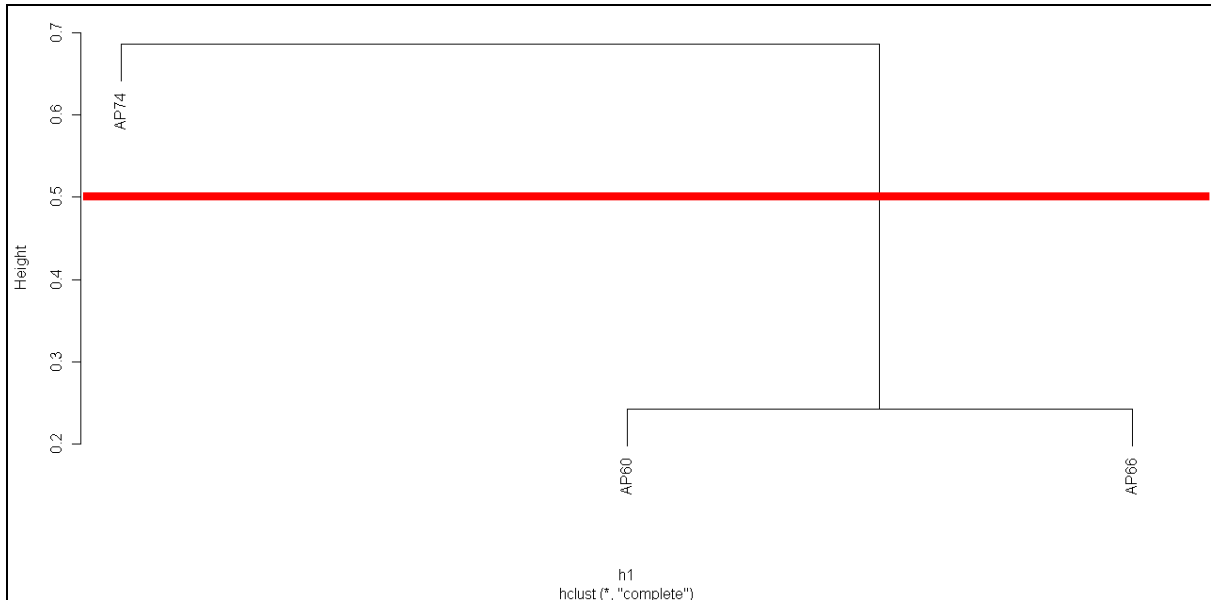


Figura 4: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CA. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal e Michener.

A análise de agrupamento fenotípico na área calcário + *Brachiaria* demonstrou a formação de apenas um grupo, assim como área CA (figura 5).

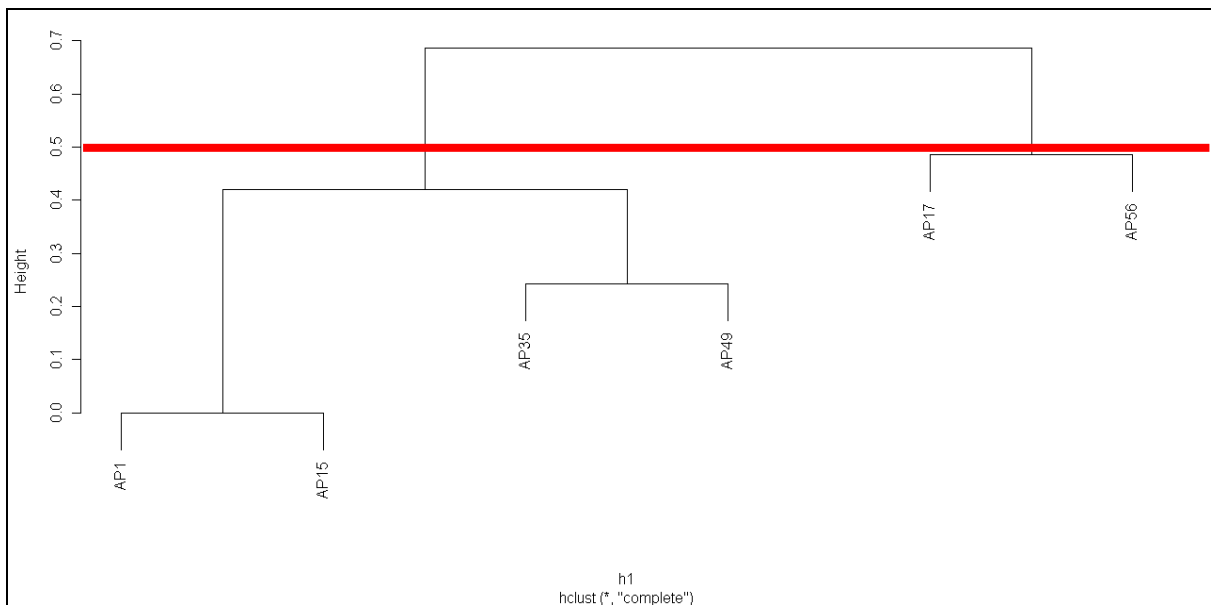


Figura 5: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CB. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

A análise de agrupamento fenotípico na área calcário + cama de aves + *Brachiaria* demonstrou a formação de apenas um grupo, à uma distância relativa de ligação de 50% (figura 6).



Figura 6: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CCB. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

A análise de agrupamento fenotípico na área dregs demonstrou a formação de dois grupos à uma distância relativa de 50% (figura 7).

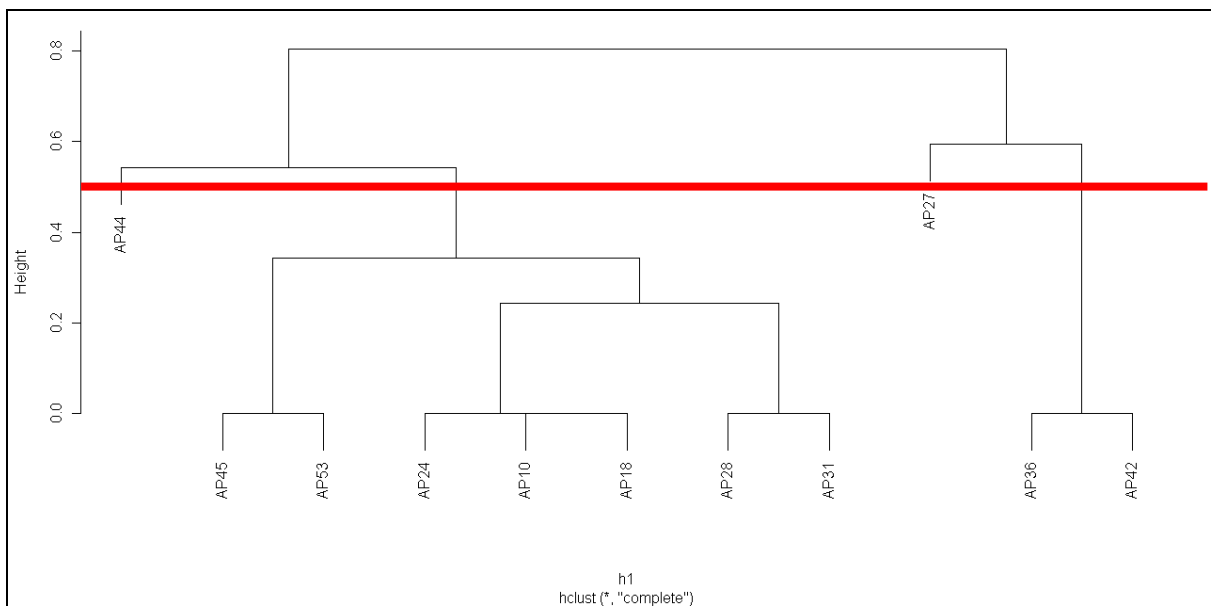


Figura 7: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área DR. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

Foram formados 12 grupos à uma distância relativa de 50% na área fumo/aveia (figura 8).

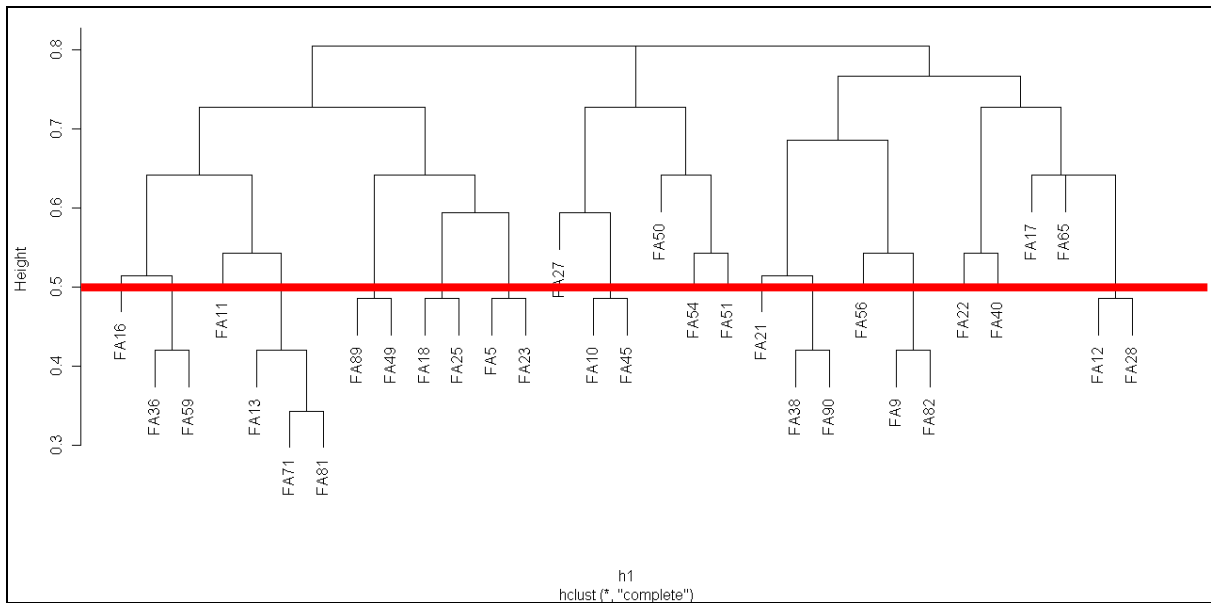


Figura 8: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área FA. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

Foram formados três grupos à uma distância relativa de 50%, na área campo naturalizado (figura 9).

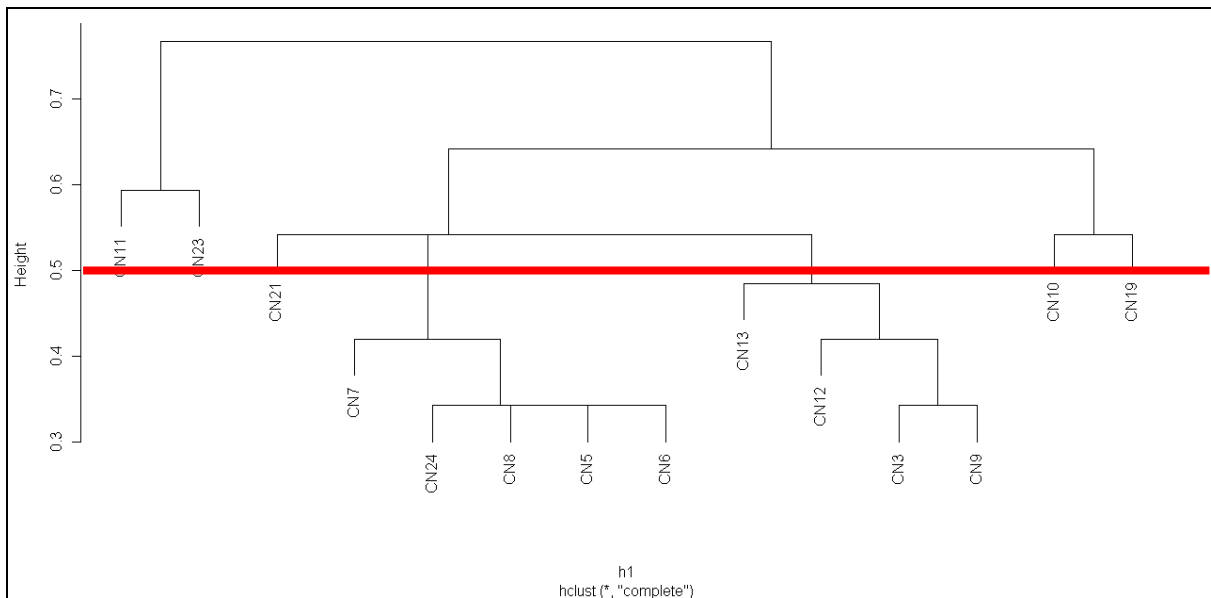


Figura 9: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área CN. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

A análise de agrupamento fenotípico na área mata nativa revelou a formação de seis grupos distintos à uma dista relativa de 50% (figura 10).

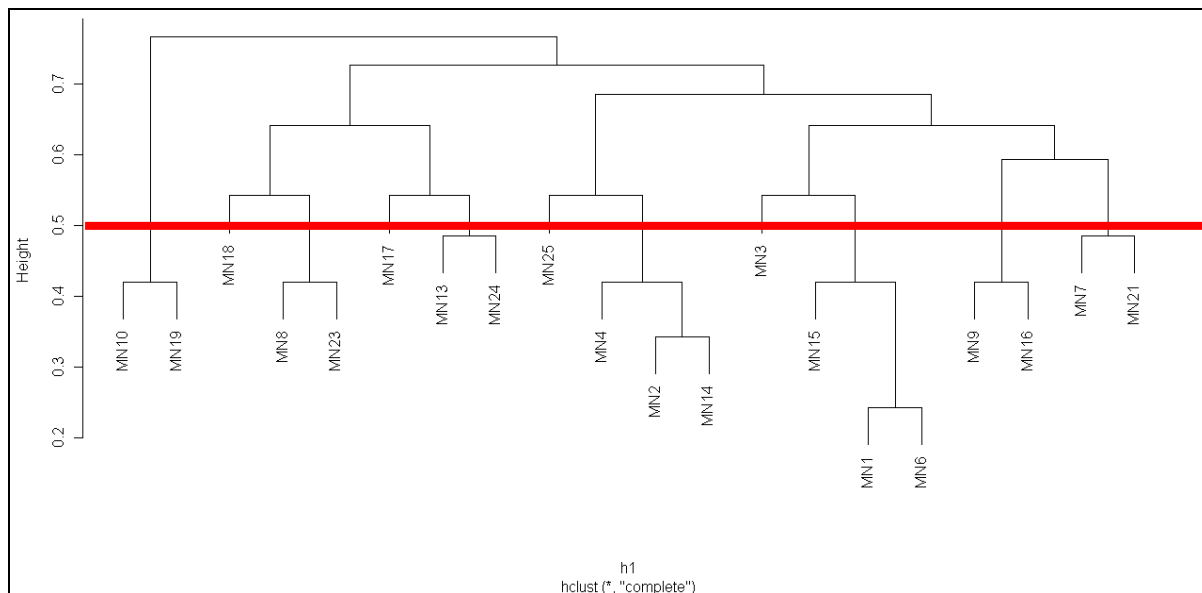


Figura 10: Diversidade fenotípica dos diazotróficos na área MN. Análise de agrupamento pelo vizinho mais distante, utilizando o índice S de Sokal & Michener.

Para a avaliação da diversidade alfa foi utilizado o índice de diversidade de Gleason, índice de diversidade simples, que considera o número de grupos formados em relação ao total de indivíduos observados (em base logarítmica natural, base 10), obtido pela seguinte equação: $Dg = s / \log N$. Os resultados são apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Índice de diversidade de Gleason para a comparação fenotípica dos isolados de diazotróficos simbiotes realizada em meio batata-água, em solos reconstruídos após a mineração de carvão.

Área	N.º de isolados (n)	N.º de grupos formados (S) (Hr = 0,5)	Dg de Gleason
TR	17	5	4,06
CA	3	1	2,10
CB	6	1	1,28
CCB	6	1	1,28
DR	11	2	1,92
FA	31	12	8,05
BR	1	1	1,00
CN	14	3	2,62
MN	20	6	4,61

TR - testemunha reconstruída após a mineração de carvão; CA- solo reconstruído com aplicação de calcário; CB - solo reconstruído com aplicação de calcário e sementeira de *Brachiaria brizantha*; CCB - solo reconstruído com aplicação de calcário, cama de aviário e sementeira de *Brachiaria brizantha*; DR - solo reconstruído com aplicação de dregs; FA - solo reconstruído com cultivo em sucessão de fumo/aveia/feijoeiro; BR - solo reconstruído com sementeira de *Brachiaria brizantha*; CN - campo naturalizado; MN - mata nativa. *Na área BR, como foi obtido apenas um isolado, e compreendendo que na razão matemática o logaritmo de 1 é igual a 0, não é possível calcular o índice de alfa diversidade, que é considerado como sendo igual a 1.

O maior índice de diversidade fenotípica foi encontrado na área FA, seguido de MN, TR e CN. Os menores índices foram encontrados em CCB, CB, DR e CA, respectivamente. Os dados corroboram com os dados obtidos pelo NMP. Na área BR, como foi obtido apenas um isolado, e compreendendo que na razão matemática o logaritmo de 1 é igual a 0, não é possível calcular o índice de alfa diversidade, sendo atribuído o valor de 1.

A maior diversidade alfa encontrada em FA provavelmente se deve à maior abundância de substrato possibilitada pelos cultivos em sucessão. O solo dessa área não é colocado em pousio, tendo aporte e renovação constante do substrato. Como são cultivadas diferentes espécies ao longo do tempo, essas possuem fenologia e aspectos bioquímicos distintos, tanto relativos à quantidade quanto à qualidade ou tipo de substratos produzidos. Isso possibilita condições favoráveis de sobrevivência e desenvolvimento a um espectro maior de indivíduos da microbiota do solo, dentre eles os diazotróficos simbiotes, que sobrevivem no solo, metabolizando os restos vegetais dessas culturas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A diversidade alfa encontrada em MN foi menor do que em FA e semelhante a TR, sendo estes intermediários, e superiores aos valores obtidos nas demais áreas. Essa diversidade maior em MN comparada com as demais áreas, exceto FA, provavelmente se deve, dentre outros, ao grau de equilíbrio dos fatores químicos, físicos e biológicos do solo, associado à existência de um dossel que contempla indivíduos da flora em todos os estágios de sucessão ecológica de mata. Esse equilíbrio garante o suprimento de água e nutrientes e estimula a ciclagem dos mesmos no solo.

Essas condições dão aos microrganismos edáficos condições de sobrevivência e estímulo contínuo ao desenvolvimento, mesmo em condições de stress hídrico ou por temperaturas, sejam elas altas ou baixas. Nessas condições estressantes, em outras áreas que não possuem esse mesmo equilíbrio dinâmico, a diversidade de microrganismos no solo pode ser alterada em questões de semanas. Essas alterações favorecem o desenvolvimento de microrganismos com metabolismo mais diversificado ou estrategistas K, os quais são menos dependentes do substrato e possuem uma flutuação populacional com menor grau de oscilação ao longo do tempo, quando comparados aos estrategistas R, que se alimentam de uma gama menos diversificada de substratos, sofrendo mais com alterações sejam elas de ordem climática ou físico-química, desfavorecendo esses microrganismos na ocupação de determinado nicho ecológico no solo (BLAGODATSKAYA et al., 2007; KUZYAKOV, 2010).

A diversidade encontrada em TR leva a crer que há indivíduos adaptados às condições de *stress* causados tanto pela reconstrução do solo, como pelo manejo empregado após a

reconstrução. A alta diversidade fenotípica na área parece ser devido aos diferentes mecanismos de tolerância dos microrganismos edáficos, principalmente ao pH baixo (BORDELEAU & PRÉVOST, 1994), e à deficiência de nutrientes essenciais, como Ca e Mg.

Dentre os principais mecanismos, aquele que mais distingue os microrganismos presentes nessa área dos presentes nas demais é a alta produção de exopolissacarídeos (EPS). Esses EPS formam uma camada protetora extracelular, atuando como uma barreira físico-química, que protege os microrganismos da ação deletéria, principalmente do Al tóxico. Assim, mesmo em um ambiente com baixos teores de macronutrientes e M.O. e com baixo estabelecimento de plantas superiores, os diazotróficos simbiotes conseguem se manter na área, devido a esses mecanismos.

A produção de EPS's em diazotróficos parece estar ligada a existência de dois genes, *exoX* e *exoY*, e a base para a formação desses EPS's parece ser um sistema regulatório sensitivo que surge da ação conjunta desses genes (GRAY et al., 1990).

A baixa diversidade em CN, CA, CB, CCB e DR pode advir de diferentes razões. Em CN, há o predomínio de espécies compostas e gramíneas, destaque para o gênero *Cymbopogon* (capim-limão), havendo participação pouco expressiva de leguminosas na área, com ênfase para o gênero *Desmodium* spp (pega-pega). Mesmo havendo alta população de BFNNL, como evidenciado pelo NMP, essa população apresenta baixa diversidade fenotípica. A explicação para isso pode advir do fato de que a simbiose é dependente de trocas quimiotáxicas entre o microssimbionte e o macrossimbionte (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Como no campo nativo há um predomínio do gênero *Desmodium*, há uma seleção por parte da planta, que libera seus compostos radiculares, principalmente flavonóides, os quais são percebidos por um grupo específico ou restrito de microrganismos, capazes de nodular essa planta. Ao longo do tempo, os microrganismos capazes de nodular o *Desmodium* vão ocupando o ambiente, em detrimento de outros microssimbiontes, levando à uma especialização da simbiose (GU et al., 2007). Parker (2002), trabalhando com isolados de *Phaseolus vulgaris*, *Desmodium* spp. e *Macroptillium* spp. verificou uma maior diversidade genética nos isolados obtidos na primeira planta, quando comparado às outras duas, evidenciando uma menor especificidade do feijoeiro e uma certa especialização na simbiose das demais plantas avaliadas.

A baixa diversidade em CA, CB e CCB deve estar associada à especialização do ambiente devido à aplicação de calcário, que eleva o pH (ERNANI, 2008), e no caso de DR à aplicação de calcário e dregs, já que o resíduo tem ação semelhante à do calcário no solo

(ALBUQUERQUE et al., 2002). A elevação do pH estaria selecionando microrganismos para essa condição.

Além disso, nas áreas CB e CCB, a presença da *Brachiaria*, seleciona geralmente diazotróficos associativos ou endofíticos, em detrimento das BFNNL, que se restringem àquelas que formam simbiose com *Desmodium*, o qual ocorre apenas em manchas nessas áreas. Na área CCB, além dos fatores supracitados, outro que poderia atuar na seleção e diminuição de diversidade das BFNNR seria o aporte de nitrogênio conferido pela aplicação da cama de aves, que pode atuar como inibidor da nodulação em algumas estirpes de proteobactérias (MALIK et al., 1987; BORDELEAU & PRÉVOST, 1994; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Já em DR, torna-se difícil estabelecer qual ou quais fatores foram preponderantes para o baixo índice de diversidade fenotípico, devido ao fato de que a alta variabilidade dos dados químicos pode ter mascarado esse valor.

3.3. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO FILOGENÉTICO

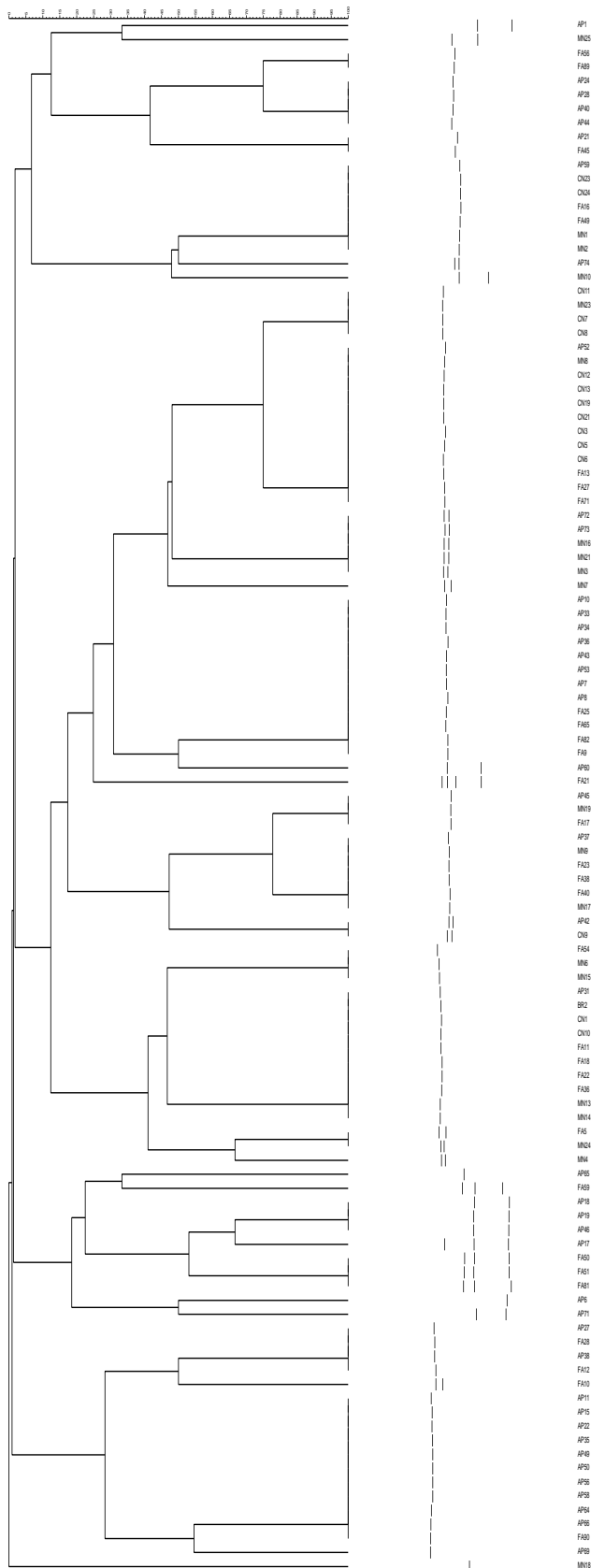


Figura 11: Diversidade filogenética geral dos diazotróficos na mina do apertado. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.

O perfil de PCR-RISA demonstrou a formação de 12 grupos na área testemunha reconstruída, três grupos nas áreas calcário e calcário + *Brachiaria*, quatro grupos na área calcário + cama de aves + *Brachiaria* e seis grupos na área dregs (figura 12).

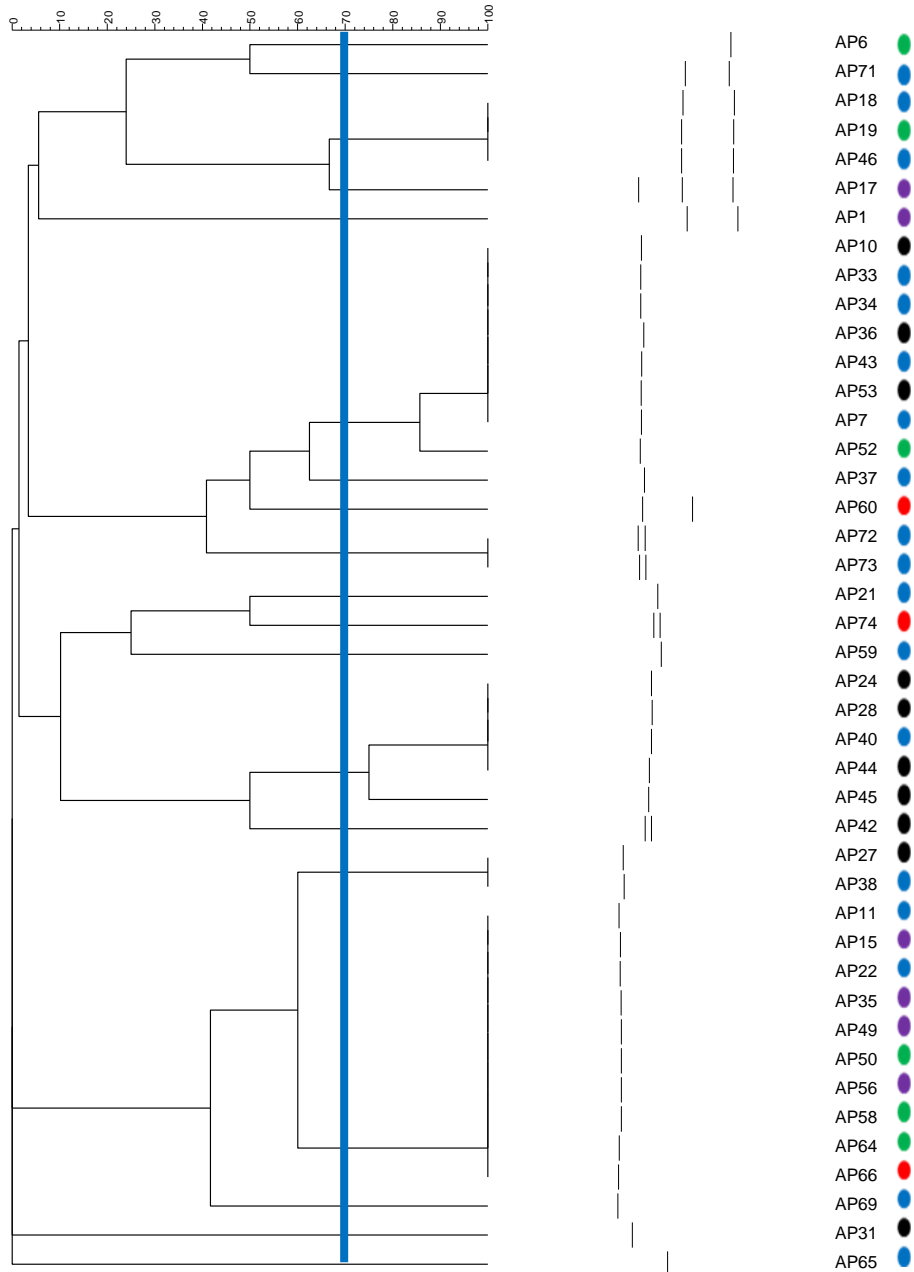


Figura 12: Diversidade filogenética dos diazotróficos na mina do apertado. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância. ● - testemunha reconstruída (TR); ● - calcário (CA); ● - calcário + *Brachiaria* (CB); ● - calcário + cama de aves + *Brachiaria* (CCB); ● - Dregs;

A análise de agrupamento filogenético na área fumo/aveia utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância revelou a formação de oito grupos, à uma distância relativa de 70% (figura 13).

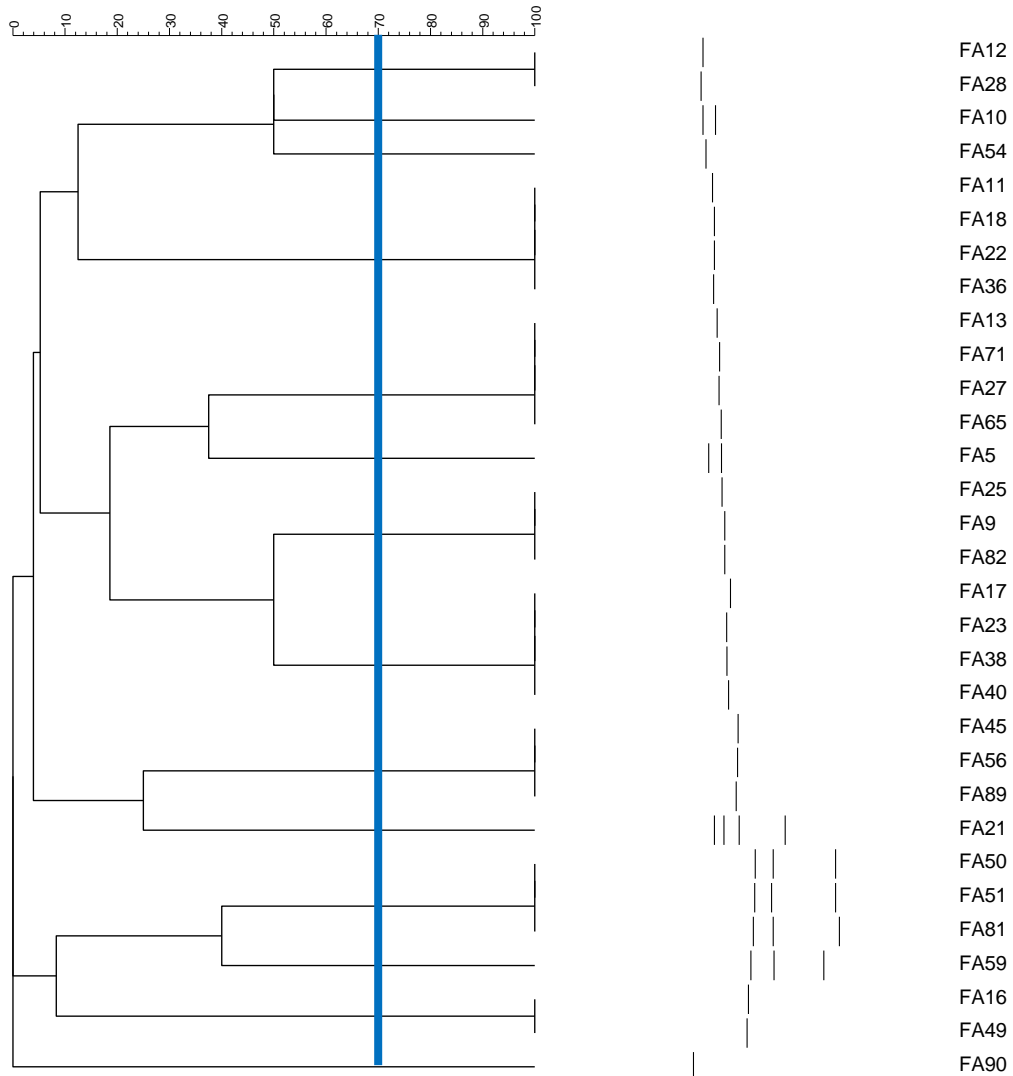


Figura 13: Diversidade filogenética dos diazotróficos na área FA. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.

Foram formados três grupos pelo perfil filogenético na área campo naturalizado (figura 14). Já na área mata nativa, foram formados sete grupos, à uma distância relativa de 70% (figura 15).

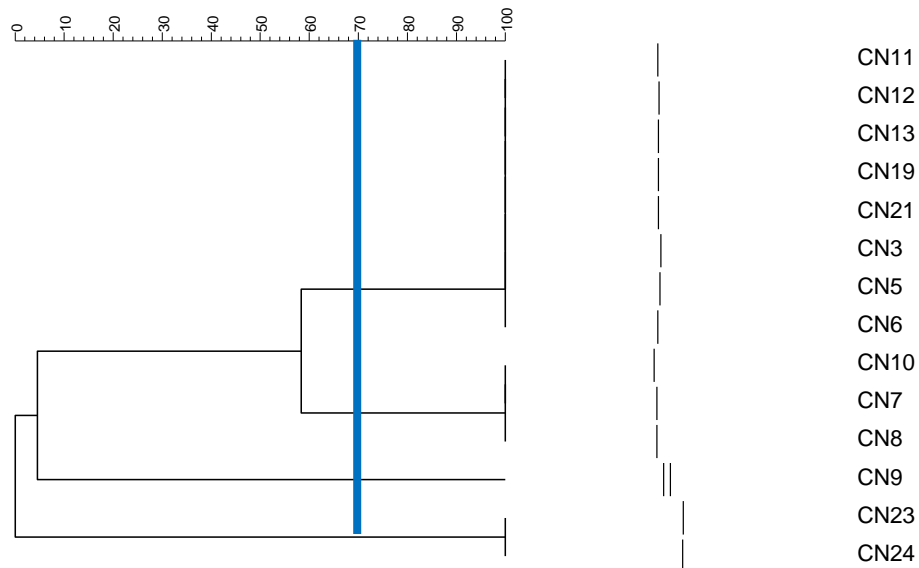


Figura 14: Diversidade filogenética dos diazotróficos na área CN. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.

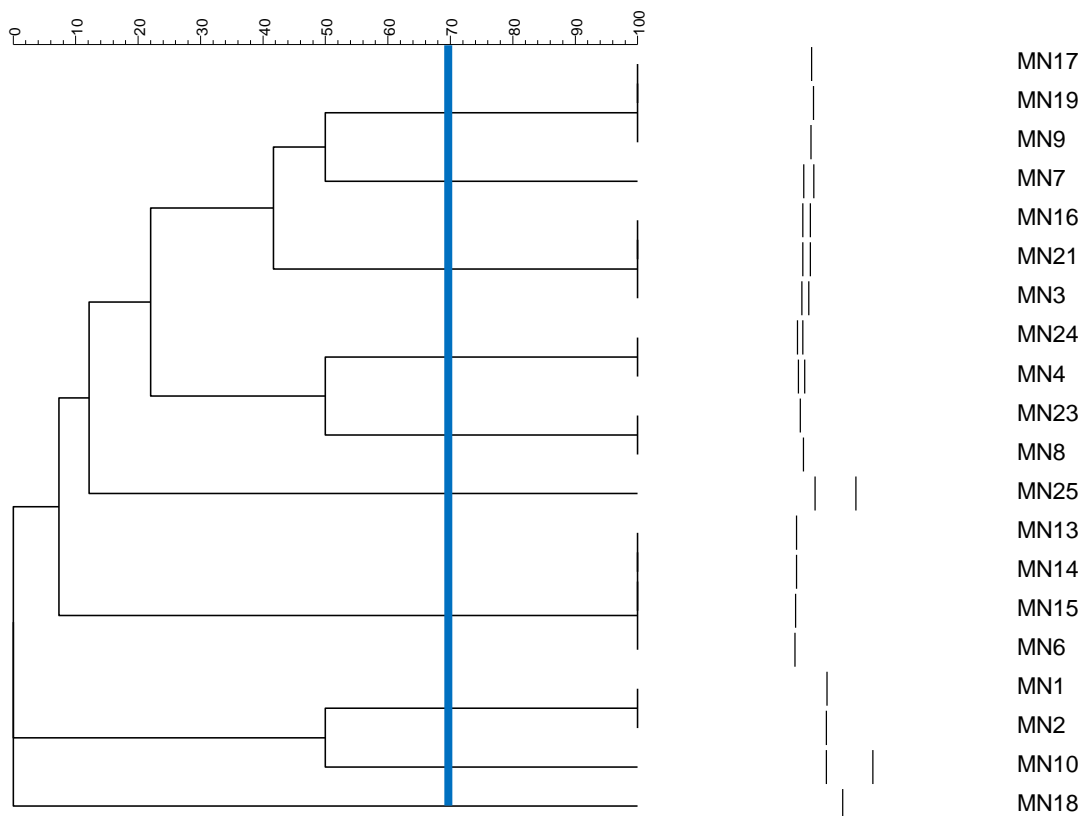


Figura 15: Diversidade filogenética dos diazotróficos simbiotes na MN. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard a 1% de tolerância.

O índice de alfa diversidade para a caracterização filogenética dos isolados de BFNINR das áreas com solos reconstruídos após a mineração, foi calculado utilizando o mesmo índice, pelo fato de que foram obtidos diferentes números de isolados, nas distintas áreas analisadas (tabela 8).

Tabela 8. Índice de diversidade de Gleason para a comparação filogenética obtida pelo perfil de RISA-PCR dos isolados de diazotróficos simbiotes, em solos reconstruídos após a mineração de carvão.

Área	N.º de isolados (n)	N.º de grupos formados (S) (H:S = 0,7)	Dg de Gleason
TR	17	12	9,75
CA	3	3	6,29
CB	6	3	3,86
CCB	6	4	5,14
DR	11	6	5,76
FA	31	8	5,36
BR	1	1	1,00
CN	14	3	2,62
MN	20	7	5,38

TR - testemunha reconstruída após a mineração de carvão; CA- solo reconstruído com aplicação de calcário; CB - solo reconstruído com aplicação de calcário e semeadura de *Brachiaria brizantha*; CCB - solo reconstruído com aplicação de calcário, cama de aviário e semeadura de *Brachiaria brizantha*; DR - solo reconstruído com aplicação de dregs; FA - solo reconstruído com cultivo em sucessão de fumo/aveia/feijoeiro; BR - solo reconstruído com semeadura de *Brachiaria brizantha*; CN - campo naturalizado; MN - mata nativa. *Na área BR, como foi obtido apenas um isolado, e compreendendo que na razão matemática o logaritmo de 1 é igual a 0, não é possível calcular o índice de alfa diversidade, que é considerado como sendo igual a 1.

O maior índice de alfa diversidade para o perfil filogenético, obtido através de PCR-RISA foi encontrado na área TR, seguido de CA, DR, MN, FA e CCB. Os menores índices foram obtidos em CN, e CB. O índice não pode ser extraído para a área BR por não satisfazer as pressuposições de cálculo, sendo atribuído o valor de 1.

A diversidade filogenética obtida em TR assemelha-se àquela obtida pelo perfil fenotípico, e reforça a idéia de que há indivíduos adaptados as condições de *stress* ocasionado pela reconstituição do perfil do solo, após intenso processo de intervenção antrópica, causada pela mineração de carvão. A alta diversidade genética na área parece ser devida aos diferentes mecanismos evolutivos de tolerância dos diazotróficos à níveis baixos de pH (BORDELEAU & PRÉVOST, 1994), bem como à deficiência de nutrientes essenciais (GRAHAM, 1992; ZAHRAM, 1999), como Ca e Mg (VINCENT, 1962). Estirpes tolerantes a baixo pH, principalmente de β -proteobactérias vêm sendo isoladas em diversos trabalhos (GERMANO et al., 2006; AIZAWA et al., 2010). Mesmo algumas estirpes de *Rhizobium* spp. (α -proteobactéria), normalmente encontradas em solos com pH alto (~ 6,0), já foram encontradas em solos ou isoladas de meios de cultura com pH baixo (BARBER, 1980; CHEN et al., 1993; DEL PAPA, 1999).

O alto índice de diversidade obtido em CA, provavelmente ocorreu porque o número de isolados obtidos foi muito baixo, sendo três isolados, todos agrupados separadamente ao nível de 70%. O mesmo deve ter ocorrido para as áreas CCB e CB. Caso o número de isolados fosse maior, esse índice tenderia a cair, aproximando-se mais da realidade. Para CA, CCB e CB a análise de agrupamento filogenético divergiu da análise de agrupamento fenotípico.

A área DR apresentou um alto índice de diversidade filogenética, diferindo dos dados fenotípicos. A maior diversidade genética talvez possa ser explicada pela alta variabilidade dos dados químicos entre as parcelas amostradas nessa área, destoando do padrão de variabilidade apresentado pelo conjunto de dados do restante das áreas amostrais.

O índice obtido em FA corrobora os dados obtidos pela tabela de diversidade fenotípica e provavelmente sofre influência da maior quantidade e qualidade de substrato, provida de forma constante pelos cultivos em sucessão. O cultivo em sucessão de plantas superiores de diferentes famílias botânicas, como é o caso, faz com que a camada superficial do solo em contato com a palhada esteja em constante processo renovação, devido à ciclagem de nutrientes acelerada pela microbiota (KUZUYAKOV, 2010). Isso possibilita maiores chances de sobrevivência e desenvolvimento a uma gama mais diversificada de microrganismos, tanto fisiologicamente quanto geneticamente, dentre eles os diazotróficos simbiotes (STOWERS, 1985; POOLE & ALLAWAY, 2003).

O índice de diversidade pelo perfil filogenético da área CN a uma distância relativa de 70%, foi idêntico ao índice pelo perfil fenotípico a uma distância relativa de 50%. A ocorrência por vezes isolada e dominante de uma espécie de leguminosa perante as outras na área, pode ter sido preponderante para a seleção e adaptação de um menor número de grupos de BFNNL, quando comparado à FA, por exemplo. O predomínio de espécies de plantas não nodulíferas deve ter selecionado microrganismos que fixam nitrogênio na rizosfera, ou mesmo endofiticamente, ocupando o mesmo nicho ecológico e concorrendo com as BFNNL por esse nicho. Dentro do grupo de plantas nodulíferas, o predomínio do gênero *Desmodium*, deve ter levado à seleção por parte da planta, de BFNNL capazes de nodular essa leguminosa (GU et al., 2007). O cultivo de plantas de *Desmodium* spp. pode ter levado a uma especialização da simbiose, selecionando estirpes de grupos específicos de BFNNL, modulando e limitando a diversidade (STANLEY & CERVANTES, 1990).

3.4. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO GENÉTICO

A análise de agrupamento genético geral, gerada a partir das sequências de bases obtidas pelo sequenciamento completo do gene ribossomal 16S revelou a formação de cinco grupos, distribuídos em seis gêneros de α , β e γ -proteobacteria e um gênero de Firmicutes (figura 16). Todas as sequências de α -proteobacteria alinharam com o gênero *Rhizobium*. As sequências de β -proteobacteria alinharam com os gêneros *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Variovorax*. As sequências de γ -proteobacteria alinharam com os gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*. A sequência de Firmicutes obtida alinhou com o gênero *Paenibacillus*.

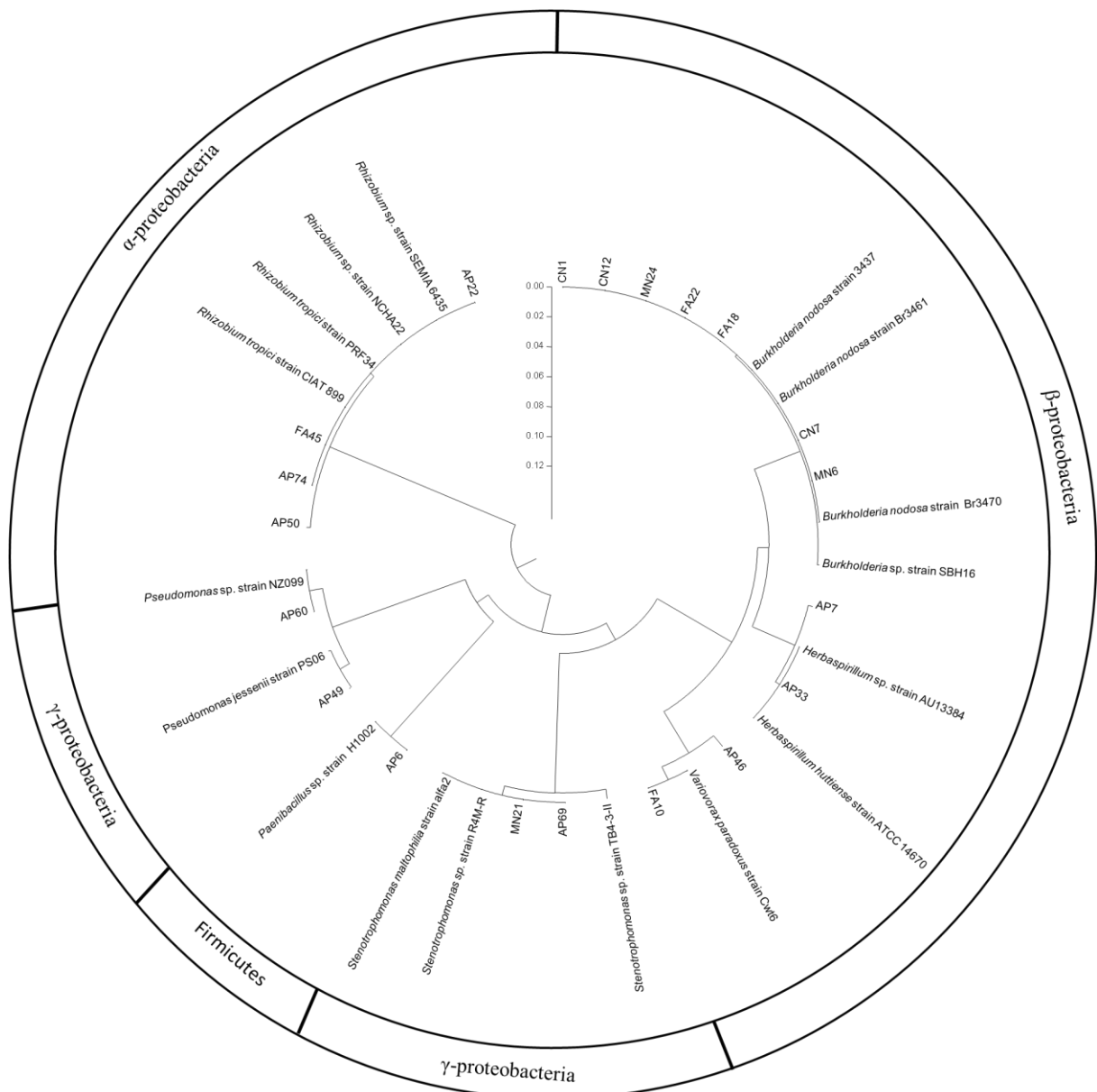


Figura 16: Relação evolucionária dos taxos inferida utilizando o algoritmo UPGMA. A árvore otimizada a um comprimento de ramo de 0,703 é mostrada. As distâncias evolucionárias foram computadas usando o método de Máxima Verossimilhança Composta (*Maximum Composite Likelihood*). A análise envolveu 37 sequências de nucleotídeos. Todas as posições de códon com “gaps” ou os nucleotídeos não alinhados foram eliminados. O conjunto de dados final resultou em sequências de 316 nucleotídeos.

A ocorrência de bactérias pertencentes a três classes diferentes de proteobactérias, além de uma de Firmicutes reforça a hipótese (i) deste trabalho de que haveria uma grande diversidade de BFNINR nos diferentes solos reconstruídos após a mineração de carvão, na Bacia Carbonífera Catarinense (figura 17).

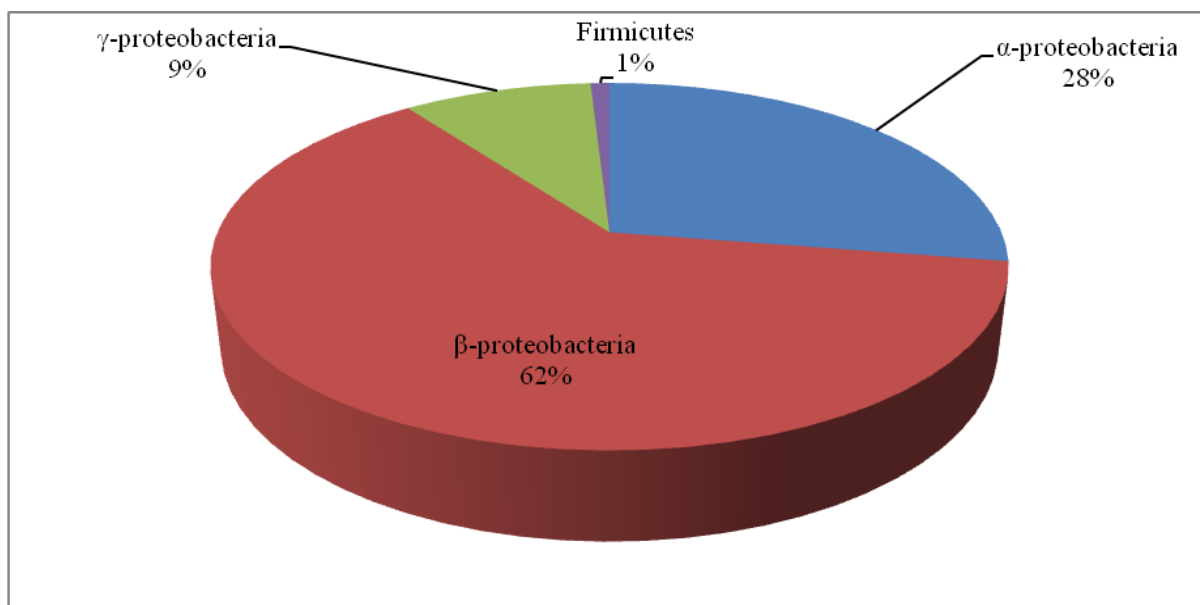


Figura 17: Distribuição dos isolados de diazotróficos entre classes, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S.

Houve predomínio da classe β -proteobacteria (62%). Dentro da classe β -proteobacteria, houve uma maior ocorrência de indivíduos do gênero *Burkholderia*, totalizando 74% dos isolados dentro da classe e 42% do total de isolados obtidos (figura 18). A maior ocorrência dessas BFNINR pode ser explicada pela maior capacidade de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas, quando comparados a isolados pertencentes a classe α -proteobacteria (e.g. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*) (ZHANG et al., 2000; COENYE & VANDAMME, 2003).

Essa maior adaptabilidade de *Burkholderia* a diferentes condições, que garante sua ampla distribuição geográfica e ambiental, pode estar relacionada ao fato de que esses microrganismos ocupam nichos diversificados no solo, formando um *contínuum* que vai desde a fixação biológica de nitrogênio (CHEN et al. 2005), promoção do crescimento vegetal (TRAN VAN et al. 2000; CHET & CHERNIN, 2002), atuação em simbioses tripartites com fungos micorrízicos arbusculares (BIANCIOTTO et al., 2000), microagregação do solo (ACHOUAK et al., 1999), até a degradação de compostos xenobióticos (BILLINGSLEY et al., 1997) e controle biológico por antagonismo (BOWERS & PARKE, 1993).

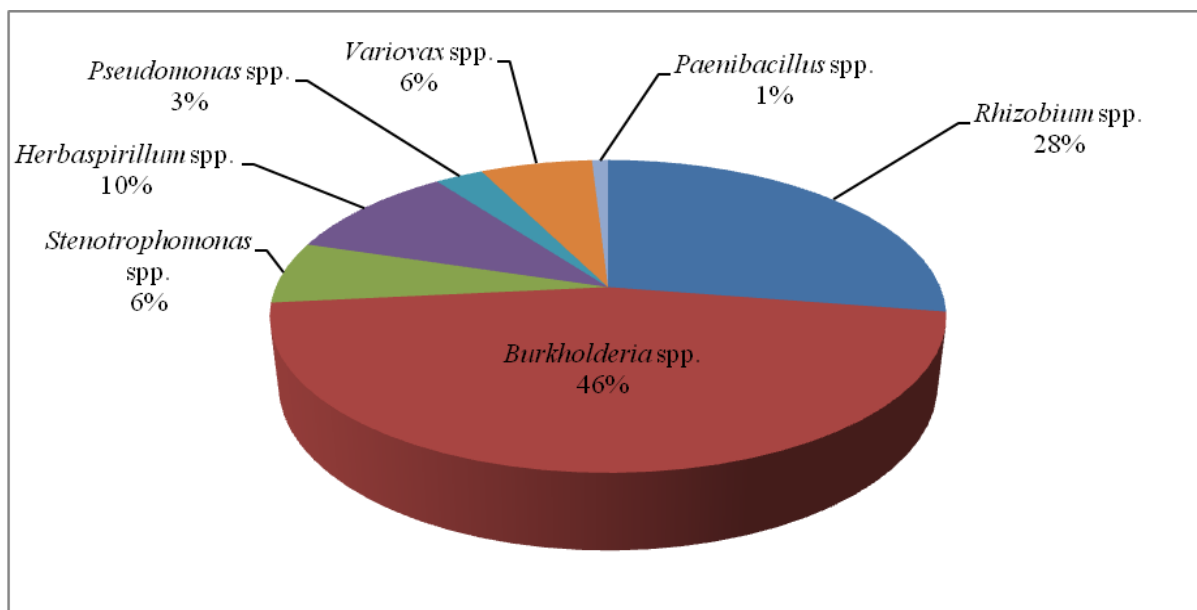


Figura 18: Frequência relativa dos isolados de diazotróficos entre gêneros, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S.

Em 2001, foi descrita a primeira evidência de que outras bactérias, além da classe α -proteobacteria poderiam nodular leguminosas e fixar nitrogênio de forma efetiva (MOULIN et al., 2001). Nesse estudo foram descritas duas estirpes pertencentes ao gênero *Burkholderia*, formando nódulos em *Machaerium lunatum* na Guiana Francesa e *Aspalathus carnosa* na África do Sul. As estirpes foram depois classificadas como *Burkholderia phymatum* (STM815) e *Burkholderia tuberum* (STM678) por Vandamme et al. (2002).

O gênero *Burkholderia* vem sendo descrito como o microssimbionte predominante em simbioses com plantas do gênero *Mimosa* no Panamá (BARRET & PARKER, 2005), Costa Rica (BARRET & PARKER, 2006) e Taiwan (CHEN et al., 2003; CHEN et al., 2006).

Chen et al. (2005), descreveram a simbiose efetiva de bactérias da classe β -proteobacteria com leguminosas no Brasil e na Venezuela. Através de sequenciamento do gene 16S de 20 isolados de BFNINR nodulando *Mimosa*, ficou evidenciando que esses pertenciam ao gênero *Burkholderia* e que as sequências obtidas estavam intimamente associadas com àquelas de outras bactérias nodulíferas do gênero *Burkholderia*, tais como *B. caribensis*, *B. phymatum* e *B. tuberum*.

Aliado à crescente descoberta de simbioses do gênero *Burkholderia* nodulando leguminosas, novos hospedeiros vêm sendo também descritos. Isolados de *Burkholderia phymatum* formando simbiose efetiva com *Phaseolus vulgaris* foram descritos em solos do Marrocos (TALBI et al., 2010). *Burkholderia phymatum* demonstrou a capacidade de nodular

Phaseolus vulgaris em experimentos realizados no México, com inoculação de solo (WONG-VILLARREAL & CABALLERO-MELLADO, 2010). Isolados de *Burkholderia* spp. foram obtidos de nódulos de *Robinia Pseudoacacia* em duas áreas de floresta costeira e de uma estação experimental, no Japão. As espécies e gêneros foram determinados por RFLP-PCR e sequenciamento do gene 16S (SHIRAIISHI et al., 2010).

Esses relatos evidenciam a capacidade de membros da classe β -proteobacteria, particularmente *Burkholderia* spp. de nodular com amplo espectro de leguminosas. Além disso, os dados demonstram que *Phaseolus vulgaris*, não só é uma boa planta-isca para obtenção de isolados de membros da classe α -proteobacteria, como também é efetiva na captura de β -proteobacteria. Isso confirma os dados observados neste estudo, já que foi possível obter isolados de diferentes classes de proteobacteria (α , β e γ), além de uma Firmicutes.

Ainda dentro da classe β -proteobacteria foram obtidos isolados do gênero *Variovorax*, correspondendo à 6% do total. Os membros desse gênero, anteriormente alocados dentro do gênero *Pseudomonas*, vêm sendo descritos como agentes oxidadores do H^+ no solo. Há também relatos da utilização de bactérias da espécie *Variovorax paradoxus* na promoção do crescimento vegetal. O aumento do desenvolvimento de raízes primárias de cereais de verão foi observado, como resultado da inoculação das sementes com isolados dessa bactéria (MAIMAITI et al., 2007).

A presença desses microrganismos pode ter sido constatada pela ocupação dos nódulos de forma oportunista, fato este comum quando são isolados microrganismos de nódulos radiculares (BAY et al., 2002; MURESU et al., 2008). Entretanto, os isolados foram amplificados por *primers* específicos para a presença do gene *nifH*, sendo esta uma evidência da capacidade de fixar nitrogênio. Como os resultados não são conclusivos, a realização de novos ensaios, quanto à presença de genes *nod*, aliados à análise de sequências multilocus (*Multilocus Sequence Analysis* - MLSA), pareando os dados de sequenciamento de genes estruturais (e.g. 16S) com genes funcionais (e.g. *nifH*, *nifD*, *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD*), aliada à transformação dos isolados em um vetor com a proteína GFP², podem trazer as bases necessárias para a confirmação da capacidade nodulífera desses isolados (TSIEN, 1998; PHILLIPS, 2001).

² A Proteína Verde Fluorescente, do inglês *Green Fluorescent Protein*, é composta de 238 aminoácidos que exibem brilho verde fluorescente quando expostos à luz azul. Na área de biologia microbiana, microrganismos contendo o gene que codifica para a produção da proteína fluorescente são utilizados para comprovar se um gene em estudo pode ser expresso ou não em um dado microrganismo alvo, atuando como biossensor.

O gênero *Herbaspirillum* correspondeu à 10% do total de isolados obtidos. Esse gênero pertencente à classe β -proteobacteria foi descrito pela primeira vez como uma única espécie, *Herbaspirillum seropedicae*, que inclui bactérias de vida livre e associadas com raízes de várias gramíneas (BALDANI et al, 1986). Essas podem ser encontradas na rizosfera e como endofíticas de uma ampla faixa de hospedeiros, como arroz, cana-de-açúcar, milho e trigo, entre outras (DOBBELAERE et al., 2001) . Os diazotróficos associativos podem fixar N através da FBN e atuar como promotores do crescimento vegetal, pela excreção de compostos como ácidos orgânicos e hormônios (WANG et al., 2000).

Olivares et al. (1996) descreveu o isolamento de *H. seropedicae*, não só de gramíneas como também da leguminosa guandu (*Cajanus cajan*). Entretanto, a origem dos isolados foi apontada como incerta pelo fato de que pequenos pedaços de raízes de milho (*Zea mays*) podem ter contaminado as amostras.

O primeiro relato incontestável de associação de uma bactéria do gênero *Herbaspirillum* com uma planta leguminosa foi descrito por Valverde et al. (2003). Os autores obtiveram vários isolados a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* crescendo em um solo proveniente do Nordeste de Portugal. Um total de seis novos isolados de *Herbaspirillum* foram obtidos. As análises de RFLP-PCR (restriction fragment length polymorfism) e de TP-RAPD (*two-primer randomly amplified polymorphic DNA*) revelaram que os novos isolados são geneticamente semelhantes entre si e contrastantes com as estirpes utilizadas como referência, descritas em associação com gramíneas (*H. frisingense* DSM13128^T, *H. seropedicae* DSM6445^T e *H. rubrisubalbicans* DSM9440^T). Aspectos bioquímicos e morfológicos dos isolados foram caracterizados e a união dos dados possibilitou a proposição de uma nova espécie, denominada *Herbaspirillum lusitanum*.

Portanto, os isolados de nódulos obtidos neste trabalho e classificados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, provavelmente são de bactérias que ocupam e colonizam os nódulos, fixando N atmosférico, mas que não possuem os genes *nod* para nodulação. Como ressaltado para o caso de *Variovorax*, a análise MLSA, em conjunto com a comprovação por transformação em GFP se fazem necessárias, para descartar completamente a possibilidade de que esses isolados sejam BFNNL.

Os isolados da classe α -proteobactéria representaram 28% do total obtido, sendo que todas as sequências caíram dentro do gênero *Rhizobium* sp., tendo uma grande aproximação com *Rhizobium tropici*.

O gênero *Rhizobium* foi descrito por Jordan (1984). Os primeiros relatos taxonômicos foram baseados na planta hospedeira da qual os isolados eram obtidos. Sendo assim, as

BFNNL que infectavam ervilhas, trevos e o feijoeiro comum foram unidas em uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum*, com seus respectivos biovares (*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* e *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*).

A heterogeneidade observada em *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, por diferentes critérios como perfis proteicos (ROBERTS et al., 1980), resistência a antibióticos (BEYNON & JOSEY, 1980), serologia (ROBERT et al., 1985), análise eletroforética multilocus (PIÑERO et al., 1988), hibridização DNA-DNA (SCHOLLA et al., 1990), perfil plasmidial (MARTÍNEZ & PALACIOS, 1984) e estrutura de exopolissacarídeos (ZEVENHUIZEN & BERTOCCHI), levou a crer que se tratava de uma nova espécie. Estudos observaram que esses biovares contêm diferentes plasmídeos simbióticos, que codificam para fatores específicos na nodulação. Essa diferenciação, aliada à heterogeneidade anteriormente descrita culminou com a descrição de uma nova espécie, denominada *Rhizobium tropici* (MARTÍNEZ-ROMERO et al., 1991).

Ao longo do tempo, novos representantes do gênero *Rhizobium* foram descritos, em simbiose com uma ampla faixa de hospedeiros. A taxonomia de BFNNL, dentro da classe α -proteobacteria, descrevia até 2004 sete gêneros predominantes, sendo *Rhizobium* o principal representante, com cerca de 30 espécies catalogadas (GARRITY et al., 2004).

A ocorrência do gênero *Rhizobium* em uma menor frequência relativa quando comparada ao gênero *Burkholderia*, provavelmente se deve a maior capacidade adaptativa do segundo em relação ao primeiro. Esses resultados corroboram os obtidos por Chen et al., (2003) e Chen et al., 2005, que reportaram uma menor frequência relativa de *Rhizobium* em comparação com a β -proteobacteria. Outra explicação plausível é o fato de que até 2001 a maioria das bactérias isoladas e classificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* eram tidas como contaminantes ou simbiontes oportunistas (MOULIN, 2001). Além disso, muitas estirpes de *Rhizobium* (PARKER & LUNK, 2000; PARKER, 2003) e mesmo de *Pseudomonas* publicadas em trabalhos mais antigos foram reclassificadas e realocadas dentro de β -proteobacteria, com ênfase para o gênero *Burkholderia* (COENYE et al., 2001; RIBEIRO et al., 2009).

Por isso em muitos trabalhos, a não disponibilidade de ferramentas como o sequenciamento do gene 16S, além da escassez de informações nos bancos de dados, bactérias pertencentes a grupos diversos foram por vezes classificadas como α -proteobacteria. O desconhecimento da capacidade de nodular e fixar N por indivíduos pertencentes à outras classes de proteobactérias, levou muitos pesquisadores a ignorar e descartar os isolados

obtidos em diversos ensaios, traduzindo-se em uma perda significativa de informação sobre material genético, que poderia estar disponível nos dias de hoje.

A classe γ -proteobacteria, particularmente os gêneros *Pseudomonas* (3%) e *Stenotrophomonas* (6%), representaram 9% dos isolados obtidos. Da mesma forma como aconteceu com a classe β -proteobacteria até 2001, até o ano de 2004 não se acreditava que bactérias da classe γ -proteobacteria poderiam nodular leguminosas e estabelecer simbiose efetiva com essas plantas (BENHIZIA et al., 2004). Os autores descrevem o isolamento de bactérias da classe γ -proteobacteria de solos de uma região semi-árida da Argélia. Um total de 52 isolados foram obtidos de nódulos das leguminosas *Hedysarum spinosissimum*, *H. capitatum*, *H. pallidum* e *H. carnosum*. Essas plantas nas Américas são tidas como sinônimas do gênero *Desmodium*. A análise de ARDRA, RAPD e sequenciamento do gene ribossomal 16S demonstraram que as populações de diazotróficos nodulando *Hedysarum* estão intimamente ligadas geneticamente, mesmo sendo isoladas de solos de diferentes regiões geográficas da Argélia e são predominantemente pertencentes à classe γ -proteobacteria.

Isso poderia explicar a ocorrência dessas γ -proteobacterias nos solos reconstruídos após a mineração de carvão, de onde foram obtidos os isolados deste trabalho, já que em todas as áreas de coleta, há a ocorrência de plantas do gênero *Desmodium* de forma espontânea.

Os avanços moleculares e de técnicas de microscopia têm dado suporte a essas novas descobertas no estudo da simbiose proteobacteria-Leguminosa. Os traços fenotípicos dominantes em legumes parecem ser divididos por um crescente número de taxas filogeneticamente não relatados, permitindo a definição de pelo menos nove grupos monofiléticos (SAWADA et al., 2003), o que expande a possibilidade de descoberta de novos microssimbiontes.

Os mesmos autores têm trabalhado extensivamente na revisão de conceitos relativos à simbiose entre BFNNL e a planta hospedeira, tendo em vista esse incrível e complexo crescimento da descrição, tanto de novos diazotróficos capazes de formar nódulos, quanto de hospedeiros capazes de interagir com esses microssimbiontes.

Novamente, como descrito para β -proteobacteria, é sugerido que a capacidade de nodulação tenha sido adquirida via transferência lateral de genes de bactérias da classe α -proteobacteria.

Considerando que isolados de γ -proteobacteria têm sido isolados de nódulos de *Hedysarum* (BENHIZIA et al., 2004) e que a transferência lateral de genes tem sido detectada em nódulos ocupados dubiamente por BFNNL e simbiontes oportunistas (TRINICK et al., 1989; KAN et al., 2007; SHIRAIISHI et al., 2010; HOQUE et al., 2010), os nódulos podem

ser considerados como “*hot spots*” para a transferência lateral de genes simbióticos. Sobretudo, bactérias endofíticas não simbióticas presentes nos nódulos podem servir de receptores potenciais de genes simbióticos e fonte de novas bactérias simbiontes.

Estirpes das bactérias simbiontes *Phyllobacterium* sp. (CCBAU1168) e *Stenotrophomonas* sp. (CCBAU81347) poderiam estar envolvidas na transferência lateral de genes, como foi observado na simbiose nodulífera entre *Phyllobacterium trifolii* e *Trifolium* sp. e *Lupinus* (VALVERDE et al., 2005).

O gênero *Stenotrophomonas* é principalmente composto por cepas clínicas (COENYE et al., 2004), mas vem sendo relatado crescentemente na última década em associações com o sistema radicular de plantas leguminosas, como *Astragalus bisulcatus* (nome vulgar: alfavaca dos montes, alquitira) (DI GREGORIO et al., 2005), *Phaseolus vulgaris* (COLLAVINO et al., 2010), *Vicia angustifolia* (KAN et al. 2007) e *Acacia* sp. (HOQUE et al., 2010), dentre outras.

A primeira evidência de nodulação de leguminosas por representantes desse gênero foi demonstrada por Kan et al. (2007). Nesse estudo o autor isolou bactérias de nódulos radiculares de *Vicia*, *Oxytropis*, *Medicago*, *Melilotus* e *Onobrychis*, crescendo em solos de altitude da província de Qinghai, no Tibet e em solos de Loess³, como comparação. Baseado nos resultados dos perfis de ARDRA, AFLP, hibridização DNA-DNA e sequenciamento do gene 16S, foram obtidos isolados de *Stenotrophomonas* sp. e *Phyllobacterium* sp. (γ -proteobacteria), juntamente com isolados de α -proteobacteria.

Essas evidências levam a duas hipóteses: i) que os isolados pertencentes ao gênero *Stenotrophomonas* obtidos neste estudo podem ser simplesmente simbiontes oportunistas que ocupam um nicho determinado nos nódulos, ou; ii) que os isolados são capazes de formar nódulos e formar simbiose efetiva com a leguminosa *Phaseolus vulgaris*, o que seria o primeiro relato desta simbiose em solos das Américas, com possível caracterização de novas espécies. Os isolados foram amplificados por *primers* específicos para a presença do gene *nifH*, sendo esta uma evidência da capacidade de fixar nitrogênio. Como descrito anteriormente, novos estudos para constatação da presença de genes *nod*, aliados à análise MLSA e à transformação dos isolados em um vetor com a proteína GFP, podem trazer as bases necessárias para a confirmação da capacidade de nodulação e fixação efetiva de N desses isolados.

O gênero *Pseudomonas* foi durante muitos anos associado à doenças que acometem humanos (PIER, 1985) e outros animais (PASTAN & FITZGETALD, 1989), além de plantas

³ Solo extremamente fértil, de origem sedimentar eólica e de coloração amarela. Encontrado em parte da Europa e principalmente na China.

(KENELLY et al., 2007). Nos últimos anos, tem sido demonstrado que alguns isolados desse gênero atuam como promotores de crescimento quando inoculados em raízes de plantas (BENIZRI et al., 1997), como solubilizadores de fosfatos (DI SIMINE et al., 1998) e formadores de sideróforos no solo (KLOEPPER et al., 1980). Mais recentemente, alguns trabalhos denotam a informação de que bactérias desse gênero vêm sendo isolados de nódulos radiculares em algumas leguminosas (BENHIZIA et al., 2004; IBÁÑEZ et al., 2009).

A capacidade de membros desse gênero em nodular leguminosas foi descrito por Shiraishi et al. (2010). Raízes de *Robinia pseudoacacia* (falsa-acácia) foram coletadas de uma floresta costeira e de uma Estação Experimental da Universidade de Tokyo, no Japão. Após o isolamento, a determinação dos gêneros e espécies foi realizada pela análise de RFLP-PCR e pelo sequenciamento do gene ribossomal 16S. Os testes de inoculação e estudos histológicos revelaram que *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. formaram nódulos e desenvolveram estruturas diferenciadas de nódulos. Além disso, a análise filogenética do gene *nodA* e a análise multilocus de *nodC*, *nifH* e *nifD* revelaram que esses genes funcionais presentes nos isolados de *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp. têm alta similaridade com aqueles presentes em α -proteobacteria, indicando mais uma vez que esses genes foram adquiridos por transferência lateral de plasmídeos no solo.

A verificação da presença de genes *nod*, junto com a análise MLSA e a transformação dos isolados em um vetor com a proteína GFP, podem ajudar a confirmar a capacidade de nodulação e fixação efetiva de N desses isolados.

O gênero *Paenibacillus* está alocado dentro de Firmicutes (NCBI, 2011), mas alguns autores já citam essa bactéria dentro do filo proteobacteria e da classe γ -proteobacteria. Possui espécies conhecidas por aderir às raízes das plantas e invadi-las como patógenos ou atuar como promotor de crescimento de plantas (GOEL et al., 2002; VESSEY, 2003; TIMMUSK et al., 2005). Bactérias do gênero *Paenibacillus* foram isoladas no mesmo experimento citado acima (SHIRAISHI et al. 2010), mas não foram capazes de formar nódulos quando reinoculadas em *Robinia pseudoacacia*.

Ao que tudo indica, esse gênero será o próximo a ter seus aspectos referentes à nodulação desvendados. Na base de dados do NCBI consta o depósito de uma sequência de uma estirpe denominada *Paenibacillus* sp. Up1, que teria sido isolada de nódulos de *Lotus corniculatus* e *Anthyllis vulneraria* na Suécia (AMPOMAH & HUSS-DANELL, 2010 - submetido). Se forem confirmados os dados, seria a primeira vez que uma bactéria dentro de Firmicutes, tem sua fixação de N e nodulação comprovadas.

Isso traria novas perspectivas para este trabalho, já que o DNA do isolado AP6, proveniente da área com aplicação de calcário + cama de aves + semeadura de *Brachiaria* (CCB) foi amplificado pelos *primers* específicos para *nifH*. Resta agora refazer os postulados de Kock para confirmar a nodulação desse isolado, assim como dos outros 22 que tiveram seus genes 16S sequenciados. Logo após, uma reamplificação do gene *nifH*, para confirmação da presença da nitrogenase, junto com a análise MLSA e o emprego de GFP, poderão confirmar a capacidade de fixação de N por esse isolado, o que já seria de grande valia para a tentativa de realocação dessa espécie dentro do filo proteobacteria. Se, além disso, for confirmada a presença de genes *nod*, este poderia ser o primeiro relato desse gênero formando nódulos e fixando nitrogênio em simbiose com uma planta leguminosa.

A frequência relativa dos gêneros, nas áreas avaliadas, é apresentada na figura 19. A ocorrência de *Burkholderia* foi verificada em todas as áreas, a exceção de CA. Esse gênero foi predominante nas áreas CN (86%), MN (55%) e FA (55%).

A ocorrência de *Rhizobium* foi verificada em todas as áreas, a exceção de BR, sendo predominante em TR (29%), CA (67%), CB (67%) e CCB (50%). Essas áreas passaram pelo mesmo processo de reconstrução após a mineração, recebendo solo do mesmo local para a recomposição, de uma área adjacente. Há que considerar aqui que a camada de solo depositada em cada área pode ter diferido de uma área para outra e mesmo dentro da mesma área. Esse solo deveria ter uma população naturalmente maior de *Rhizobium*, em detrimento de outros diazotróficos, o que se reflete nos resultados obtidos. Além disso em CA, CB e CCB, a calagem deve ter criado um microambiente favorável para esse grupo de diazotróficos (ANYANGO et al., 1995).

O gênero *Herbaspirillum* foi predominante na área DR (42%), ocorrendo de forma representativa também em TR. A área DR teve a maior ocorrência de grupos, junto com FA e, parece ser a área mais homogênea, sem predominância de um grupo em particular. A maior ocorrência de *Herbaspirillum* em DR pode estar relacionada às condições benéficas criadas pelo aumento do pH. Além disso, é descrita uma alta afinidade entre *Phaseolus vulgaris* (planta-isca) e o gênero *Herbaspirillum*, que ocuparia os nódulos formados pela simbiose com BFNNL de forma oportunista (VALVERDE et al., 2003). Vale lembrar que a variabilidade nos atributos do solo nessa área foi maior do que no restante das áreas, o que pode estar mascarando o efeito da variabilidade encontrada.

A frequência alta de *Burkholderia* e *Rhizobium* nas áreas CN e MN sugere que esses gêneros são de ocorrência natural nos solos onde não houve exploração pela mineração de

carvão, que são geralmente ácidos, com alta saturação por Al^{3+} e pobres quimicamente (TRAN VAN, 2000).

A sucessão de culturas (FA) parece beneficiar o solo reconstruído pela disponibilização de variada fonte de nutrientes, C e energia, provida por diferentes tipos de palha ao longo dos ciclos de cultivo. O aumento do pH pela calagem, atingindo valores próximos da neutralidade, aliado à fertilidade levemente maior do que em outras áreas, e a presença de substrato variado, parecem favorecer um maior número de grupos de microrganismos.

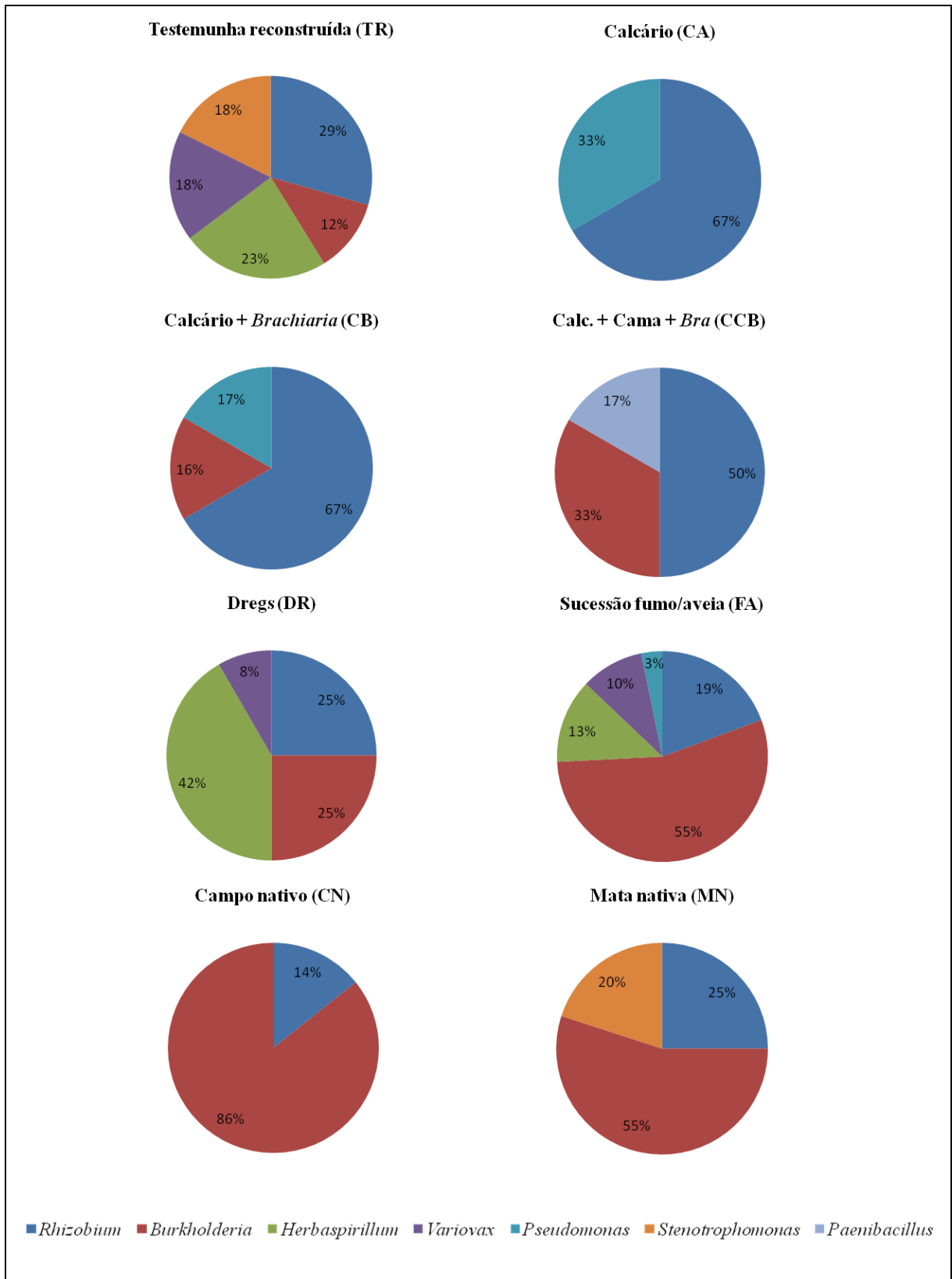


Figura 19: Frequência relativa dos isolados de diazotróficos por gênero entre as áreas reconstruídas após a mineração de carvão, na Bacia Carbonífera Catarinense, com base no resultado do sequenciamento do gene ribossomal 16S. A área *Brachiaria* monocultivo (BR) obteve apenas um isolado classificado como *Burkholderia* sp.

3.5. ANÁLISE DE REDUNDÂNCIA (RDA)

A análise de redundância (RDA) mostrou que os dois primeiros eixos de ordenação explicaram 86,2% da variabilidade áreas-ambiente, acima dos 80% considerados como significativos, evidenciando que o conjunto de variáveis biológicas e ambientais estudados conseguiu explicar a separação das áreas (figura 20).

A análise de redundância revelou que não existe correlação entre a diversidade genética e a densidade de microrganismos e esta não se correlaciona com a diversidade fenotípica. Revelou também que a diversidade filogenética tem uma fraca correlação com diversidade fenotípica.

A variável biológica que mais contribuiu para a separação das áreas foi a diversidade filogenética (IDG_{Dg}), porém não diferindo estatisticamente da diversidade fenotípica (IDF_{Dg}) e do número mais provável (NMP). As variáveis físico-químicas que mais contribuíram para a separação das áreas foram M.O., concentração de P na solução do solo, temperatura, concentração de Al^{3+} na solução do solo, saturação por bases (S) e umidade do solo (Ug), sendo que estas variáveis explicaram 65% da variação ambiental (tabela 9).

Os fatores que mais influenciaram o NMP foram teor de M.O., umidade e temperatura, sendo que quanto maiores foram esses valores, maiores foram os valores de NMP encontrados. Os fatores que mais influenciaram a diversidade fenotípica foram os teores de Al^{3+} , a saturação por bases (S) e os teores de P na solução do solo, sendo que quanto maior a concentração de Al^{3+} e menor o S e o P, maior foi a diversidade fenotípica.

Os fatores que mais influenciaram a diversidade filogenética foram o teor de M.O., umidade e temperatura, sendo que quanto menores esses valores maior foi a diversidade filogenética encontrada.

A maior diversidade filogenética encontrada em TR pode ser explicada pelos baixos teores de M.O., menor umidade e temperatura. Na mesma área, o alto valor de NMP, também é explicado pelas mesmas variáveis. Já o valor de diversidade fenotípica pode ser explicado mas com menor grau de confiabilidade, pelos altos teores de Al^{3+} e pelos baixos níveis de P.

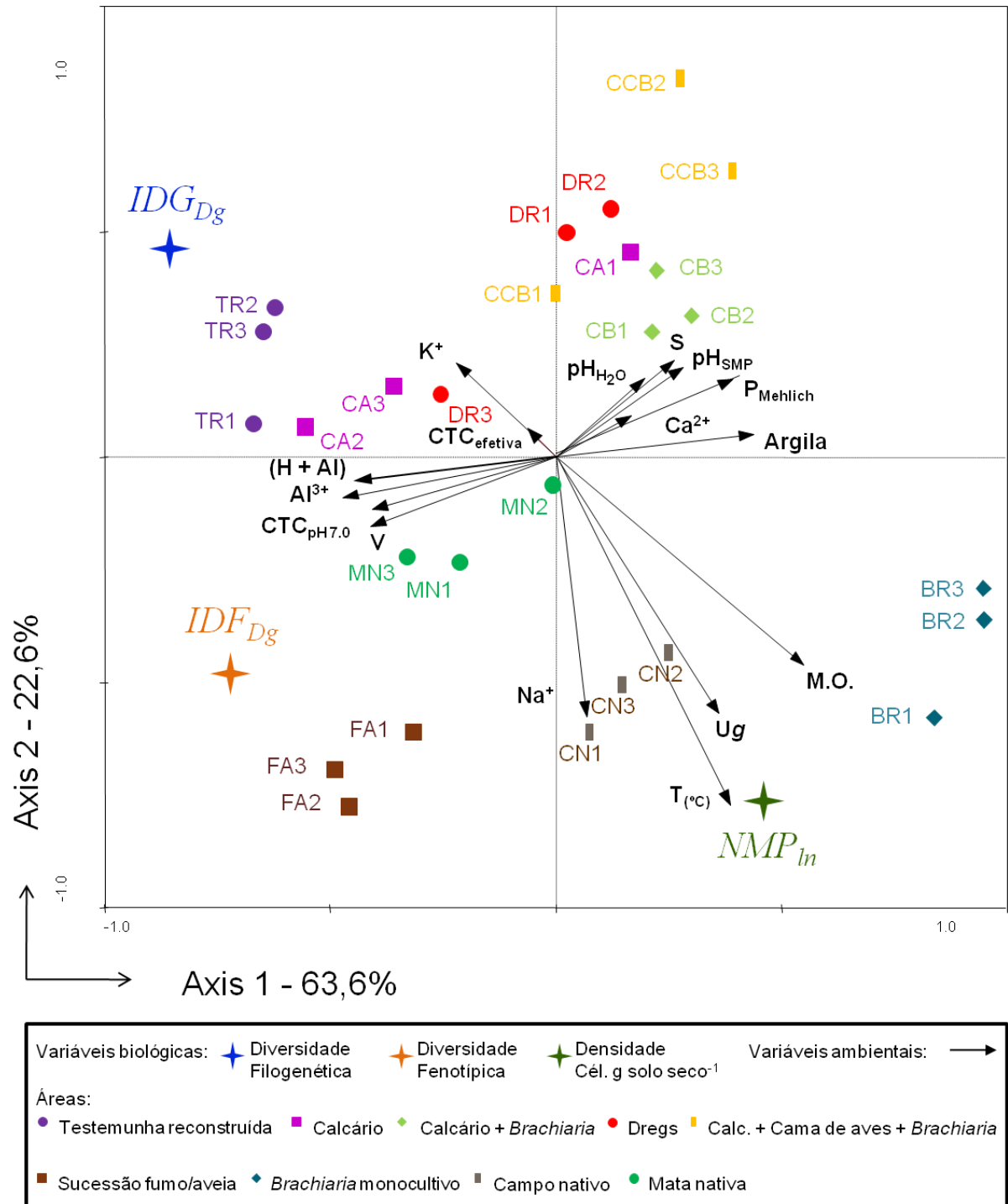


Figura 20: Análise de redundância (RDA), com uma matriz de dados biológicos e uma matriz de dados ambientais, utilizando o teste de Monte Carlo para 499 permutações.

Tabela 9. Análise de redundância (RDA), com uma matriz de dados biológicos e uma matriz de dados ambientais, utilizando o teste de Monte Carlo para 499 permutações.

Variável ambiental	LambdaA	P < 0,1	F
M.O.	0,24	0,004 *	7,97
P _{Mehlich}	0,13	0,012 *	4,91
Temperatura	0,11	0,016 *	4,92
Al ³⁺	0,08	0,056 *	3,80
S	0,05	0,088 *	3,50
Ug	0,04	0,098 *	2,90
Argila	0,04	0,118 ^{NS}	2,29
pH _{H2O}	0,05	0,122 ^{NS}	2,69
Na ⁺	0,03	0,126 ^{NS}	2,61
pH _{SMP}	0,03	0,172 ^{NS}	2,05
K ⁺	0,02	0,218 ^{NS}	1,58
Ca ²⁺	0,02	0,346 ^{NS}	1,08
V	0,01	0,376 ^{NS}	0,85
CTC _{pH 7,0}	0,01	0,476 ^{NS}	0,57
CTC _{efetiva}	0,00	0,512 ^{NS}	0,54
[H + Al]	0,00	0,826 ^{NS}	0,11

* Significativo a 10%; ^{NS} Não significativo.

A diversidade filognética encontrada em FA deve-se em parte ao maiores teores de P, alta saturação por bases e à ausencia de Al³⁺. O alto índice de diversidade fenotípica deve-se aos maiores teores de P e saturação por bases e em parte é devido à ausência de Al³⁺ na solução do solo. O alto valor de NMP é em parte explicado pelos maiores teores de M.O., umidade e, principalmente pela maior temperatura do solo e pela ausência de Al³⁺ na solução.

O baixo índice de diversidade filogenética encontrado em CN é explicado na RDA principalmente pelos maiores teores de M.O. no solo, aliados à maior umidade e maior temperatura do solo. O também baixo índice de diversidade fenotípica sofreu pequena influência dos baixos teores de P e da baixa saturação por bases. Já o alto NMP foi influenciado tanto pela maior temperatura do solo, como pela maior umidade e teores mais elevados de M.O. no solo.

A área BR obteve apenas um isolado de BFNNL, por isso os índices de diversidade filogenética e fenotípica são arbitrários e iguais a 1. A baixa diversidade filogenética pode

estar associada aos maiores teores de M.O., e em menor proporção pelo maior teor de umidade e maior temperatura. O baixíssimo índice de diversidade fenotípica parece ser explicado em parte pelos maiores teores de P e pela maior saturação por bases. Já o NMP extremamente baixo não tem explicação aparente. A baixa densidade, e os baixos índices de diversidade filogenética e fenotípica, estão aliados ao fato de que todos os pontos pertencentes à área BR caíram fora do círculo de correlações canônicas. Portanto, não se pode concluir qual ou quais fatores estariam modulando os baixos valores obtidos para os parâmetros biológicos. As explicações devem ir além dos aspectos físico-químicos e, provavelmente, estão relacionadas a processo adaptativo evolutivo dos microrganismos nessa área, influenciado pelo monocultivo intermitente de *Brachiaria*.

O índice de diversidade filogenética obtido em MN parece ser devido em parte, às maiores concentrações de Al^{3+} , aliado aos baixos teores de P e à pequena saturação por bases. A diversidade fenotípica está relacionada diretamente à baixa saturação por bases e indiretamente aos baixos teores de P, bem como pode ter influência da alta concentração de Al^{3+} em solução. Já o alto valor de NMP obteve uma fraca relação com os teores de M.O. e umidade e com a temperatura do solo.

A baixa diversidade filogenética em CB, no comparativo, parece estar relacionada de forma moderada aos teores de M.O. e umidade, além da temperatura do solo. Já a baixa diversidade fenotípica parece estar intimamente ligada à saturação por bases e aos teores de P no solo. O NMP não apresentou correlação significativa com nenhuma variável ambiental.

A baixa diversidade filogenética encontrada em CCB parece ter uma correlação moderada com os teores de M.O. e umidade e com a temperatura do solo. A diversidade fenotípica parece ter uma correlação ainda que moderada, com os teores de P e com a saturação de bases.

O alto índice de diversidade filogenética, o baixo índice de diversidade fenotípica, além do baixo NMP obtido em CA, inviabiliza a atribuição de peso aos fatores intervenientes, pela alta variabilidade das áreas na compilação dos dados físico-químicos e biológicos, aliada ao pequeno número de isolados obtidos.

A área DR obteve um índice de diversidade filogenética intermediário, aliado a um baixo índice de diversidade fenotípica e um NMP também intermediário. Assim como para CA, a alta variabilidade dos dados obtidos prejudica a atribuição dos fatores ambientais intervenientes.

O perfil *biplot* da RDA permitiu a separação das áreas na compilação da matriz de dados biológicos com a matriz de dados físico-químicos. A área FA formou um grupo

homogêneo e separado das demais áreas, assim como TR e CN. A área BR também formou um grupo homogêneo, mas como todos os pontos caíram fora do círculo de correlações canônicas, a RDA não foi capaz de explicar as causas da variabilidade nessas áreas.

As áreas MN e CB também apresentaram-se homogêneas e separadas entre si e das demais, porém a uma distância relativa menor das áreas que se agruparam, que foram CA, CCB e DR, quando comparadas as áreas FA, TR e CN.

3.6. ANÁLISE DE SIMILARIDADE (ANOSIM)

A análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para comprovar a robustez da separação das áreas pela RDA (tabela 9). Sendo assim, os resultados serão aqui discutidos de forma comparativa.

A área TR mostrou-se totalmente distinta de todas as áreas, com exceção de DR, com a qual demonstrou ter um grau elevado de similaridade. O resultado da ANOSIM para esta área corrobora aqueles obtidos pela RDA, sendo que a união com a área DR pode ser explicada, talvez, pela alta variabilidade dos dados em TR ou pelo fato de que, diferentemente da RDA, a ANOSIM utiliza apenas uma matriz de dados, não fazendo distinção entre dados físico-químicos e biológicos.

A área CA apresentou-se distinta de CCB, CN e MN, com uma clara separação de CB, FA e BR, e com uma fraca separação e grande sobreposição com DR, confirmando os dados obtidos pela RDA. Já a área CB apresentou distinção de CCB, CN e MN, com uma clara separação de FA e BR e com uma fraca separação e grande sobreposição com DR, que pode ser explicada pela variabilidade em DR e pela matriz de dados utilizada.

A área CCB mostrou-se distinta de FA, CN e MN, com clara separação de BR e com fraca separação e grande sobreposição com DR, confirmando os dados da RDA. DR demonstrou uma fraca separação com FA, BR e CN e um elevado grau de similaridade com MN. Novamente, a ligação com maior ou menor grau da área DR com outras áreas parece sofrer interferência da matriz simples de onde foram extraídos os valores e da variabilidade intrínseca da área DR.

A área FA é distinta de CN e MN, com clara separação de BR. E por último, as áreas BR e CN são consideradas contrastantes pela análise de similaridade, como observado na RDA.

Tabela 10. Análise de similaridade (ANOSIM), formada conjunto de variáveis biológicas e ambientais, utilizando o índice de beta diversidade de Bray-Curtis com 999 permutações. A matriz de dissimilaridade gerada por ranqueamento mostra que para valores iguais a 1 ($R = 1$) os grupos são distintos; valores maiores que 0,75 e menores que 1 ($0,75 < R < 1$) indicam uma clara de separação entre grupos; valores maiores de que 0,5 até 0,75 ($0,5 < R \leq 0,75$) indicam grupos separados com alguma sobreposição; valores maiores que 0,25 até 0,5 ($0,25 < R \leq 0,5$) indicam grupos fracamente separados com grande sobreposição e valores menores que 0,25 ($R \leq 0,25$) indicam que quase não há diferenças entre grupos.

Grupos	R	NS (%)	PP	PO	NO
TR x CA	1,000	10	10	10	1
TR x CB	1,000	10	10	10	1
TR x CCB	1,000	10	10	10	1
TR x DR	0,148	40	10	10	4
TR x FA	1,000	10	10	10	1
TR x BR	1,000	10	10	10	1
TR x CN	1,000	10	10	10	1
TR x MN	0,444	10	10	10	1
CA x CB	0,889	10	10	10	1
CA x CCB	1,000	10	10	10	1
CA x DR	0,333	10	10	10	1
CA x FA	0,778	10	10	10	1
CA x BR	0,963	10	10	10	1
CA x CN	1,000	10	10	10	1
CA x MN	1,000	10	10	10	1
CB x CCB	1,000	10	10	10	1
CB x DR	0,370	10	10	10	1
CB x FA	0,926	10	10	10	1
CB x BR	0,889	10	10	10	1
CB x CN	1,000	10	10	10	1
CB x MN	1,000	10	10	10	1
CCB x DR	0,370	10	10	10	1
CCB x FA	1,000	10	10	10	1
CCB x BR	0,852	10	10	10	1
CCB x CN	1,000	10	10	10	1
CCB x MN	1,000	10	10	10	1
DR x FA	0,407	10	10	10	1
DR x BR	0,407	10	10	10	1
DR x CN	0,259	30	10	10	3
DR x MN	0,185	20	10	10	2
FA x BR	0,926	10	10	10	1
FA x CN	1,000	10	10	10	1
FA x MN	1,000	10	10	10	1
BR x CN	1,000	10	10	10	1
BR x MN	1,000	10	10	10	1
CN x MN	1,000	10	10	10	1

* TR - testemunha reconstruída após a mineração de carvão; CA- solo reconstruído com aplicação de calcário; CB - solo reconstruído com aplicação de calcário e sementeira de *Brachiaria brizantha*; CCB - solo reconstruído com aplicação de calcário, cama de aviário e sementeira de *Brachiaria brizantha*; DR - solo reconstruído com aplicação de dregs; FA - solo reconstruído com cultivo em sucessão de fumo/aveia/feijoeiro; BR - solo reconstruído com sementeira de *Brachiaria brizantha*; CN - campo naturalizado; MN - mata nativa.

A base genética da interação do microssimbionte com o hospedeiro é a de dependência da troca de sinais emitidos pelos exsudatos de raízes e a percepção dos fatores de nodulação da bactéria, que são os genes *nod*. Sobretudo, o fato de que algumas leguminosas como *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*, crescendo em diferentes regiões geológicas possam nodular com espécies distintas de diazotróficos, portando genes para nodulação simimilares ou por vezes muito diferentes, demonstra que a associação entre a leguminosa e o microssimbionte é também afetada por questões ambientais (LEI et al., 2008).

No caso específico deste trabalho, a variação inerente ao processo de reconstrução dos solos após a exploração pela mineração de carvão, que caracteriza a heterogeneidade encontrada nas áreas, aliada a mudança de estratégias de manejo do solo e da paisagem ao longo dos anos, deve exacerbar ainda mais a variabilidade, não só da população de BFNNL como da microbiota em geral.

Além disso, há evidências de que a manutenção e o desenvolvimento das comunidades de BFNNL em certas regiões, podem ser regulados pela adaptação, tanto por parte do microssimbionte como da planta hospedeira às condições de solo e de clima (PALMER & YOUNG, 2000; VENTORINO, 2007). As comunidades também podem ser, em alguns casos, reguladas pela evolução e cooperação dos genes responsáveis pela nodulação e dos genes cromossomiais (LAGUERRE et al., 2003; MUTCH & YOUNG, 2004), bem como pela cooperação entre o genótipo do microssimbionte e o genótipo da planta (LAGUERRE et al., 2003; TIAN et al., 2007; LEI et al., 2008).

Por isso, as avaliações e caracterizações dos grupos de BFNNL associados com legumes, verificando a existência ou de não grupos de nodulação cruzada em diferentes regiões ou em diferentes sistemas de manejo do solo na mesma região, podem trazer informações relevantes à respeito da interação entre a leguminosa hospedeira, o microssimbionte e o ambiente. Esse trabalho, se realizado em diversas regiões pode trazer a base para a formação de um banco de dados, que poderá culminar na obtenção de indicadores da qualidade de solo, através da biogeografia de BFNNL.

4. CONCLUSÕES

- A abundância e a diversidade dos diazotróficos foram influenciadas pelo manejo do solo após a reconstrução. As áreas TR, CA, CB, CCB, e DR, que possuem solos reconstruídos com material proveniente de morro decapado adjacente, foram separadas completamente das áreas FA e BR, ambas reconstruídas com solos de suas respectivas topossequências, como evidenciado pela RDA. As áreas MN e CN, com certo nível de antropização, mas que não foram exploradas pela mineração, separaram-se de todas as áreas com solos reconstruídos. Isso evidencia que a dinâmica das populações de diazotróficos é alterada tanto pela exploração de carvão e posterior reconstrução do solo, como também pela forma como o solo é recomposto, além do manejo empregado em cada área.

- Dentre as áreas reconstruídas após a mineração de carvão, a área FA apresentou os maiores valores compilados de abundância, diversidade fenotípica e diversidade filogenética, evidenciando que o manejo com cultivo em sucessão aliado à adubação e correção do solo traz benefícios para o equilíbrio e desenvolvimento da população de BFNINR do solo.

- A espécie *Phaseolus vulgaris* conseguiu separar áreas, tanto em abundância como em diversidade fenotípica e filogenética, demonstrando sua capacidade de utilização como planta-armadilha no estudo de BFNINR oriundas de solo.

- Os diazotróficos mostraram-se capazes de separar áreas com diferentes processos de reconstrução e manejo do solo após a mineração de carvão, lançando luz à ideia de que possam ser utilizados como componentes de bioindicadores da qualidade do solo em áreas degradadas.

- O resultado do sequenciamento evidenciou a presença de bactérias das classes α , β e γ -proteobactéria, tanto nodulíferas como endofíticas oportunistas nas áreas reconstruídas após a mineração, evidenciando a diversidade. O gênero *Burkholderia* foi predominante na maioria das áreas, o que leva a crer que tenha sido favorecido no processo adaptativo evolutivo das áreas reconstruídas após a mineração de carvão. Além disso, como evidenciado nas áreas MN e CN, esse gênero parece ter uma frequência relativa alta e de ocorrência natural nos solos das adjacências do município de Lauro Muller, SC.

- A análise de redundância (RDA) mostrou-se uma ferramenta capaz de captar a variabilidade entre as áreas reconstruídas e as áreas referenciais, sendo de grande utilidade na filtragem dos dados, nos casos em que se avalia um grande número de variáveis, sobretudo com matrizes de dados diferentes.

- Como nova perspectiva, a comparação dos dados do sequenciamento do gene ribossomal 16S com dados do sequenciamento dos genes funcionais (*nifH*, *nifD*, *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nodD*) e a compilação pela análise multilocus (MLSA), poderá trazer as bases necessárias para a confirmação da capacidade nodulífera e de fixação efetiva de N por parte dos isolados tidos até o presente como oportunistas e fixadores endofíticos. A análise de microscopia com GFP pode ser utilizada para ratificar os resultados observados.

5. REFERÊNCIAS

- ACHOUAK, W., CHRISTEN, R., BARAKAT, M., MARTEL, M.H., AND HEULIN, T. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 787-794, 1999.
- AIZAWA, T.; VE, N.B.; VIJARNSORN, P.; NAKAJIMA, M.; SUNAIRI, M. *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminium-tolerant bacteria isolated from Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) growing in highly acidic swamps in South-East Asia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 2036-2041, 2010.
- ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 1298-1307, 2006.
- ALBUQUERQUE, J.A.; ARGENTON, J.; FONTANA, E.C.; COSTA, F.S.; RECH, T.D. Propriedades físicas e químicas de solos incubados com resíduo alcalino da indústria de celulose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 1065-1073, 2002.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley e Sons, 1977. 472p.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4025-4034, 2002.
- ANDRADE, D.S. & HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M. & ARAUJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, Embrapa-SPI, 1995. p. 398-402.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of Rhizobia Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Two Kenyan Soils with Contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4016-4021, 1995.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BARBER, L.E. Enumeration, effectiveness, and pH resistance of *Rhizobium meliloti* populations in Oregon soils. **Soil Science Society of America**, v. 44, p. 537-539, 1980.
- BARNHISEL, R.I.; POWELL, J.L.; AKIN, G.W. & EBELHAR, M.W. Characteristics and reclamation of acid sulfate mine soil. In : KITTRICK, J. A.; FANNING, D. S.; HOSSNER, L.R. **Acid sulfate weathering**. Madison, Soil Science Society America, 1982. p. 37-56.

BARRET, C.F. & PARKER, M.A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus* and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.1198-1206, 2006.

BARRETT, C. F. & PARKER, M.A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 57-65, 2005.

BAI, Y.; D'AOUST, F.; SMITH, D.; DRISCOLL, B. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 230-238, 2002.

BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI A.; SQUARTINI, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p. 462-468, 2004.

BENIZRI, E.; SCHOENY, A.; PICARD, C.; COURTADE, A.; GUCKERT, A. External and internal root colonization of maize by two *Pseudomonas* strains: enumeration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Current Microbiology**, v. 34, p. 297-302, 1997.

BEYNON, J.L. & JOSEY, D.P. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. **Journal of General Microbiology**, v. 118, p. 437-442, 1980.

BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4503-4509, 2000.

BILLINGSLEY, K.A.; BACKUS, S.M.; JUNESON, C.; WARD, O.P. Comparison of the degradation patterns of polychlorinated biphenyl congeners in Aroclors by *Pseudomonas* strain LB400 after growth on various carbon sources. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1172-1179, 1997.

BLAGODATSKAYA, E.V.; BLAGODATSKY, S.A.; ANDERSON, T.H.; KUZYAKOV, Y. Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. **Applied Soil Ecology**, v. 37, p. 95-105, 2007.

BOFF, V.P.; CITADINI-ZANETTE, V.; SANTOS, R. Avaliação das espécies arbóreas do projeto M – Recuperação Piloto de Áreas Mineradas a Céu Aberto, Siderópolis, Santa Catarina, Brasil. In: Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas, 2000, Blumenau, SC.

BOONEN, M.; MERTENS, J.; MICHIELS, J.; SMOLDERS, E. Quantitative PCR assays to enumerate *Rhizobium leguminosarum* strains in soil also target non viable cells and overestimate those detected by the plant infection method. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 2342-2344, 2010.

BORDELEAU & PRÉVOST. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and Soil**, v. 161, p. 115-125, 1994.

BORNHAUSEN, E.B.C. **Uso de oligochaetas como indicador de alteração química em solos submetidos à adição de resíduos de suinocultura e mineração de carvão**. 2010. 49p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Manejo do Solo - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC.

BORNEMAN, J. & TRIPLETT, E. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2647-2653, 1997.

BOWERS, J. & PARKE, J. Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. **Phytopathology**, v. 83, p. 1466-1473, 1993.

BP. **Statistical Review of World Energy**. The Editor BP, 2008. 48p.

BRASIL, MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Balanco Energético Nacional**. Brasília, 2003. 168p.

BRODY, J.R. & KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, v. 36, p. 214-216, 2004.

BROOS, K.; BEYENS, H.; SMOLDERS, E. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 573-579, 2005.

BÜRGMANN, H.; WIDMER, F.; VON SIGLER, W.; ZEYER, J. New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 240-247, 2004.

CAMPELLO, E.F.C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L.E. & MELLO, J.W.V. **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 1998. p. 183-196.

CAMPOS, M.L. **Caracterização de três áreas de solo reconstruído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Muller, SC**. 2000. 62p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC.

CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, J.A.; SOUZA, L.S. Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Muller, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.1123-1137, 2003.

CASTRO-SILVA, M.A.; LIMA, A.O.S.; GERCHENSKI, A.V.; JAQUES, D.B.; RODRIGUES, A.L.; SOUZA, P.L.; RÖRIG, L.R. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 45-47, 2003.

CATTELAN, A.J. & VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 14, p. 125-132, 1990.

CHAUDRI, C.M.; ALLAIN, C.M.G.; BARBOSA-JEFFERSON, V.L.; NICHOLSON, F.A.; CHAMBERS, B.J.; MCGRATH, S.P. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. **Plant and Soil**, v. 221, p. 167-179, 2000.

CHEN, H.; RICHARDSON, A.E.; ROLFE, B.G. Studies of the Physiological and Genetic Basis of Acid Tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1798-1804, 1993.

CHEN, W.M.; WU, C.H.; JAMES, E.K.; CHANG, J.S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 364-371, 2008.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; ARAÚJO, J.L.S.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7461-7471, 2005.

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

CHET, I. & CHERNIN L. Biocontrol, microbial agents in soil. In: BITTON, G. **Encyclopedia of Environmental Microbiology**. John Willey and Sons Inc., New York, USA, 2002. p. 45-465.

CHIEN, C.H.; HONG, C.C.; SOO, P.C.; WEI, Y.H.; CHEN, S.Y.; CHENG, M.L; SUN, Y.M. Functional Expression of phaCAB Genes from *Cupriavidus taiwanensis* Strain 184 in *Escherichia coli* for Polyhydroxybutyrate Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2355-2364, 2010.

CITADINI-ZANETTE, V. **Levantamento florístico da área de recuperação da mineração a céu aberto em Siderópolis, Santa Catarina, Brasil**. Florianópolis: FATMA/IOESC, 1982. 24p.

CITADINI-ZANETTE, V.; BOFF, V.P. **Levantamento florístico em áreas mineradas a céu aberto na região carbonífera de Santa Catarina, Brasil**. Florianópolis: SDM/FEPEMA, 1992. 160p.

CITADINI-ZANETTE, V. **Florística, fitossociologia e aspectos da dinâmica de um remanescente de mata atlântica na microbacia do rio Novo, Orleans, SC**. 1995. 249f. (Tese de Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

CITADINI-ZANETTE, V. Diagnóstico ambiental da região carbonífera no Sul de Santa Catarina: recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão. **Revista Tecnologia e Ambiente**, v. 5, p. 51-62, 1999.

CLARKE, K.R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, p. 117-143, 1993.

COENYE, T.; VANLAERE, E.; LIPUMA, J.J.; VANDAMME, P. Identification of genomic groups in the genus *Stenotrophomonas* using gyrB RFLP analysis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 40, p. 181-185, 2004.

COENYE, T. & VANDAMME, P. Minireview - Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 719-729, 2003.

COENYE, T.; LAESENS, S.; GILLIS, M.; VANDAMME, P. Genotypic and chemotaxonomic evidence for the reclassification of *Pseudomonas woodsii* as *Burkholderia andropogonis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 183-185, 2001.

COHAN, F.M. What are bacterial species? **Annual Review in Microbiology**, v. 56, p. 457-487, 2002.

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 and Fertility of Soils**, v. 46, p. 727-738, 2010.

CORREIA, D.S. **Fauna edáfica como indicadora em ambiente reconstruído após mineração de carvão**. 2010. 56p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Manejo do Solo - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC.

DELLAGLIO, F.; FELIS G.E.; GERMOND, J. Should names reflect the evolution of bacterial species? **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 279-81, 2004.

DEL PAPA, M.F.; BALAGUE, L.J.; SOWINSKI, S.C.; WEGENER, A.; SEGUNDO, E.; ABARCA, F.M.; TORO, N.; NIEHAUS, K.; HLER, A.P.; AGUILAR, O.M.; MARTÍNEZ-DRETS, G.; LAGARES, A. Isolation and Characterization of Alfalfa-Nodulating Rhizobia Present in Acidic Soils of Central Argentina and Uruguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1420-1427, 1999.

DE MAN, J.C. MPN tables, corrected. **European Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 301-305, 1983.

DI GREGORIO, S.; LAMPIS, S.; VALLINI, G. Selenite precipitation by a rhizospheric strain of *Stenotrophomonas* sp. isolated from the root system of *Astragalus bisulcatus*: a biotechnological perspective. **Environment International**, v. 31, p. 233-241, 2005.

DI SIMINE, C.D.; SAYER, J.A.; GADD, M. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, p. 87-94, 1998.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871-879, 2001.

ERNANI, P.R. **Química do Solo e Disponibilidade de Nutrientes**. Lages: O Autor, 2008. 230p.

ESTRELA, M.J.; MUÑOZ, S.; SOTO, M.J.; RUIZ, O.; SANJUÁN, J. Genetic Diversity and Host Range of Rhizobia Nodulating *Lotus tenuis* in Typical Soils of the Salado River Basin (Argentina). **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p. 1088-1098.

EVERITT, B. **Cluster Analysis**. Heinemann Educational Books, London, 135 p, 1974.

FERREIRA, A.S.; LEITÃO, J.H.; SILVA, I.N.; PINHEIRO, P.F.; SOUSA, S.A.; RAMOS, C.G.; MOREIRA, L.M. Distribution of Cepacian Biosynthetic Genes among Environmental and Clinical Strains of the *Burkholderia* Genus and Role of this Exopolysaccharide on Resistance to Stress Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 441-450, 2010.

FRANK, B. Über die parasiten in den wurzelanschwellungen der papilionaceen. **Botanische Zeitung**, v. 37, p. 377-388, 1879.

FRANK, B. Ueber die pilzsymbiose der leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology** – with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw - Hill Book Company, 1928. 145p.

GALATTO, S.L.; LOPES, R.P.; BACK, A.J.; BIFF, D.Z.; SANTO, E.L. Emprego de coberturas secas no controle da drenagem ácida de mina – estudos em campo. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 12, p. 229-236, 2007.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ACINAS, S.G.; ANTÓN, A.I.; VALERA, A.R. Use of the 16S - 23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, p. 55-64, 1999.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic Outline of Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Second edition. New York: Springer-Verlag, 2004. 401p.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O.; **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª edição atualizada e ampliada. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

GERMANO, M.G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F.L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 217-229, 2006.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRAT, B.G. COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; VAN de PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 733-739, 2005.

GOWER, J.C. & LEGENDRE, P. Metric and Euclidean properties of dissimilarity coefficients. **Journal of Classification**, v.3, p.5-48, 1986.

GOEL, A.K.; SINDHU, S.S.; DADARWAL, K.R. Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp. antagonistic to fungal pathogens. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 391-396, 2002.

GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 475-484, 1992.

GRANGE, L. & HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1389-1398, 2004.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P.H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 867-876, 2007.

GRAY, J.X.; DJORDJEVIC, M.A.; ROLFE, B.G. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 193-203, 1990.

GU, J.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. **Letters in Applied Microbiology - The Society for Applied Microbiology**, v. 44, p. 286-292, 2007.

HERRERA-CERVERA, J.A.; CABALLERO-MELLADO, J.; LAGUERRE, G.; TICHY, H-V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; LIVARES, J.; SANJUÁN, J. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p. 87-97, 1999.

HIRSCH, P.R. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. **New Phytologist**, v. 133, p. 159-171, 1996.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 149, p. 103-109, 1993.

HUNGRIA, M. & ARAUJO, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, Embrapa-SPI, 1995. 542p.

IBAÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M.L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, p. 49-55, 2009.

IEA. **Energy Security and Climate Policy**. IEA publishing edition, 2007. 149p.

JORDAN, D.C. Family III. *Rhizobiaceae*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 235-244.

KENNELLY, M.M.; CAZORLA, F.M.; VICENTE, A.; RAMOS, C.; SUNDIN, G.W. **Plant Disease**, v. 91, p. 1-14, 2007.

KLEIN, A.S., CITADINI-ZANETTE, V., SANTOS, R., LOPES, R. P., PEREIRA, J. L. Levantamento florístico-fitosociológico em áreas de mineração de carvão a céu aberto, Urussanga, Santa Catarina, Brasil. In: Simpósio Nacional e Congresso Latino-Americano de Recuperação de Áreas Degradadas, 2005, Curitiba, PR.

KLEIN, A.S. **Áreas degradadas pela mineração de carvão no Sul de Santa Catarina: vegetação versus substrato**. 2006. 93p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC.

KOPPE, J.C. & COSTA, J.F.C. Mineração. In: TEIXEIRA, E.C. **Meio ambiente e carvão: impactos da exploração e utilização**. Porto Alegre: FEPAM, 2002. p.15-27.

KUZYAKOV, Y. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1363-1371, 2010.

LAGUERRE, G.; LOUVRIER, P.; ALLARD, M.R.; AMARGER, N. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae for nodulation of host legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2276-2283, 2003.

LAMBAIS, M.R; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; BÜLL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P. DA; CARDOSO, E.J. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: SBCS, 2005, v. 4, p. 43-84.

LECKIE, S.E. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. **Forest Ecology and Management**, v. 220, p. 88-106, 2005.

LEDIN, M & PEDERSEN, K. The environmental impact of mine wastes - Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. **Earth-Science Reviews**, v. 41, p. 67-108, 1996.

LEI, X.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. **Archives of Microbiology**, v. 190, p. 657-671, 2008.

LIAO, M. & XIE, X.M. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 217-223, 2007.

LOPES, R.P.; et al. Estudos geoquímicos e estruturais aplicados à recuperação de área degradada pela extração de carvão – Campo Morozini. In: XX Encontro Nacional de Minérios e Metalurgia Extrativa, 2004, Florianópolis, SC.

LORCH, H.J.; BECKISER, G.; OTTOW, J.C.G. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: NANNIPIERI, K.A.P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 162-170.

MAÇANEIRO, K.C. **Efeito da calagem e da adubação orgânica no estabelecimento de gramíneas em área de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Muller, SC**. 2001. 58 p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC.

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 179p.

MAIMAITI, J.; ZHANG, Y.; YANG, J.; CEN, Y.P.; LAYZELL, D.B.; PEOPLES, M.B.; DONG, Z. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 435-444, 2007.

MALIK, N.S.A; CALVERT, S.E.; BAUER, W.D. Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. **Plant Physiology**, v. 84, p. 266-271, 1987.

MARTÍNEZ, E. & PALACIOS, R. Is it necessary to improve nitrogen fixation of bean in agricultural fields in México? In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E. **Advances in nitrogen fixation research**. Nijhoff, Junk & Pudoc, The Hague. 1984. p. 60.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v. 252, p. 11-23, 2003.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 417-426, 1991.

MARTINS, R. **Florística, estrutura fitossociológica e interações interespecíficas de um remanescente de floresta ombrófila densa como subsídio para recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão, Siderópolis, SC**. 2005. 101f. (Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

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 de 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.

MENDONÇA, D. **Características biológicas indicadoras de recuperação da qualidade de um solo reconstruído após a mineração de carvão a céu aberto com a adição de calcário e esterco animais**. 2002. 54p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós- Graduação em Ciências Agrárias - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC.

MEYNELL, G.G. & MEYNELL, E. **Theory and Practice in Experimental Bacteriology**. XII edition. London: Cambridge University Press, 1965. 50p.

MHANDI, R.; LAGUERRE, G.; AOUANI, M.H.; MARS, M.; AMARGER, N. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, p. 77-84, 2002.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O.; **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª edição atualizada e ampliada. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, p. 121-132, 2002.

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

MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOGUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, p. 383-400, 2008.

MUTCH, L.A.; YOUNG, J.P.W. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae on wild and cultivated legumes. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2435-2444, 2004.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655-670, 2003.

NETO, A.L. **Métodos para reabilitação de solo reconstruído após mineração de carvão**. 2006. 83p. (Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC.

NETO, A.L. Atributos físicos do solo em área de mineração de carvão influenciados pela correção da acidez, adubação orgânica e revegetação. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 32, p. 1379-1388, 2008.

NORMAND, P.; ORSO, S.; COURNOYER, B.; JEANNIN, P.; CHAPELON, C.; DAWSON, J.; EVTUSHENKO, L.; MISRA, A.K. Molecular phylogeny of the genus *Frankia*

and related genera and emendation of the family Frankiaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 1-9, 1996.

OGRAM, A. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1499-1504, 2000.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

PALMER, K.M. & YOUNG, J.P. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations in arable soils than in grass soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2445-2450, 2000.

PANKHURST, C.E.; LYNCH, J.M. The role of soil in sustainable agriculture. In: PANKHURST, C. E.; DOUBE, B.M.; GUPT, V.V.S.R.; GRACE, P.R. **Soil biota: management in sustainable farming systems**. Victoria: Csiro, 1994. P. 3-9.

PARKER, M.A. A widespread Neotropical *Bradyrhizobium* lineage associated with *Machaerium* and *Desmodium* (Papilionoideae). **Plant and Soil**, v. 254, p. 263-268, 2003.

PARKER, M. Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* species in northern Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2044-2048, 2002.

PARKER, M.A. & LUNK, A. Relationships of bradyrhizobia from *Platypodium* and *Machaerium* (Papilionoideae: tribe Dalbergieae) on Barro Colorado Island, Panama. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1179-1186, 2000.

PASTAN, I & FITZGETALD, D. *Pseudomonas* exotoxin: chimeric toxins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 15157-15160, 1989.

PFADENHAUER, J.S. & WINKLER, S. **Estudos sobre a problemática ecopaisagística das áreas de deposição de rejeitos de mineração**. Porto Alegre: FATMA/UFRGS, 1978. p. 41-269.

PHILLIPS, G. Green fluorescent protein - a bright idea for the study of bacterial protein localization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 9-18, 2001.

PIER, G.B. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 151, p. 575-580, 1985.

PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2825-2832. 1988.

POOLE, P. & ALLAWAY, D. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. **Advances in Microbial Physiology**, v. 43, p. 117-163, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org>. 2008.

RANJARD, L.; BROTHIER, E.; NAZARET, S. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5334-5339, 2000a.

RANJARD, L.; POLY, F.; COMBRISSE, J.; GOURBIÈRE, F.; RICHAUME, A.; THIOULOUSE, J.; NAZARET, S. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). **Microbial Ecology**, v. 39, p. 263-272, 2000b.

RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIÈRE, F.; THIOULOUSE, J.; LINET, P.; RICHAUME, A. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg (II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 31, p. 107-115, 2000c.

REIS-JÚNIOR, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F. QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.; FARIA, S.M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, L.P.W.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, v. 186, p. 934-946, 2010.

REMOR, R. **Regeneração Natural em Blocos Experimentais de *Mimosa scabrella* Benth. (Bracatinga): Subsídios para recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão a céu aberto no sul do estado de Santa Catarina, Brasil.** 2004. 109f. (Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais) – Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC.

RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 297-306, 2009.

ROBERT, F. M., AND E. L. SCHMIDT. Somatic serogroups among 55 strains of *Rhizobium phaseoli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 519-523. 1985.

ROBERTS, G.P.; LEPS, W.T.; SILVER, L.E.; BRILL, W.J. Use of two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 414-422, 1980.

ROSELLÓ-MORA, R. & AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 39-67, 2001.

SANCHEZ, J.C.D. & FORMOSO, M.L.L. **Utilização do carvão e meio ambiente.** Porto Alegre: Cientec, 1990. 34p.

SANTOS, R. **Reabilitação de ecossistemas degradados pela mineração de carvão a céu aberto em Santa Catarina, Brasil**. 2003. 115f. (Tese de Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

SANTOS, R.; CITADINI-ZANETTE, V.; LEAL FILHO, L.S.; KLEIN, A.S.; MARTINS, R. Composição florística e estrutura fitossociológica de um fragmento de floresta ombrófila densa, como subsídios para reabilitação de ecossistemas degradados, região Carbonífera Catarinense, Brasil. In: Encontro Nacional de Tratamento de Minérios e Metalurgia Extrativa, 2004, Florianópolis, SC.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 49, p. 155-179, 2003.

SCHOLLA, M.H.; MOOREFIELD, J.A.; ELKAN, G.H. DNA homology between species of the rhizobia. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 13, p. 288-294, 1990.

SESSITSCH, A. & PUSCHENREITER, M. Endophytes and rhizosphere Bacteria of plants growing in heavy metal-containing soils, In: DION, P. & NAUTIYAL, C.S. **Soil Biology: Microbiology of extreme soils**. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, Germany, 2008. p. 317-332.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 269-274, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. Núcleo Regional Sul. Comissão de Química e de Fertilidade do Solo - RS/SC. **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10ª edição. Porto Alegre: Editora SBCS, 2004. 400p.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. **Methods in legume- *Rhizobium* technology**. Hawaii: Niftal Project, 1985. 367p.

SOUZA, D.G.; KLAUBERG FILHO, O.; SANTOS, J.C.P. ; ALVES, M.V. ; CORREIA, D.S.; BORNHAUSEN, E.B.C.; MIQUELLUTI, D.J. Diazotróficos associativos presentes no solo reconstituído após a mineração de carvão no Sul Catarinense. In: XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2009, Fortaleza, CE.

SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, 2001. 146p.

STANLEY, J. & CERVANTES, E. A review: Biology and genetics of the broad host range *Rhizobium* sp. NGR234. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 9-19, 1991.

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. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1107-1120, 2008.

STOWERS, M.D. Carbon Metabolism in *Rhizobium* Species. **Annual Review of Microbiology**, vol. 39, p. 89-108, 1985.

TALBI, C.; DELGADO, M.J.; GIRARD, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; BEDMAR, E.J. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *phaseolus vulgaris* are present in moroccan soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4587-4591, 2010.

TAMURA K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted), 2011.

TAN, Z.Y.; WANG, E.T.; PENG, G.X.; MING, E.Z.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.X. Characterization of bacteria isolated from wild legumes in the north-western regions of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1457-1469, 1999.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

TIAN, C.F.; WANG, E.T.; HAN, T.X.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. Genetic diversity of rhizobia associated with *Vicia faba* in three ecological regions of China. **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 273-282, 2007.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E.G.H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7292-7300, 2005.

TORSVIK, V. & ØVREÅS, L. Microbial diversity, life strategies, and adaptation to life in extreme soils. In: DION, P. & NAUTIYAL, C.S. **Soil Biology: Microbiology of extreme soils**. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, Germany, 2008. p. 15-44.

TRAN VAN, V.; BERGE, O.; NGO, S.; BALANDREAU, J.; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain with of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. **Plant Soil**, v. 281, p. 273-284, 2000.

TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L. & ROMANI, V.L.M. Efeito de fatores do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, SP, 1992. p. 59-72.

TSIEN, R.I. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 509-544, 1998.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAINO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J.M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1985-1989, 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, 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. 53, p. 1979-1983, 2003.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 507-512, 2002.

VENTORINO, V.; CHIURAZZI, M.; APONTE, M.; PEPE, O.; MOSCHETTI, G. Genetic diversity of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulating plants of *Vicia faba* in the Vesuvian area. **Current Microbiology**, v. 55, p. 512-517, 2007.

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

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164p.

VINCENT, J.M. Influence of Calcium and Magnesium on the Growth of *Rhizobium*. **Journal of General Microbiology**, v. 28, p. 653-663, 1962.

WALDEMAR, C.C. & HERRERA, J. Avaliação do potencial de utilização do Dregs e do grãos como corretivo de acidez e fertilizante na agricultura. In: XIX Congresso Anual da ABCP, 1986, São Paulo, SP.

WANG, C.; KNILL, E.; GLICK, B.R.; DÉFAGO, G. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid ACC deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its derivative CHA96 on their plant growth promoting and disease suppressive capacities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 898-907, 2000.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

WONG-VILLARREAL, A. & CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 35-43, 2010.

WONG, P.P. & EVANS, H.J. Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. **Plant Physiology**, v. 47, p. 750-755, 1971.

YOUNG, J.P.W.; JAMES, E.K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7461-7471, 2005.

ZAHARAN, H.H. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 968-989, 1999.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. & BERTOCCHI, C. Polysaccharide production by *Rhizobium phaseoli* and the typing of their excreted anionic polysaccharides. **FEMS Microbiology Letters**, v. 65, p. 211-218, 1989.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, 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.

ZHAO, L.; DENG, Z.; YANG, W.; CAO, Y.; WANG, E.; WEI, G. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 468-477, 2010.

6. ANEXOS

Anexo 1. Dados brutos da presença e ausência de nódulos radiculares. Resultados de três amostras por área, cinco diluições com quatro repetições.

Tratamento	P	Diluição																				TOTALS(ni)	total(ni Ts)																				
		10(-1)				10(-2)				10(-3)				10(-4)				10(-5)																									
		repA	repB	repC	repD	repA	repB	repC	repD	repA	repB	repC	repD	repA	repB	repC	repD	repA	repB	repC	repD																						
Testemunha 1	7	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	3	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	
Testemunha 2	12	1	1	0	0	1	0	1	1	1	2	0	0	1	3	1	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	
Testemunha 3	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	36
Calcário 1	2	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3									
Calcário 2	9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1									
Calcário 3	11	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	8								
Calcário + Brachiaria 1	3	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3									
Calcário + Brachiaria 2	6	1	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5									
Calcário + Brachiaria 3	8	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	11								
Calcário + Cama + Brachiaria 1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1									
Calcário + Cama + Brachiaria 2	4	1	2	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6									
Calcário + Cama + Brachiaria 3	5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8								
DREGS 1	10	0	0	1	2	1	1	1	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7									
DREGS 2	13	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2									
DREGS 3	15	3	6	1	2	0	0	1	1	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	21								
Sucessão Fumo/Aveia 1	1	1	1	1	2	1	3	2	5	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26									
Sucessão Fumo/Aveia 2	2	1	3	1	2	1	2	1	4	2	6	1	2	1	3	1	3	1	3	2	4	1	3	1	3	0	0	0	0	0	2	5	0	43									
Sucessão Fumo/Aveia 3	3	1	3	1	3	1	2	5	8	1	2	1	1	2	5	2	4	0	0	1	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	32	101								
Brachiaria Monocultivo 1	1	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3									
Brachiaria Monocultivo 2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1									
Brachiaria Monocultivo 3	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5								
Campo Nativo 1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5									
Campo Nativo 2	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3									
Campo Nativo 3	3	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	20									
Mata 1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4									
Mata 2	2	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	13										
Mata 3	3	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	7	24										

*Diluições com resultado positivo para nodulação grifadas em amarelo. Diluições com resultado negativo para nodulação grifadas em azul. De um total de 540 repetições 234 apresentaram nódulos.