



JULIANA VOLPI EMRICH PINTO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE ÁREA DE
MINERAÇÃO DE FERRO**

LAVRAS – MG

2017

JULIANA VOLPI EMRICH PINTO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Bioquímicos do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

LAVRAS - MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pinto, Juliana Volpi Emrich.

Caracterização e identificação de bactérias diazotróficas associativas oriundas de área de mineração de ferro / Juliana Volpi Emrich Pinto. - 2017.

59 p. : il.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Área de mineração. 2. *Gluconacetobacter diazotrophycus*. 3. *Burkholderia*. I. Moreira, Fátima Maria de Souza. . II. Título.

JULIANA VOLPI EMRICH PINTO

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO**

**CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF ASSOCIATIVE
DIAZOTROPHIC BACTERIA FROM THE IRON MINING AREA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Bioquímicos do Solo, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de setembro de 2017.

Profa. Dra. Vera Lúcia Divan Baldani EMBRAPA

Prof. Dr. Jessé Valentim dos Santos UFLA

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

LAVRAS – MG

2017

A Deus, a minha mãe Eliana e meu pai Júlio, ao meu irmão
Henrique, pela confiança, apoio e amor sempre.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela chance de continuar vivendo através do milagre de restabelecimento da minha saúde.

A minha mãe pelas lições de amor, paciência e ajuda, ao meu pai pelo exemplo de pessoa, profissional e lutador e ao meu irmão pelo apoio, carinho e admiração.

A minha família pela união e por permanecerem ao meu lado diante de toda e qualquer dificuldade, as minhas avós pelas orações e meus avôs *in memoriam*.

Ao meu namorado Juliano pelo amor e compreensão e aos meus amigos de caminhada que dividiram comigo momentos de alegria e estresse, desabafos, conversas e principalmente as oscilações de humor: Raquel, Aline, Jordana, Jessé, Brenda, Anita e José Ferreira, vocês fizeram a diferença.

Ao meu tio Prof. Dr. Antônio Eduardo Furtini Neto que confiou em minha capacidade e me despertou o gosto pela Ciência do solo, me mostrando um novo horizonte.

A orientadora Profa. Fatima Maria de Souza Moreira que dedicou seu tempo e conhecimento. Ao Jessé Valentim dos Santos e a Brenda dos Santos pela ajuda na execução do trabalho.

Às pós-doutorandas Amanda Guimarães, Márcia Ruffini e Silvia Longatti pelos esclarecimentos.

À Universidade Federal de Lavras – UFLA, em especial ao Programa de pós-graduação em Ciência do Solo, pela estrutura, pelo curso e por me receber como aluna.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, à empresa VALE, ao CNPq, CAPES, FAPEMIG pelo financiamento do projeto.

A todos os professores e funcionários do departamento de Ciência do Solo.

Ao corpo técnico dos Laboratórios do departamento de Ciência do Solo, especialmente aos técnicos Manuel e Marlene do Laboratório de Biologia, Microbiologia e processos bioquímicos do solo, pelo desempenho da função sendo além de técnicos amigos.

Às meninas dos serviços gerais que mantêm o espaço físico do departamento limpo e em ordem, cuidando da gente com carinho e nos proporcionando o famoso cafezinho do DCS.

Enfim, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente a chegar até aqui, que passaram por minha vida durante estes quase três anos, mostrando que com o mestrado não crescemos só profissional ou intelectualmente, mas sim como pessoas.

ESSA VITÓRIA É NOSSA!

“A verdadeira coragem é ir atrás de seu sonho mesmo quando todos dizem que ele é impossível”.

Cora Coralina

RESUMO

O solo é um ambiente afetado por atividades humanas; várias delas como agricultura, agropecuária, urbanização e mineração são as causas de degradação do mesmo sendo esta última a maior responsável pela remoção, exposição e contaminação do solo, redução da vegetação, diminuição ou até mesmo extinção da biodiversidade edáfica. A atividade mineradora é essencial para a vida moderna, para o desenvolvimento socioeconômico de um país e para tanto necessita funcionar de forma sustentável. Levantamento da diversidade de organismos antes dos processos de mineração pode ser uma ferramenta-chave para posterior reabilitação destas áreas. Muitos métodos são utilizados para a reabilitação de áreas degradadas, sendo o principal deles a revegetação com espécies nativas ou não, que pode ser potencializada se combinada com microrganismos inoculados. Microrganismos responsáveis por processos biológicos de alta relevância como a fixação biológica de nitrogênio mediada por bactérias diazotróficas, a produção de hormônios, sideróforos e o aumento da resistência a patógenos, também ligados a estas bactérias, são muito importantes para que haja resposta positiva na reabilitação das áreas e estabilidade das espécies vegetais ali inseridas. Ainda se encontra deficiente o número de estudos com associativas em áreas de mineração de ferro. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas associativas de quatro áreas no Quadrilátero Ferrífero. O solo foi coletado em quatro fitofisionomias distintas: Mata Atlântica, Cerrado, Canga e Capim. Os isolados foram obtidos através de suspensão de amostras de solo inoculados em meio semissólido NFb e FAM, repicados sucessivas vezes em placas de Petri com os mesmos meios sólidos até a obtenção de colônias puras. Foram obtidos 37 isolados com representantes em todas as áreas, exceto Mata Atlântica. Os dois meios favoreceram o crescimento bacteriano típico de diazotróficos, mas não só associativos, como também nodulíferos e endofíticos. A caracterização fenotípica foi através de caracterização cultural em meio Batata e a identificação através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. Houve predomínio do gênero *Burkholderia* e da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, sendo a maior diversidade e densidade provenientes da fitofisionomia de Capim. Os gêneros e espécies obtidos neste trabalho podem ser usados em estudos futuros com interesse biotecnológico e ambiental.

Palavras-chave: Área de mineração. *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Burkholderia*.

ABSTRACT

The soil is an environment severely affected by human activities such as agriculture, farming, urbanization and mining that causes its degradation. For instance, mining is responsible for the removal, exposure and contamination of the soil, reduction of vegetation, decrease or even extinction of biodiversity. Mining activity is essential for modern life, for the socioeconomic development of a country, so it needs to function in a sustainable manner. Diversity survey before the degradation processes generated by the mining industry is essential for later rehabilitation of these areas. Many methods are used for the rehabilitation of degraded areas, the main one being revegetation with native species or not, which can be potentiated when combined with inoculated microorganisms. Microorganisms responsible for biological processes of high relevance such as biological fixation of nitrogen mediated by diazotrophic bacteria, and the production of hormones, siderophores and increased resistance to pathogens also linked to these bacteria are very important for a positive response in the rehabilitation of these areas and the stability of the plant species inserted therein. The number of studies with associative diazotrophs in areas of iron mining is still deficient. The objective of this work was to isolate, characterize and identify associative diazotrophic bacteria from four areas in the Quadrilátero Ferrífero. The soil was collected in four different phytophysionomies: Atlantic Forest, Cerrado, Canga and Capim. The isolates were obtained through soil solution and inoculated in semi solid medium NFb and FAM, repeated successive times in Petri plates with the same solid media until obtaining pure colonies. We obtained 37 isolates with representatives in all areas except Atlantic Forest. Both media favored bacterial growth typical of diazotrophs, but not only associative, also legume Inodulating and endophytic bacteria. The phenotypic characterization was through cultural characterization in potato medium and identification through the partial sequencing of the 16S rDNA gene. There was a predominance of *Burkholderia* and *Gluconacetobacter diazotrophicus*, being the greatest diversity and density from the Capim phytophysionomy. The genera and species obtained in this work can be used in future studies with biotechnological and environmental interest.

Keywords: Mining area. *Gluconacetobacter-diazotrophicus*. *Burkholderia*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Mapa mostrando a localização dos pontos de coleta nos municípios de Brumadinho-MG e Nova Lima-MG nas fitofisionomias de Cerrado (CE), Canga (CR), Mata Atlântica (F) e Capim (CA).....	53
Figura 2-	Aspecto das colônias em meio Batata de estirpes isoladas na fitofisionomias em estudo.....	54
Tabela 1-	Análise química e física dos solos coletados nas áreas sob vegetação de Canga, Capim, Cerrado e Mata Atlântica no Centro de Tecnologia de Ferrosos – CTF Miguelão e na Mina Córrego do Feijão, da Vale S/A.)...	49
Tabela 2-	Porcentagem de frascos positivos de bactérias diazotróficas associativas em área de mineração de ferro (método semiquantitativo).....	49
Tabela 3-	Densidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas nos períodos seco e úmido obtidas pelo método de número mais provável.....	50
Tabela 4-	Caracterização morfológica das estirpes.....	51
Tabela 5-	Origem e identificação das estirpes isoladas das fitofisionomias sob influência de mineração de ferro.....	52

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	11
1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Mineração no Brasil.....	13
2.1.1	Minério de Ferro.....	14
2.2	Geossistemas Ferruginosos – Quadrilátero Ferrífero.....	14
2.2.1	Canga.....	15
2.2.2	Cerrado.....	15
2.2.3	Mata Atlântica.....	16
2.3	Fixação Biológica de Nitrogênio.....	17
2.3.1	Importâncias dos microorganismos diazotróficos em ecossistemas nativos ou não.....	19
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	23
	REFERÊNCIAS.....	24
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	31
	ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO.....	32

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A mineração é uma atividade para o desenvolvimento de muitos países, incluindo-se o Brasil.

A produção mineral brasileira de 2016 em dólares foi de 24 bilhões sem incluir petróleo e gás - IBRAM fevereiro de 2017. O Estado de Minas Gerais detém a maior produção de minério de ferro do país (IBRAM, 2012). O Quadrilátero Ferrífero está localizado no centro-sul de Minas Gerais, considerado a principal unidade ferrífera do Brasil, sendo a formação ferrífera predominante desta área denominada canga. Possuindo alta geodiversidade, a canga é uma complexa evolução geológica da paisagem o que favorece o aumento, estabelecimento e a manutenção da biodiversidade (MARTINS, 2000).

A abertura das cavas de extração de minério de ferro são altamente degradativas, tendo em vista que são áreas naturais. Sendo esse um hotspot, sua vegetação associada com alta diversidade e possíveis abrigos de espécies raras, as perdas podem ser irreparáveis.

Uma gama de microrganismos do solo está envolvida em diversos processos biológicos desenvolvendo papéis importantes relacionados à ciclagem de nutrientes e também degradação de xenobióticos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As bactérias diazotróficas associativas são capazes de reduzir enzimaticamente o N_2 à amônia e outras formas combinadas que, por sua vez, são mais bem absorvidas pelas plantas e utilizadas para seu próprio metabolismo em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Em áreas perturbadas, com solos e substratos pobres em nutrientes, com baixo teor de matéria orgânica, comumente encontrados em áreas mineradas, a FBN pode ser estimulada, beneficiando os processos de revegetação nestas áreas.

Neste intuito, o presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas associativas das fitofisionomias Canga, Capim, Mata Atlântica e Cerrado, presentes no Quadrilátero ferrífero, tendo em vista posteriormente a utilização destes isolados em projetos de recuperação ambiental. Este trabalho faz parte de um projeto maior denominado “Diversidade de plantas e de organismos dos solos com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental em Minas Gerais”.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mineração no Brasil

A mineração é considerada como uma atividade fundamental para o desenvolvimento econômico e social de muitos países, levando em consideração que os minerais são essenciais para a vida moderna (FARIAS, 2002). Por ser um dos setores básicos da economia do país, a mineração contribui de forma decisiva para o desenvolvimento, bem-estar e a melhoria da qualidade de vida da população, desde que seja operada com responsabilidade social, respeitando os preceitos do desenvolvimento sustentável. A busca e o aproveitamento de recursos minerais estão intimamente ligados à história do Brasil, pois estes sempre contribuíram para a economia, ocupação territorial e desenvolvimento nacional. (FARIAS, 2002).

O Brasil possui importantes depósitos minerais, sendo essa reserva considerada expressiva quando relacionada com as demais reservas mundiais. As reservas mundiais de minério de ferro são da ordem de 190 bilhões de toneladas. As reservas lavráveis brasileiras, com um teor médio de 49,0% de ferro, representam 11,9% das reservas mundiais. Os principais estados brasileiros detentores de reservas de minério de ferro são: Minas Gerais (72,5% das reservas e teor médio de 46,3% de Fe), Mato Grosso do Sul (13,1% e teor médio de 55,3%) e Pará (10,7% e teor médio de 64,8%).

A produção mundial de minério de ferro em 2014 está estimada em 3,2 bilhões de toneladas (3,5% maior que a registrada em 2013). O Brasil foi o terceiro maior produtor mundial (12,8 %) em 2014 tendo apresentado um aumento de 15,5% em 2015 (DNPM/DIPLAM, 2015). As mineradoras, que são representadas pelo Instituto Brasileiro de Mineração, em nota, diz que o setor trabalha com a perspectiva de que havendo investimento haja um crescimento de até 5% em 2017 (EVANS, 2016).

Os principais estados produtores são Minas Gerais e Pará, e as maiores empresas produtoras são a Vale, CSN, Samarco, MMX e Usiminas, dentre outras (IBRAM, 2012). As principais regiões produtoras de minério de ferro no Brasil são o Quadrilátero Ferrífero, a Província Mineral de Carajás e a região de Corumbá, que contêm depósitos em rochas constituintes de FFB chamadas de itabirito. Das áreas citadas, o Quadrilátero Ferrífero é o maior produtor brasileiro.

2.1.1 Minério de Ferro

O ferro só é obtido industrialmente na forma de substâncias minerais, sendo o quarto elemento mais abundante na crosta terrestre. Apesar de fazer parte da composição de muitos minerais, apenas alguns destes podem ser economicamente explorados para a obtenção do ferro, quer pela quantidade desse elemento nesses minerais, quer pela concentração ou distribuição desses minerais nas rochas que constituem os corpos de minério. O Brasil atende a demanda da China em ferro, sendo este a principal *commodity* negociada colocando o país como segundo maior produtor de minério de ferro do mundo (IBRAM, 2012).

A classificação dos minérios de ferro economicamente explorados pode ser feita conforme a composição química do mineral fornecedor do elemento metálico, sendo classificados em óxidos, carbonatos, sulfetos e silicatos.

Os depósitos de minério de ferro são agrupados geologicamente em cinco categorias principais: (i) os sedimentares acamadados; (ii) os formados por soluções hidrotermais; (iii) os relacionados a atividades vulcânicas; (iv) os relacionados a processos de metamorfismo e/ou deformação; e (v) os resultantes de alteração e acúmulo na superfície terrestre, por constituírem os grandes depósitos das formações ferríferas bandadas (FFB). Os depósitos sedimentares acamadados são os mais importantes para a extração de minério. As FFB são constituídas, principalmente, de minerais de sílica e de ferro (hematita, magnetita e algumas variedades de carbonatos e silicatos) originados provavelmente por precipitação química, e compreendem as maiores reservas de ferro do mundo, estando entre 20% e 50% os teores médios de ferro encontrados nestes minerais. Os minérios de ferro explorados para fins comerciais são denominados de itabirito, hematita e canga (CARVALHO e DE LANDIM et al, 2014).

2.2 Geossistemas Ferruginosos – Quadrilátero Ferrífero

Geossistemas ferruginosos referem-se às unidades espaciais cujo substrato litológico é constituído por rochas ferruginosas. Quadrilátero Ferrífero é o geossistema ferruginoso localizado no centro-sul de Minas Gerais, considerado a principal unidade ferrífera do Brasil (SOUZA, 2015). A formação ferrífera predominante desta área denomina-se canga. As cangas são afloramentos resultantes do intemperismo de rochas ferríferas adjacentes (itabiritos e diamictitos ferruginosos) e posterior enriquecimento com ferro. Foram formados há milhões de anos, constituindo uma couraça que recobre isoladamente as formações ferríferas bandadas

(FFB) e, conseqüentemente, os depósitos de minério de ferro (DORR, 1969; SCHOBENHAUS e COELHO, 1986; CASTRO, 2008).

O Quadrilátero Ferrífero caracteriza-se por possuir alta geodiversidade e por uma complexa evolução geológica da paisagem (RUCHKYS et al., 2007), sendo que tais fatores favorecem o desenvolvimento e a manutenção da biodiversidade (MARTINS, 2000). Neste contexto, é importante o desenvolvimento de estudos nesses ambientes, em especial nas áreas de cangas, que tendem a perder habitats e ser altamente degradadas devido à abertura de dezenas de cavas de extração de minério de ferro (CARMO, 2010). Além disso, a vegetação associada às cangas abriga dezenas de espécies raras (GIULIETTI et al., 2000), possuindo alta diversidade, inclusive algumas espécies novas para a ciência.

O amplo espectro de ambientes descritos nas cangas mostra condições ecológicas que geralmente diferem da paisagem adjacente e que, por sua vez, pode ser constituída por fitofisionomias florestais, campestres, arbustivas ou savânicas (OLIVEIRA-FILHO, 2009).

2.2.1 Canga

A cobertura vegetal denominada canga está associada aos afloramentos rochosos e o pouco conhecimento dessas áreas deve-se ao fato de as mesmas se encontrarem em sua maioria em áreas de mineração de ferro, o que acarreta em grande perda de informações devido à degradação causada na exploração do minério, entre outras ações antrópicas (CARMO et al. 2013). Os campos rupestres geralmente estão associados a áreas montanhosas com altitudes acima de 900m. Sua fitofisionomia varia em função do microclima, topografia e solo local, frequentemente observa-se a existência de um mosaico surpreendente com formações distintas em áreas relativamente pequenas (CONCEIÇÃO e PIRANI, 2007). Ocorrem como forma única de vegetação, tanto pela diversidade de espécies como pela maneira como estas se distribuem, com as plantas crescendo sobre pedra, em solo pedregoso ou arenoso (RAFINI et al., 2008). Outras características de campos rupestres são o elevado número de táxons endêmicos e grande variação existente na composição da flora de áreas distintas (DE QUEIROZ, 1996; RODELA, 1998; TEIXEIRA e DE LEMOS FILHO, 2013).

2.2.2 Cerrado

O bioma Cerrado é o segundo maior do território brasileiro e abrange outros ecossistemas como campos, savanas, matas e matas ciliares. Em função de atividades

antrópicas, verificou-se nas últimas décadas uma taxa elevada de degradação, apesar de algumas áreas serem protegidas por lei (SANTOS et al., 2009). Sua grande extensão e variação conferem-lhe alta diversidade, além de ampla composição florística e um elevado grau de endemismo (MACHADO et al., 2004). O cerrado é caracterizado fisionomicamente por típica vegetação savânica, com baixa ocorrência de formações campestres e florestais (RIBEIRO e WALTER, 2008). Das fitofisionomias savânicas tem como destaque o cerrado “stricto sensu”, com cobertura arbórea que varia de 10 a 60% subdividido em cerrado denso, cerrado típico, cerrado ralo e cerrado rupestre, segundo Ribeiro e Walter (2008), usando como base as propriedades do substrato e a densidade dos componentes arbustivo-arbóreos e subarbustivo-herbáceos. Os substratos dos cerrados rupestres diferenciam-se por estarem associados a solos rasos e com ocorrência de afloramentos rochosos classificados como Neossolos Litólicos, em que a fixação das plantas ocorre entre as rochas onde há matéria orgânica acumulada em decomposição e também maior deposição de areia associada ao intemperismo das rochas (REATTO et al., 2008).

A riqueza florística deste bioma é abundante abrangendo cerca de 12 mil espécies ou mais (MARTINS et al., 2000). Conhecer a biodiversidade sustentada por esse bioma e sua rápida diminuição frente às transformações negativas que atividades antrópicas vêm promovendo é fundamental na elaboração de ações visando sua preservação (BEZERRA e SUESS, 2013).

2.2.3 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um bioma caracterizado pela alta diversidade de espécies e o alto grau de endemismo. Extremamente heterogênea em sua composição, a Mata Atlântica estende-se de 4° a 32°S e cobre uma ampla área de zonas climáticas e formações vegetacionais, de tropicais a subtropicais (TABARELLI, 2005).

A vegetação se correlaciona com o relevo da região. Russ (2008) relata que os estudos sobre os diferentes agrupamentos vegetais dessa floresta costeira têm indicado uma grande diversidade de associações vegetais que variam conforme a latitude, o compartimento do relevo, a orientação das vertentes, a insolação e os solos. Este bioma se desdobra em outras formações, como a Floresta Ombrófila Densa, Mista (mata de araucária) e aberta; Mangues; Restingas; Campos de altitude; Brejos interioranos; Encraves Florestais do Nordeste; Ilhas Costeiras e Oceânicas que ainda abrigam uma parte significativa da biodiversidade biológica do Brasil (SILVA e CASTELETTI, 2005). A elevação varia do nível do mar até 2900m

ocasionando mudanças bruscas de profundidade, tipo dos solos assim como na temperatura (MONTOVANI, 2003). A pluviosidade pode cair de 4000 mm para 1000 mm em algumas áreas, quanto mais interioranas as áreas mais sazonais se tornam as florestas. A floresta já perdeu muito de sua área e vegetação remanescente, o que antes cobria uma enorme área hoje se resume a vários pequenos arquipélagos florestais bastante distantes entre si (GASCON et al., 2000).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

Uma gama de microrganismos está envolvida em diversos processos edáficos, sendo um dos mais importantes a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Os diazotróficos são capazes de reduzir o N_2 à amônia e outras formas combinadas de N para melhor absorção pelas plantas ou para seu próprio metabolismo através de um mecanismo enzimático que envolve a nitrogenase, principal enzima na FBN.

Estes microrganismos compreendem uma diversidade grande de procariotos com representantes dos domínios Archae e Bacteria, com diferenciações morfológicas, metabólicas e fisiológicas as quais garantem não só a resiliência dos processos que mediam em determinado ecossistema, mas, além disso, a ocorrência destes nos mais variados habitats terrestres (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os microrganismos diazotróficos são classificados como de vida livre ou simbióticos. Os de vida livre, quando no solo, utilizam o N_2 fixado em seu próprio benefício, ou seja, na manutenção de seu metabolismo; quando endofiticamente, auxiliam a espécie hospedeira em seu desenvolvimento não causando danos à mesma, estabelecendo uma relação positiva para ambas. Quanto à simbiose com leguminosas, há na maioria das vezes a formação de nódulos, uma estrutura diferenciada no tecido da raiz que ocorre após a infecção da bactéria na espécie vegetal hospedeira (MOREIRA, 2010).

Essas bactérias ocorrem em ambientes diversos. O aporte de N por meio de simbioses através da fixação biológica é maior cerca de três vezes ou mais do que através do uso de fertilizantes, oito vezes ou mais do que por outros processos químicos e cinco vezes ou mais em se tratando de descargas elétricas, representando 65% do total de N disponível (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Mais ou menos seis décadas após a publicação de trabalhos relatando diazotróficos associativos pela pesquisadora Johanna Döbereiner muitos avanços foram conquistados nessa área de pesquisa, como a descoberta de mais gêneros e a utilização de ferramentas

moleculares de identificação de espécies. Os principais gêneros estudados são *Azotobacter*, *Arhizophilus*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Arcobacter*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Sphingomonas*, sendo as principais espécies pertencentes aos gêneros *Azospirillum* spp e *Herbaspirillum* spp. (MOREIRA e SIQUEIRA et al, 2006).

As bactérias diazotróficas associativas podem ser divididas em três categorias: rizosféricas, endofíticas obrigatórias e endofíticas facultativas. As primeiras colonizam a superfície de raízes (*Azotobacter paspali*, *Beijerinckia* spp.), os endofíticos obrigatórios colonizam o interior das raízes e outros tecidos vegetais (*Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp e *Azoarcus* spp) e, por último, os endofíticos facultativos onde se enquadram principalmente *Azospirillum*, colonizam tanto a superfície das raízes como também seu interior (BALDANI et al., 1997). Em uma revisão abrangendo um histórico sobre a fixação biológica de nitrogênio efetuada por Baldani e Baldani. (2005), inserem-se outras espécies de diazotróficos associados a gramíneas, *Beijerinckia fluminensis* e *Azotobacter paspali* (rizosféricas), *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense* (associativas) e *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia brasilensis* e *B. tropica* (endofíticas).

Em relação à eficiência na disponibilização de nitrogênio proveniente das bactérias associativas, esta é relativamente baixa quando comparada com as simbioses rizóbio/leguminosas, pois estas também necessitam de N para o metabolismo e não possuem nodulação, o que torna a eficiência do processo de absorção pelas plantas menor havendo também perda desse nutriente por diferentes rotas como a volatilização e lixiviação.

Devido ao fato de promoverem o crescimento de plantas, as bactérias diazotróficas associativas são consideradas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (TRIPATHI et al., 2002; MOREIRA et al., 2016). Outros mecanismos, como a capacidade de solubilização de fosfatos, síntese de hormônios tais como auxinas, giberelinas e citocininas, produção de antibióticos e sideróforos, ação antagonista sobre patógenos, tolerância a metais e ação biorremediadora, têm sido observados em bactérias associativas (MARINO e FREITAS, 2005; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; MOREIRA et al., 2008; SUN et al., 2010; PANIZZON et al., 2016).

Bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como associativas, suas características positivas ao desenvolvimento de plantas são importantes para a produção de inoculantes em áreas agrícolas de baixa fertilidade (GRÖNEMEYER et al., 2012). Diazotróficos como *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* são também responsáveis

pela maior parte da fixação de nitrogênio atmosférico (SESSITSCH et al., 2012; SANGOI, et al., 2015).

2.3.1 Importâncias dos microorganismos diazotróficos em ecossistemas nativos ou não

Em áreas perturbadas como as mineradas, a FBN pode ser estimulada, beneficiando processos de revegetação e reabilitação destas áreas. Estudos de FBN são relevantes dada a importância deste processo no aporte de nitrogênio, seja em benefício de sistemas agrícolas contribuindo para o crescimento e estabelecimento das culturas e consequente aumento de produção visando minimizar gastos tanto quanto em recuperação de áreas degradadas e também ambientes naturais (MOREIRA, 2010).

Os métodos de isolamento de microrganismos associativos fixadores de nitrogênio em meio semi sólido NFb, JNFb, LGI (DÖBEREINER et al., 1995), utilizado há décadas, permitiram entender que estes estão associados a diferentes plantas e condições edafoclimáticas ocupando sítios com taxas limitadas de concentração de O₂ (BALDANI, et al., 1997).

Verificando a presença de *Azospirillum brasilense* em outras espécies vegetais e testando os meios FAM e LGI, Lange e Moreita (2002) puderam concluir que o meio FAM é mais eficiente no crescimento de *A. amazonense* sendo esta detectada em solo rizosférico, ecto e endorrizosfera de várias espécies de monocotiledôneas, incluindo Orchidaceae e dicotiledôneas.

Um levantamento da diversidade e densidade de diazotróficas endofíticas foi realizado, através do método de número mais provável, isolamento em meios NFb, JNFb e FAM considerando quinze áreas de baixa fertilidade, sendo sete com vegetação nativa (campo tropical) e as outras oito em reabilitação por tempos diferentes utilizando como cobertura vegetal gramíneas, espécies arbóreas nativas entre outras. Neste levantamento obteve-se baixa densidade de diazotróficos no geral se comparado a sistemas agrícolas e nula na fitofisionomia de mata. Nas áreas onde se utilizou gramíneas no processo de reabilitação a resposta foi positiva quanto a presença destes microrganismos (MELLONI et al., 2004).

Nóbrega et al. (2004), trabalhando com caracterização fenotípica e densidade de bactérias diazotróficas utilizando dez das 15 áreas em reabilitação utilizadas por Melloni et al. 2014, utilizando meio batata para caracterização, obtiveram alta diversidade fenotípica e também isolados de espécies além das quais os meios NFb, JNFb e FAM favoreciam.

A biodiversidade edáfica é afetada por atividades antrópicas que incluem a mineração, a reabilitação com gramíneas em áreas degradadas; demonstra ser uma opção com potencial favorável no que diz respeito a restabelecer a presença microbiana. A associação com gramíneas tem demonstrado que pode contribuir com grande parte do nitrogênio atribuído às plantas (POLIDORO et al., 2001).

Em avaliação da densidade e diversidade de diazotróficos associativos em meio de cultivo JNFb, FAM e NFb semisseletivos às espécies *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum amazonense* e *Azospirillum spp.*, respectivamente, utilizando três áreas da Reserva Biológica Serra dos Toledos - MG sob diferentes níveis de altitude em períodos diferentes tendo como controle uma área no entorno da Reserva sob pastoreio com predomínio de gramíneas foi observada maior diversidade e densidade em meio JNFb sob vegetação de gramíneas no período com maiores temperaturas e umidade (SILVA e MELLONI, 2011).

Sala et al. (2007) avaliaram a ocorrência e o efeito de diazotróficos associativos em genótipos diferentes de trigo com doses de adubação nitrogenada também diferentes. Os pesquisadores obtiveram isolados com características de *Azospirillum*, *Herbaspirillum*; ao testá-los “in vitro” nos genótipos de origem observaram que todos estes isolados no genótipo ITD-19 influenciaram positivamente no crescimento de raízes comparados à testemunha e que apenas um isolado em meio JNFb contribuiu significativamente com acúmulo de N na parte aérea, concluindo portanto que há influência da interação planta-microrganismo diazotrófico e adubação e que as bactérias diazotróficas proporcionam o crescimento radicular e o acúmulo de N em trigo.

Ao realizar um ensaio em campo para obter respostas de genótipos de trigo sobre inoculação de diazotróficos associativos utilizando dois genótipos diferentes, três novos isolados homólogos de *Azospirillum brasilense*, *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera* com três doses de adubação nitrogenada, Sala et al. (2007) concluíram que houve o aumento na produção com a inoculação e não houve especificidade dos genótipos com as espécies empregadas,. O maior incremento de produtividade se deu na ausência de N e a resposta a inoculação sofreu influência do local de cultivo. O que mais uma vez reforça a influência de fatores físicos, químicos e biológicos na presença, ausência e permanência de microrganismos diazotróficos em ecossistemas.

Azospirillum amazonense, em experimento em casa de vegetação inoculadas em dois híbridos de milho, promoveu o acúmulo de N nas raízes e aumento na produção de matéria seca da parte aérea (REIS JUNIOR et al., 2004). A inoculação de *Azospirillum spp.* em cultivares de arroz de terras altas, possibilitou o aumento no comprimento das raízes de duas

das três cultivares avaliadas e incremento de 33% e mais de 100% na massa seca de ambas, respectivamente, o que infere que seja positiva a inoculação das estirpes em destaque com a cultivar hospedeira (GUIMARÃES et al., 2017).

Em milho de pipoca em dois ambientes distintos utilizando-se um inoculante comercial Masterfix L. a base de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* e uma formulação experimental UEL com uma estirpe de *A. brasilense* e uma estirpe de *Rhizobium* sob diferentes níveis de fertilização nitrogenada. O efeito dos inoculantes na ausência de adubação foram superiores ao controle não inoculado, incrementando a produtividade numa média de 13,21 e 26,61% para cada inoculante, respectivamente, e as doses de N em conjunto com as inoculações não afetaram significativamente a produtividade (SPOLAOR et al.; 2016).

A fertilização orgânica em relação a fertilizantes convencionais aumentou o número de culturas de bactérias associativas isoladas em cana-de-açúcar mostrando que a adição excessiva de nitrogênio pode prejudicar o ecossistema e, conseqüentemente, a diversidade de microrganismos no solo (PARIONA-LLANOS et al., 2010), sugerindo que os fertilizantes nitrogenados devem ser cada vez menos utilizados, aumentando o incentivo de fertilizantes orgânicos e o uso de microrganismos fixadores de nitrogênio.

Do isolamento de bactérias diazotróficas de solo e raízes de *Araucaria angustifolia*, estirpes com potencial para fixação de N₂ foram verificadas através de teste de redução de acetileno e, após comparação de suas sequências de ARNr 16S no GenBank, foi confirmado que a maioria dessas estirpes pertence ao gênero *Burkholderia*, o que sugere que as bactérias associativas são promissoras em processos de preservação visto que florestas de Araucárias se trata de um ecossistema ameaçado (NERONI e CARDOSO, 2007).

Através da inoculação de estirpes de bactérias diazotróficas associativas endofíticas, *Enterobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*, e *Serratia proteamaculans*, isoladas de *Populus* spp. e *Salix gooddingii*, Taghavi et al. (2009) observaram que as espécies endofíticas proporcionam um aumento na biomassa.

Bactérias associativas e ou simbióticas que atuam no processo de fixação biológica de nitrogênio isoladas de solo em reabilitação após mineração de bauxita e solos da Amazônia Ocidental demonstraram aptidão em realizar outros processos relacionados ao crescimento vegetal, apresentando também resistência a antibióticos. Características em adaptar-se a condições ambientais apontam-nas como estirpes promissoras como indicadoras da qualidade do solo e crescimento de plantas (DE OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014).

Ao avaliarem a capacidade de bactérias diazotróficas associativas em solubilizar fosfato, quatro das cinco estirpes utilizadas do laboratório de microbiologia da UFLA

(*Burkholderia sp.* – UFLA 04-21, *Paenibacillus kribbensis* UFLA 03-10, –, *Enterobacter sp.* UFPI B5-6, *Pseudomonas sp.* UFPI B5-8A) com características relacionadas a solubilização de fosfato, produção de AIA, Da Costa et al. (2015) tiveram resposta positiva, aumentando o crescimento de plantas e o acúmulo de nutrientes através da solubilização de fosfato de cálcio insolúvel.

Silva et. al. (2017), testando estirpes de bactérias diazotróficas isoladas anteriormente de solo da Reserva Serra dos Toledos – MG constataram resposta positiva de todos os grupos de isolados para potencial de enraizamento se comparados ao hormônio comercial utilizado neste processo, o que reforça a atuação de bactérias diazotróficas não simbióticas na produção e liberação de substâncias relacionadas ao crescimento vegetal.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade e a densidade de bactérias diazotróficas associativas estão ligadas a vegetação associada.

As associações com bactérias diazotróficas não só com gramíneas, mas também outras espécies vegetais são importantes tanto do ponto de vista do aporte de nitrogênio quanto em promover o crescimento, expandir o volume das raízes, melhorando a absorção de nutrientes e água, solubilização de fosfato inorgânico, produção de sideróforos e hormônios, produção de biomassa e biorremediação. Portanto, o isolamento, a identificação e a aplicação biotecnológica destas bactérias permitem o estabelecimento das espécies hospedeiras e seu sucesso não só no âmbito agrícola, natural, mas também no restabelecimento de áreas degradadas e de preservação.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology. Biochemistry.** v. 29, n.516, p 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v.77, n.3, p. 549-579, 2005.

BEZERRA, R. G.; SUESS, R. C. Abordagem do bioma cerrado em livros didáticos de biologia do ensino médio. **Holos,** v1, p. 233-242, 2013.

CARMO, F. F. D. Importância ambiental e estado de conservação dos ecossistemas de cangas no Quadrilátero Ferrífero e proposta de áreas-alvo para a investigação e proteção da biodiversidade em Minas Gerais. Tese (Mestrado). **Universidade Federal de Minas Gerais.** 90p. 2010.

CARMO, F. F.; JACOBI, C. M. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia.** v. 64, n. 3, p. 527-541, 2013.

CARVALHO, P. S.; DE LANDIM, L. Minério de ferro. **BNDES Setorial.** Rio de Janeiro, n. 39, p. 197-233, 2014.

CASTRO, P. T. A. Cangas: a influência da geodiversidade na biodiversidade. Simpósio afloramentos ferruginosos no quadrilátero ferrífero: biodiversidade, conservação e perspectivas de sustentabilidade. Belo Horizonte, p. 30-51, 2008.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J.R. Diversidade em quatro áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: espécies distintas, mas riquezas similares. **Rodriguésia** v.58, p. 193-206. 2007.

DA COSTA, E. M.; DE LIMA, W.; OLIVEIRA-LONATTI, S.M.; DE SOUZA, F.M. Phosphate-solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in anoxisol fertilized with rock phosphate **Ecological Engineering** v. 83, p. 380-385, 2015.

DE OLIVEIRA-LONATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 30, n. 4, p. 1239-1250, 2014.

DE QUEIROZ, L. P.; SENA, T. S. N.; COSTA, M. J. S. L. **Flora vascular da serra da jibóia, Santa Terezinha-Bahia**. In: O campo rupestre. 1996.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL – DNPM. **Sumário Mineral /2015**. Brasília, v. 35, 23p. 2015.

DÖBEREINER, J.;BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA- CNPAB, 1995. 60p.

DORR, J. V. N. **Physiographic, stratigraphic, and structural development of the Quadrilátero Ferrífero**. Minas Gerais, Brazil. USGS. Prof. Paper, 641-A. Washington. 1969. 110 p.

EVANS, L. Setor de mineração espera expansão de 5% em 2017, apesar da crise. **EM digital on line**. 09 de ago. 2016. Disponível em <http://www.em.com.br> Acesso em: set. 2017.

FARIAS, C. E. G. **Mineração e Meio Ambiente no Brasil**. Relatório do CGEE/PNUD, 2002.

GASCON, C.; WILLIAMSON, G. B.; DA FONSECA, G. A. Receding forest edges and vanishing reserves. **Science**. v. 288, n. 5470, p. 1356-1358, 2000.

GIULIETTI, A.M. et al. **Caracterização e endemismos nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço**. In Tópicos atuais em Botânica. VX Congresso Nacional de Botânica. Embrapa. Brasília, p. 311-318. . 2000.

GRÖNEMEYER, J. L. et al. Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 67-82, 2012.

GUIMARÃES, S. L. et al. Crescimento inicial de plantas de arroz inoculadas com *Azospirillum* spp. Initial growth of rice plants inoculated with *Azospirillum* spp.. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v.11, p. 45 - 55, 2017.

IBRAM-INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Informações e análises da economia mineral Brasileira**. 7ª edição. Dezembro/2012, p.32.

LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum Amazonense* em Raízes e Rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 26, n. 2, p. 529-533, 2002.

MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Conservation International do Brasil**. Brasília, 2004.

MARINO, V., dos, S., POLON, V., FREITAS, J., BOLLER, P. Y DIAS, A. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. 29 (3): 345-352, 2005.

MARTINS, C. S. Caracterização física e fitogeográfica de Minas Gerais. In: MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte. **Fundação Zôo Botânica**, 2000.

MELLONI, R. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 28, n. 1, p. 85-93, 2004.

MONTOVANI, W. **A Degradação dos biomas brasileiros** In: RIBEIRO, W. C. (Ed) Patrimônio ambiental brasileiro. Editora Universidade de São Paulo. São Paulo. P. 367-429, 2003.

MOREIRA, F.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; NÓBREGA, R.S.; LIMA, A.S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 749-761, 2008.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**. v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. .6 ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 729 p, 2006.

MOREIRA, F.D.S. et al. Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, p. 111-121, 2016.

NERONI, R. D. F.; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence of diazotrophic bacteria in: *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**. v.64, n.3, p. 303-304, 2007.

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

OLIVEIRA-FILHO, A. T. Classificação das fitofisionomias da América do Sul cisandina tropical e subtropical: proposta de um novo sistema prático e flexível ou uma injeção a mais de caos?. **Rodriguésia**, p. 237-258, 2009.

PANIZZON, J. P. et al. Bacteria-Soil-Plant Interaction: This Relationship to Generate can Inputs and New Products for the Food Industry. **Rice Research: Open Access**. v. 4, p 1-6, 2016.

PARIONA-LLANOS, R.; DE SANTI FERRARA, F. I.; GONZALES, H. H. S.; BARBOSA, H. R. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 6, p. 387-393, 2010.

POLIDORO, J. C. et al. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Seropédica. Rio de Janeiro. p. 8, 2001.

RAPINI, A. et al. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 16-24, 2008.

REATTO, A.; CORREIA, J. R.; SPERA, S. T. MARTINS, E. de S. **Solos do bioma Cerrado: aspectos pedológicos**. In: SANO, S. M. e ALMEIDA, S. P. (Eds.). Cerrado: ambiente e flora. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 2008.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p.103-113, 2004.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma Cerrado**. In Cerrado: ecologia e flora (SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO J. F. eds.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p.151-212, 2008.

RODELA L. G. Cerrados de altitude e campos rupestres do Parque Estadual do Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais. **Revista do Departamento de Geografia (USP)**. n. 12 163-189. 1998.

RUCHKYS, U. A. **Geoparque do Quadrilátero Ferrífero: uma abordagem multidisciplinar**. In: Simpósio Afloramentos Ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero: Biodiversidade, Conservação e Perspectivas de Sustentabilidade. Belo Horizonte, 66-77, 2007.

RUSS, J. L. (org.) **Geografia do Brasil**. Edusp: São Paulo. p 171-174, 2008.

SALA V. M. R.; CARDOSO E. J. B. N. ; FREITAS J. G. de ; SILVEIRA A. P. D. da. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun. 2007.

SANGOI, L. et al. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 1141-1150, 2015.

SANTOS, E. V.; MARTINS, R. A.; FERREIRA, I. M. O processo de ocupação do bioma cerrado e a degradação do subsistema vereda no sudeste de Goiás. In: simpósio brasileiro de geografia física aplicada, 13. Viçosa, MG. **Universidade Federal de Viçosa**. p.1-20, 2009.

SCHOBENHAUS, C.; COELHO, C. E S. Principais depósitos minerais do Brasil: ferro e metais da indústria do aço. **Departamento Nacional de Produção Mineral**. Brasília. v. 2, 501 p, 1986.

SESSITSCH, A. et al. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 25, n. 1, p. 28-36, 2012.

SILVA, F. T. et al. Bactérias diazotróficas não simbióticas e enraizamento de estacas semilenhosas de Oliveira (*Olea europaea* L.). **Ciência Florestal**. v.27, n.1, p. 61-71,2017.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. **Estado da biodiversidade da mata atlântica Brasileira**. In: Mata Atlântica : biodiversidade, ameaças e perspectivas. (Ed) Galindo-leal, c.; Câmara, i. D. G.; traduzido por Edma Reis Lamas. – São Paulo : Fundação SOS Mata Atlântica — Belo Horizonte : Conservação Internacional, 472 p. 2005.

SILVA, K. et al. Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. **Sientia Agricola**. v. 68, n. 5, p 518-526, 2011.

SILVA, T.F.; MELLONI, R. Density and phenotypic diversity of non-symbiotic diazotrophic bacteria in soils of the Biological Reserve Serra dos Toledos, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 359-371, 2011.

SOUZA, F. C. R.; DO CARMO, F. F. **Geossistemas ferruginosos no Brasil**. In: Do Carmo, F. F.; Kamino, L. H. Y. (Org)s. Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais. Belo Horizonte. 3i Editora. p 47 - 76, 2015.

SPOLAOR, L. T. et al. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance **Bragantia**, v. 75, n. 1, p.33-40, 2016.

SUN, L.N. et al. *Caulobacter rhizosphaerae* sp. nov., a stalked bacterium isolated from rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.67, p. 1771-1776, 2017.

TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TAGHAVI, S. et al. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8500-8505, 2009.

TEIXEIRA, W. A.; DE LEMOS FILHO, J. P. A flórua rupestre do Pico de Itabirito, Minas Gerais, Brasil: lista das plantas vasculares. **Boletim de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 199-230, 2013.

TORRES, L.C. Interação *Candida albicans* com *Acinetobacter baumannii* E *Klebsiella pneumoniae* em biofilmes multiespécies. 2016. 50p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

TRIPATHI, A. K.; VERMA, S. C.; RON, E. Z. Molecular characterization of salt-tolerant bacterial communit in the rice rizosphere. **Ressearch in Microbiology**, Paris. v. 153, n 9, p 579-584, 2002.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

**CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIATIVAS ORIUNDAS DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE FERRO**

Artigo submetido para a Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira PAB - EMBRAPA

Caracterização e identificação de bactérias diazotróficas associativas oriundas de área de mineração de ferro

Juliana Volpi Emrich Pinto⁽¹⁾, Jessé Valentim dos Santos⁽¹⁾, Sílvia Maria de Oliveira- Longatti⁽¹⁾, Brenda dos Santos⁽¹⁾ e Fatima Maria de Souza Moreira⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Ciência do Solo - Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, C.P. 3037, CEP 37200-000, fone 55 (35) 3829 1254, fax 55 (35) 3829 1251 – E-mail: julianavep@gmail.com, jessevalentim@gmail.com, sylmarya@yahoo.com.br, brendadossantos2607@yahoo.com.br, fmoreira@dcs.ufla.br

Resumo – A mineração é essencial para a vida moderna e desenvolvimento socioeconômico de um país, entretanto esta gera impactos ambientais severos e efeitos negativos à biodiversidade edáfica. Muitos métodos são utilizados para a reabilitação de áreas degradadas, sendo o principal a revegetação com espécies nativas ou não, podendo esta ser potencializada se combinada com inoculação de microrganismos promotores de crescimento vegetal. Levantamentos e estudos da diversidade destes microrganismos são importantes para seu posterior uso em reabilitação. As bactérias diazotróficas associativas fixam nitrogênio e auxiliam na sustentabilidade, estando sua eficiência diretamente ligada à espécie vegetal associada. O objetivo do trabalho foi isolar, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas associativas de solo de quatro fitofisionomias no Quadrilátero Ferrífero: Mata Atlântica, Cerrado, Canga e Capim. Os isolados foram obtidos em meios de cultura NFb e FAM. A avaliação fenotípica foi através de caracterização cultural em meio Batata e a identificação através do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. Obteve-se um total de 37 estirpes em todas as fitofisionomias, exceto Mata Atlântica. Os meios favoreceram o crescimento bacteriano típico de diazotróficos, mas não só associativos. Houve predomínio da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* e maior densidade e diversidade foram encontradas na fitofisionomia Capim, no meio FAM e no período úmido.

Termos para indexação: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia* sp., *Azospirillum*.

Characterization and identification of associative diazotrophic bacteria from the iron mining area

Abstract - Mining is essential for the modern life and socio-economic development of a country. However it generates severe environmental impacts and negative effects on edaphic biodiversity. Many methods are used for the rehabilitation of degraded areas being the revegetation with native species the main one. This method can be potentiated if combined with inoculation with plant growth promoting microorganisms. Surveys and studies of the diversity of these microorganisms are important for their subsequent use in rehabilitation. The associative diazotrophic bacteria fix nitrogen and aid in the sustainability. The objective of this work was to isolate, characterize and identify diazotrophic associative bacteria from soil of four phytophysiognomies in the Iron Quadrangle: Atlantic Forest, Cerrado, Canga and Capim. The isolates were obtained by using NFb and FAM as culture media. The phenotypic evaluation was through cultural characterization in potato medium and identification through the partial sequencing of the 16S rDNA gene. A total of 37 strains were obtained from all phytophysiognomies except Atlantic Forest. The media favored bacterial growth typical of diazotrophs, but not only associative ones. There was a predominance of *Gluconacetobacter diazotrophicus* species. Higher density and diversity was found in Capim, with FAM medium in the wet season.

Index terms: mining area, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia* sp., *Azospirillum*

Introdução

As diversas interferências humanas sobre o solo, devido a mineração, modificam suas propriedades físicas e químicas e, conseqüentemente, as biológicas, afetando, portanto, a

comunidade microbiana edáfica. Fatores como o tipo de cobertura vegetal, o tipo de solo entre outros afetam a diversidade e a densidade de bactérias diazotróficas no solo.

Diferentes trabalhos têm relatado os efeitos decorrentes das condições de cobertura do solo em áreas de mineração sobre os microrganismos diazotróficos associativos. Melloni et al. (2004) e Nobrega et al. (2004) verificaram baixa densidade de bactérias diazotróficas em áreas sob reabilitação após décadas de mineração de bauxita, comparativamente aos sistemas agrícolas, no entanto, havia grande diversidade fenotípica entre os isolados da área. A alta diversidade observada, segundo os autores, seria decorrente da capacidade de resiliência dos microrganismos presentes no solo utilizado para a reabilitação das áreas mineradas, além disso, esses microrganismos poderiam ter sido introduzidos através das mudas de plantas ou das sementes utilizadas nos plantios. Nestes estudos foram utilizadas gramíneas, leguminosas, espécies arbóreas nativas e eucalipto. Em estudo realizado em áreas contaminadas com metais pesados, Moreira et al. (2008) avaliaram a densidade de diazotróficos associativos, bem como a caracterização fenotípica e genética e observaram que as densidades encontradas foram semelhantes às registradas em solos agrícolas. Portanto, embora possa ter ocorrido queda nas densidades populacionais das bactérias diazotróficas associativas devido a alterações decorrentes do uso do solo, a persistência de diversos isolados apontam para a capacidade desses microrganismos resistirem às condições estressantes impostas nos ambientes. Tal informação reforça a importância desse grupo para utilização em associação com plantas na recuperação de áreas degradadas.

As empresas mineradoras são obrigadas a mitigar os danos socioeconômicos e ambientais gerados por elas. Para tanto, lançam mão de ferramentas legais que integralizam os fatores ligados aos impactos ambientais como a Avaliação de Impacto Ambiental (AIA) e os Estudos de Impacto Ambiental (EIA) entre outros (Barbieri, 2007). Avaliação de diazotróficos associativos em áreas agrícolas decorrentes do seu potencial em promover o

crescimento de plantas demonstram resultados positivos (Bolívar-Anillo et al., 2016), assim espera-se que esta mesma técnica possa ser viável em solos degradados e posteriormente revegetados, sendo necessário que haja um levantamento tanto das espécies vegetais quanto das comunidades microbianas a elas associadas adaptadas a esta condição. No entanto, não foram encontrados trabalhos sobre bactérias diazotróficas associativas em áreas de mineração de ferro.

Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e identificar bactérias diazotróficas associativas em quatro fitofisionomias: Canga, Capim, Cerrado e Mata Atlântica sob influência da mineração de ferro, presentes no Quadrilátero ferrífero.

Material e Métodos

As bactérias diazotróficas foram isoladas de amostras de solos coletadas em uma área de mineração de ferro pertencente à empresa Vale S/A no Quadrilátero Ferrífero. As fitofisionomias estudadas estão localizadas no estado de Minas Gerais (MG), nos municípios de Nova Lima, no Centro de Tecnologia de Ferrosos – Miguelão e em Brumadinho, na Mina Córrego do Feijão. O clima local é caracterizado como Subtropical úmido (Cwa Köppen-Geiger). As características químicas e físicas das amostras de solos estão apresentadas na Tabela 1.

Foram realizadas duas coletas de solo, sendo a primeira de 10 a 15 de agosto de 2015, no período seco e a segunda de 11 a 15 de janeiro de 2016, no período úmido. As amostras de solo foram coletadas em quatro fitofisionomias distintas (Cerrado “stricto sensu”, Canga, Mata Atlântica e Capim). As vegetações de Canga e Mata Atlântica foram descritas segundo Inventário Florestal de Minas Gerais, 2009. A fitofisionomia Capim funcionava como área onde eram armazenados resíduos de minério. Nesta fitofisionomia a cobertura vegetal predominantemente era gramíneas, como braquiária (*Brachiaria decumbes*), capim gordura

(*Melinis minutiflora*) e capim colônia (*Panicum maximum* Jacq) (Castro et.al., 2017). Para a coleta em cada uma das quatro fitofisionomias foram alocados dois transectos separados por 50 metros de distância. Em cada transecto foram marcados e georefenciados 5 pontos com distância de cinco metros um do outro obtendo-se 10 pontos por fitofisionomia (Castro et al., 2017) (Figura 1). As coletas foram realizadas na camada de 0-20 cm, transportadas em caixas térmicas e, posteriormente, armazenadas em câmara fria a 4° C até o seu uso.

Para o isolamento das bactérias diazotróficas associativas, tanto das amostras coletadas no período seco quanto para o período úmido, foram utilizados dois meios de cultura semi sólidos, NFb (Döbereiner et al., 1995) e FAM (Magalhães & Döbereiner, 1984) (Anexo) e a estirpe BR11001^T (*Azospirillum brasilense*) foi utilizada como controle positivo para a validação do meio quanto a formação de película, indicando a presença de bactérias diazotróficas.

Dez gramas de solo de cada ponto foram suspensas em 90mL de solução salina (0,85%), obtendo as suspensões de 10^{-1} para o período seco e 10^{-1} a 10^{-4} para o período úmido e posterior análise no período seco. Uma alíquota de 0,1mL de suspensão de cada ponto foi inoculada em frascos contendo 15 mL dos meios semi sólidos NFb e FAM com cinco e três repetições, no período seco e úmido, respectivamente. Logo após a inoculação, os frascos foram incubados em câmara de crescimento a 30° C por 14 dias. A avaliação da presença de bactérias diazotróficas associativas foi realizada visualmente, quando as películas atingiram a superfície, caracterizando a presença de microrganismos diazotróficos. Na ausência de película os frascos foram descartados.

Dos frascos positivos foi retirada uma quantidade de cultura da superfície e re-inoculada em meio semi sólido NFb ou FAM de origem, incubados por 7 dias a fim de se obter confirmação da formação da película. Confirmada a película, as culturas foram repicadas em placas contendo meio sólido NFb e FAM, conforme o meio semi sólido de

origem, acrescidos de 0,2 g de extrato de levedura e incubadas por cinco dias a 30° C em BOD. Através do processo de purificação, após várias repicagens em placa com meio sólido NFb e FAM foram obtidas culturas puras. Os isolados obtidos foram repicados em meio Batata para a confirmação de pureza, caracterização cultural e armazenamento.

Avaliações semiquantitativas foram feitas observando o número de frascos com películas para as coletas de solo no período seco. Na segunda coleta de solo no período úmido, e novamente no solo coletado no período seco, foi calculado o NMP - número mais provável (Macgrady,1992).. A análise da densidade foi obtida através do programa de estatística Sisvar: versão 5.6, Build 86 com teste de probabilidade Scott Not a 0,05% transformando os dados para $\log(x+1)^{0,5}$.

Para a caracterização cultural, os isolados ficaram incubados por 4 dias em câmara de crescimento a 30° C em meio de cultura Batata. As características das colônias avaliadas foram: dias de aparecimento; diâmetro médio (mm); forma (puntiforme, circular e irregular); borda (inteira, ondulada, lobada, denteada e filamentosa); superfície (lisa, rugosa e papilada); produção de goma (escassa, pouca, moderada e abundante); elevação (plana, lenticular, convexa, drop-like, umbonada e umbilicada); consistência da massa de crescimento (seca, aquosa, gomosa, viscosa e butírica); detalhes ópticos (transparente, translucido, opaco e brilhante) e coloração (branca, rosa, rosa claro, creme, creme escuro).

A identificação genética das estirpes diazotróficas foi realizada a partir da amplificação do gene 16S rRNA. Para a extração do DNA genômico de cada estirpe selecionada utilizou-se a metodologia de lise alcalina (Niemann et al., 1997). Para a amplificação do gene 16S rRNA preparou-se um mix para cada reação de PCR (Reação em cadeia de polimerase) com um volume final de 50 µL, contendo: 4,5 µL DNA, 5 µL tampão 10X KCl, 4 µL MgCl₂ (2,5 mM), 5 µL dNTP Mix (2 mM), 1 µL de cada primer: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') a 10

mmol L⁻¹ (Lane 1991), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5U µL⁻¹) e água Mili-Q estéril. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler com as seguintes condições: desnaturação inicial 94° C durante 5 min, 35 ciclos de desnaturação (94° C durante 40 s), anelamento (55° C por 40 s), extensão (72° C durante 1,30 min), e uma extensão final de 72° C por 7 min. Uma alíquota de cada reação dos produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (1% p/v) com adição do corante SYBR Safe (Invitrogen) sob luz UV. Foi utilizado o marcador -1 Kb DNA Ladder no gel para verificar a amplificação do gene. A purificação dos produtos de PCR e o sequenciamento de DNA (com os iniciadores 27F e 1492F) foram realizados pelo laboratório WemSeq Biotecnologia (Curitiba – PR) e a qualidade das sequências analisadas utilizando o software BioNumerics 7.5 e submetidas ao BLASTin (Bethesda, MD, EUA) e comparadas no banco de dados do GenBank (National Center for Biotechnology Information) para se obter o acesso mais similar.

Resultados e Discussão

No período seco (Tabela 2), Capim obteve-se 4% (2/50) das amostras positivas, ou seja, com formação de película confirmada, em meio de cultivo FAM e 6% (3/50) em meio NFb. Na fitofisionomia Canga obteve-se 8% (4/50) de amostras positivas em meio NFb e não houve formação de película em meio FAM. Em Cerrado e Mata Atlântica não houve formação de película em nenhum dos dois meios de cultivo. Tanto no período seco quanto no úmido em Capim foram detectados diazotróficos pelo cultivo em meio NFb e FAM e em Canga apenas em FAM. Em Cerrado houve apenas crescimento em meio de cultivo FAM no período úmido e não foi detectado crescimento em Mata Atlântica em nenhum período ou meio (Tabela 3). A fitofisionomia com maior densidade foi Capim diferenciando significativamente das demais para o crescimento em meio FAM e NFb no período úmido não havendo diferença significativa no período seco.

Quando comparadas com outros trabalhos que avaliaram densidade de diazotróficos em diferentes sistemas de uso da terra com características edafoclimáticas semelhantes, todas as fitofisionomias podem ser consideradas de baixa densidade. No entanto, dentre essas, as sob influência de gramíneas apresentaram maior densidade corroborando com os resultados obtidos por outros autores (Magalhães & Döbereiner, 1984; Melloni, 2004; Silva et al., 2011; Silva & Melloni, 2011). Silva et al. (2011) relataram tendência de maior diversidade de espécies isoladas em sistemas de uso da terra na região amazônica para SUT pastagem com predomínio de gramíneas. Silva & Melloni, (2011) obtiveram maior densidade de diazotróficos não simbióticos em áreas com gramíneas.

As comunidades microbianas edáficas são influenciadas pelos atributos físico-químicos do solo. Acidez e o teor de alumínio, elevados nas fitofisionomias estudadas (Tabela 1), podem ter afetado negativamente a microbiota. Neste caso, Capim apresentou menores valores nestes atributos em relação aos demais. Palmer & Young, (2000) relatam que a diversidade bacteriana do solo pode sofrer influência de teor de argila, pH e matéria orgânica. A matéria orgânica teve valores muito altos em Canga e Cerrado, altos em Mata Atlântica e mais baixos em Capim, assim a deficiência de N pode ter estimulado os fixadores de N₂.

O aspecto das colônias em meio Batata e as características das 37 estirpes (Tabela 4, Figura 2) variou em relação aos parâmetros observados da seguinte forma: “circular, irregular e puntiforme” em relação a forma; “lenticular, convexa, umbonada, umbilicada e pulvinada” para elevação; “inteira e ondulada” para borda; “lisa e rugosa” para superfície; “brilhante e opaco” para detalhes ópticos; “branco, creme e rosa” para cor. No geral o crescimento ocorreu em três dias, conferindo crescimento rápido a todos os isolados e o diâmetro médio foi de 0,54 cm. Houve maior variação de características no parâmetro relativo à elevação.

A maior diversidade de gêneros e espécies foi observada no Capim (Tabela 4). Segundo Moreira e Siqueira, (2006) espécies não simbióticas relacionadas à fixação de nitrogênio ocorrem no solo, abundantemente na rizosfera e endofiticamente em gramíneas. Algumas das espécies mais comumente encontradas pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Capim apresentava como cobertura vegetal a predominância de braquiária (*Brachiaria decumbes*), capim gordura (*Melinis minutiflora*) e capim colônia (*Panicum maximum* Jacq) (Castro et al. 2017). Antes do plantio esta fitofisionomia passou por um processo de recuperação onde foi feito preparo do solo com calagem. Baldani et al. (1999) relatam que a introdução de gramíneas em áreas degradadas para sua reabilitação pode ser vantajoso visto que a influência de bactérias não simbióticas de vida livre e ou endofíticas estão diretamente ligadas à vegetação associada. A revegetação com gramíneas em Capim contribuiu positivamente para o aumento na densidade dessas bactérias no solo e, conseqüentemente, maior isolamento, corroborando com Silva et al. (2011) e Magalhães & Döbereiner, (1984) que obtiveram maior densidade de organismos associados à pastagem se contrapondo ao menor número de isolados nas demais fitofisionomias, como em florestas na qual estiveram ausentes. Canga foi a segunda fitofisionomia em maior número de isolados. A vegetação característica desta fitofisionomia são arbustos adaptados a condições peculiares e gramíneas (Costa, 2007), esta área tinha o nível mais elevado de ferro (Tabela 1). Não houve isolamento proveniente da área de Mata Atlântica nativa, o mesmo resultado foi obtido por Melloni et al. (2004) quando estudou a densidade e diversidade de diazotróficos em área de mineração de bauxita sobre reabilitação. Magalhães e Döbereiner (1984) também não encontraram diazotróficos em solo de floresta.

As 37 estirpes sequenciadas (Tabela 4), em sua maioria, obtiveram números de pares de base entre 1150^C e 1304^C, com similaridade entre 98 e 100% em relação às sequências depositadas no Genbank. Todos os isolados foram identificados ao nível de gênero obtendo-se

também algumas espécies. Os meios de cultivo utilizados NFb e FAM favorecem o crescimento de *Azospirillum* spp., porém outros gêneros e também espécies foram isolados e identificados no presente estudo. Ao todo foram 8 gêneros (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* e *Rhizobium*) e 8 espécies (*Agrobacterium rhizogenes*, *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia caribensis*, *B. tropica*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum hiltneri*, *Klebsiella pneumoniae* e *Rhizobium miluonense*).

As estirpes UFLA210, UFLA211, UFLA212, UFLA213, UFLA214, UFLA215, UFLA216, UFLA219, UFLA219, UFLA223, UFLA225, UFLA227, UFLA228, UFLA229, UFLA230, UFLA231, UFLA232, UFLA233, UFLA237 e UFLA238, pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, todas provenientes da fitofisionomia Capim. A espécie mais abundante, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, foi isolada tanto em Capim quanto em Canga, representando 40,5% de todos os isolados. *Burkholderia* foi o gênero com maior diversidade em espécies, sendo isoladas em três das quatro fitofisionomias em estudo.

A espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolada nas fitofisionomias Capim e Canga em meio FAM, representa 14 das 37 estirpes totais, possui importantes características biotecnológicas relacionadas à fixação de nitrogênio, secreção de ácidos orgânicos e promoção de crescimento de plantas (Bertalan et al., 2009).

O gênero *Burkholderia*, isolado em todas as fitofisionomias exceto Mata Atlântica, em meio FAM com 8 representantes, sendo 5 identificados ao nível de gênero (UFLA217, 218, 219 e 220) e 2 espécies *B. caribenses* (UFLA214 e UFLA215) e *B. tropica* (UFLA221), é bastante discutido em trabalhos de diversidade de diazotróficos associativos possuindo potencial para fixação de nitrogênio, promoção de crescimento e tolerância a alguns metais (Moreira et al., 2008; Sun et al., 2010; Bolívar-Anillo et al., 2016). Associa-se principalmente

com gramíneas como trigo, arroz, cana-de-açúcar, promovendo o crescimento de plantas e a diminuição de fertilizantes também é comprovada. A associação com gramíneas também é característica extensiva aos gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Gluconacetobacter* (Bertalan et al., 2009; Sabino et al., 2012; Moreira et al., 2016).

O gênero *Rhizobium*, isolado em meio NFb da fitofisionomia Capim (UFLA 242, 243, 244 E 245), corrobora com Castro et al. (2017) que estudou as mesmas fitofisionomias e obteve espécies deste gênero. Este gênero possui espécies diazotróficas nodulíferas que promovem o aporte suficiente de nitrogênio em simbiose com plantas leguminosas (Moreira, 2010), fato que não impede seu isolamento em solução de solo, pois este gênero está presente no ambiente edáfico antes de estabelecer simbiose com leguminosas, podendo também estar ligado à promoção de crescimento de não leguminosas. Mishra et al. (2006) e Filho et al. (2016) demonstram que a utilização de rizóbio incrementa a produção de matéria-seca da parte aérea em arroz.

UFLA210 isolada em meio NFb pertence ao gênero *Agrobacterium* comumente encontrado em solos. Trata-se de um gênero de grande importância biotecnológica e fitoremediadora, contém o plasmídeo Ri (indutor de raízes). Naturalmente no solo, *Agrobacterium rhizogenes* - espécie à qual pertence a estirpe UFLA209 isolada em meio FAM e fitofisionomia Capim, induz as chamadas “hairry root” ou raízes peludas (Moreira e Siqueira, 2006). São utilizadas na engenharia genética como cultura de tecidos para produção de metabólitos secundários e proteínas recombinantes e em estudos de metabolismo de plantas (Ron et al., 2014).

O gênero *Caulobacter* pode ser encontrado em diversos tipos de ambientes incluindo solo. As estirpes UFLA 222 e UFLA 223, isoladas em meio FAM provenientes da fitofisionomia Capim, pertencem a este gênero com 99% de similaridade em comparação às estirpes depositadas no Genbank, segundo sequenciamento do gene 16S rDNA. Algumas das

características observadas referente à cor branca e pH de crescimento entre 6 e 6,8 do meio utilizado, tanto no isolamento quanto na caracterização cultural destas estirpes, corroboram com a estirpe 7F14^T isolada de solo rizosférico sob cultivo de melancia mencionada no trabalho de Sun et al. (2017), onde esta formou linhagem filogenética dentro do gênero *Caulobacter*. Este gênero também se encontra relacionado à degradação de pireno em solos contaminados com HPA (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) (Jones et al., 2008).

UFLA240, isolada em meio NFB na fitofisionomia Capim pertencente à família Enterobacteriaceae e ao gênero *Klebsiella*, é comumente isolada em solo. Este gênero em solo rizosférico apresenta alta produção de sideróforos podendo ser relacionada à promoção de crescimento de plantas (Moreira et al., 2016). A espécie *Klebsiella pneumoniae* isolada de um solo sob cultivo de eucalipto possui capacidade para solubilização de fósforo (Massenssini et al., 2016). Segundo Torres (2016) e Pereira (2016), indivíduos desta espécie são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e podem ser patógenos oportunistas de seres humanos, ligados a infecções hospitalares.

Conclusão

O maior número de isolados foi obtido na fitofisionomia Capim, no período seco e meio FAM. As densidades das bactérias diazotróficas foram baixas em todas as fitofisionomias, porém Capim foi a fitofisionomia com maior densidade, mostrando que essas bactérias sofrem influência da vegetação associada. *Burkholderia* foi o único gênero isolado nas três fitofisionomias e a espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada em maior número. As espécies e gêneros obtidos neste isolamento podem ser usados em estudos futuros com interesse biotecnológico e ambiental.

Agradecimentos

Agradecemos as agências de fomento Capes, FAPEMIG e CNPq pelo financiamento, bolsas de estudo e bolsa de produtividade em pesquisa e a empresa VALE S.A.

Referências

BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: Avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O. et al., (eds). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999, p.621-666.

BARBIERI, J.C. **Gestão ambiental empresarial: conceitos, modelos instrumentos**. 2. ed. São Paulo: Saraiva, 2007, 328p.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PÁDUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; FRANÇA, L. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC genomics**, v. 10, p. 1-17, 2009.

BOLÍVAR-ANILLO, H.J.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.L.; TEHERÁN-SIERRA, L.G. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 19, p. 102-108, 2016.

CASTRO, J.L.; SOUZA, M.G.; RUFINI, M.; GUIMARÃES, A.A.; RODRIGUES, T.L.; MOREIRA, F.M.S. Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2017; 41:e0160525. DOI 10.1590/18069657rbcS20160525.

COSTA, M.L. Introdução ao intemperismo laterítico e à lateritização. In: LICHT, O.A.B.; MELLO, C.S.B.; SILVA, C.R. (Eds.). **Prospecção Geoquímica de Depósitos Minerais Metálicos, Não-Metálicos, Óleo e Gás**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Geoquímica, 2007, p. 200-236.

DÖBEREINER, J.;BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA- CNPAB, 1995. 60p.

FILHO, B.D.O.; BINZ, A.; LIMA, R.F.; GIONGO, A.; SÁ, E.L.S. Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 46, p. 478-485, 2016.

JONES, M.D.; SINGLETON, D.R.; CARSTENSEN, D.P.; POWELL, S.N.; SWANSON, J.S.; PFAENDER, F.K.; AITKEN, M.D. Effect of incubation conditions on the enrichment of pyrene-degrading bacteria identified by stable-isotope probing in an aged, PAH-contaminated soil. **Microbial ecology**, v. 56, p. 341-349, 2008.

MACGRADY, M.H. The numerical interpretation of fermentation-tube results. In: PELLER, J.T.; MACCLURE, F.D. Most Probable Number Determination. **Bacteriological Analytical Manual**. AOAC International, 1992. p.439-442.

MAGALHÃES, F.M.; DÖBENREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v. 4, p. 246-252, 1984.

MASSENSINI, A.M.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C.; COSTA, M.D. isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from *Eucalyptus* sp. rhizosphere. **Revista Árvore**, v. 40, p. 125-134, 2016.

MELLONI, R.; NOBREGA, 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.

MISHRA, R.P.N. SINGH, R.K.; JAISWAL, H.K.; KUMAR V.; MAURYA, S. *Rhizobium*-mediated induction of phenolics and plant growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.). **Current Microbiology**, v.52, p.383-389, 2006.

MOREIRA, F.; LANGE, A.; KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; NÓBREGA, R.S.; LIMA, A.S. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 749-761, 2008.

MOREIRA, F.D.S.; COSTA, P.B.D.; SOUZA, R.D.; BENEDUZI, A.; LISBOA, B.B.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M. Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, p. 111-121, 2016.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 2006. 729p.

MOREIRA, F.M.S. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010

NIEMANN, S.; PÜHLER, A., TICHY, H.V.; SIMON; R., SELBITSHKA, W. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p. 477-448, 1997.

PALMER, K.M.; YOUNG, J.P.W. 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.

PEREIRA, P.S. **Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil**. 2016. Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz , Rio de Janeiro.

RON, M.; KAJALA, K.; PAULUZZI, G.; WANG, D.; REYNOSO, M.A.; ZUMSTEIN, K.; FEDERICI, F. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model. **Plant physiology**, v. 166, p. 455-469, 2014.

SABINO, D.C.C.; FERREIRA, J.S.; GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, V.L.D.; DA CONQUISTA, V. Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 2337-2345, 2012.

SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; LIMA, A.S.; BARBERI, A.; MOREIRA, F.M.S. Density and diversity of diazotrophic bacteria isolated from Amazonian soils using N-free semi-solid media. **Sientia Agricola**. v. 68, p 518-526, 2011.

SILVA, T.F.; MELLONI, R. Density and phenotypic diversity of non-symbiotic diazotrophic bacteria in soils of the Biological Reserve Serra dos Toledos, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 359-371, 2011.

SUN, L.N., YANG, E.D., HOU, X.T., WEI, J.C., YUAN, Z.X., WANG, W.Y. *Caulobacter rhizosphaerae* sp. nov., a stalked bacterium isolated from rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 1771-1776, 2017.

SUN, L.N.; ZHANG, Y.F.; HE, L.Y., CHEN, Z.J.; WANG, Q.Y.; QIAN, M., SHENG, X.F. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 501-509, 2010.

TORRES, L.C. **Interação *Candida albicans* com *Acinetobacter baumannii* E *Klebsiella pneumoniae* em biofilmes multiespécies.** 2016. 50p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

Tabela 1. Análise química e física dos solos coletados nas áreas sob vegetação de Canga, Capim, Cerrado e Mata Atlântica no Centro de Tecnologia de Ferrosos – CTF Miguelão e na Mina Córrego do Feijão, da Vale S/A.) (CASTRO et al., 2017).

Áreas	pH ¹	1,56										
		K ²	P ²	Ca ¹	Mg ¹	Al ¹	H+Al ⁴	SB ¹	t ¹	T ¹	V ¹	m
		--- mg dm ⁻³ ---			----- cmol _c dm ⁻³ -----					----- % -----		
Canga	4,72 b	56,80 b	1,59 b	1,28 a	0,24 a	0,85 b	12,64 a	1,66 a	2,51 a	14,31 a	13,56 b	33,78 b
Capim	5,60 a	88,20 a	1,66 b	0,75 a	0,30 a	0,09 c	1,94 b	1,27 a	1,36 b	3,21 b	40,73 a	6,76 c
Cerrado	4,97 b	72,60 a	1,36 b	0,91 a	0,38 a	1,56 a	15,46 a	1,47 a	3,03 a	16,94 a	12,72 b	46,13 b
MA	4,21 c	75,60 a	2,15 a	0,99 a	0,45 a	1,90 a	12,26 a	1,63 a	3,53 a	13,89 a	13,64 b	59,30 a
		M.O ¹	P-rem ²	Zn ²	Fe ²	Mn ²	Cu ²	B ¹	S ³	Argila ¹	Silte ¹	Areia ¹
		dag kg ⁻¹	mgL ⁻¹	----- mg dm ⁻³ -----				----- dag kg ⁻¹ -----				
Canga	7,58 a	12,71 a	3,29 a	403,7 a	88,88 a	0,57 b	0,26 a	26,58 b	21,40 c	17,40 a	61,20 a	
Capim	1,38 c	11,03 a	1,60 b	150,8 b	104,00 a	2,14 a	0,15 a	45,14 a	24,90 c	26,20 a	48,90 b	
Cerrado	8,30 a	4,56 b	3,13 a	134,5 b	112,29 a	0,79 b	0,20 a	36,29 a	37,60 b	24,30 a	38,10 c	
Mata Atlântica	4,94 b	11,02 a	1,92 b	124,7 b	40,76 b	0,80 b	0,20 a	29,06 b	45,60 a	18,80 a	35,60 c	

Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. pH em água; Ca – Mg – Al – Extrator: KCl – 1mol/L; SB= Soma de bases trocáveis; CTC (T) – Capacidade de Troca catiônica a pH 7,0; m= Índice de Saturação de Alumínio; Prem: Fósforo remanescente; Mat. Org. (MO) – Oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10N; S – Extrator Fosfato monocálcico ácido acético; P – Na – K – Fe – Zn – Mn – Cu – Extrator Melich1; H + Al – Extrator: SMP; CTC (t) – Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; V= Índice de Saturação de Bases; B –Extrator água quente. Atributos analisados de acordo com as metodologias propostas por: 1. Vettori (1969). 2. Mehlich (1953). 3. Richards (1954). 4. Shoemaker et al. (1961).

Tabela 2. Porcentagem de frascos positivos de bactérias diazotróficas associativas em área de mineração de ferro (método semiquantitativo).

FITOFISIONOMIA	SECO	
	% FAM ⁽¹⁾	% NFb ⁽²⁾
Capim	4 a	6 a
Canga	8 a	0 b
Cerrado	0 a	0 b
Mata Atlântica	0 a	0 b
CV ⁽³⁾ (%)	6,92	4,94

⁽¹⁾Porcentagem de frascos positivos obtidos de 50 observados em meio FAM para cada fitofisionomia;

⁽²⁾Porcentagem de frascos positivos obtidos de 50 observados em meio NFb para cada fitofisionomia; ⁽³⁾CV – coeficiente de variação.

Tabela 3. Densidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas nos períodos seco e úmido obtidas pelo método de número mais provável.

ÁREA	SECO		ÚMIDO	
	NMP FAM ⁽¹⁾	NMP NFb ⁽²⁾	NMP FAM ⁽¹⁾	NMP NFb ⁽²⁾
Capim	3,3 X10 ¹ a	0,7 X10 ¹ a	2,9 X10 ¹ a	1,5 X10 ¹ a
Canga	2,8 X10 ¹ a	0 a	0,5 X10 ¹ b	0 b
Cerrado	0 a	0 a	0,8 X10 ¹ b	0 b
Mata Atlântica	0 a	0 a	0 b	0 b
CV ⁽³⁾ (%)	120,02	53,81	70,98	74,71

⁽¹⁾ NMP – Média do número mais provável de células por grama de solo obtido em meio de cultura FAM para cada área; ⁽²⁾ NMP- Média do número mais provável de células por grama de solo obtido em meio de cultura NFb para cada área; ⁽³⁾ CV – coeficiente de variação.

Tabela 4. Caracterização morfológica das estirpes.

Caracterização morfológica em meio Batata										
Estirpes	TC ⁽¹⁾	Ø ⁽²⁾	Forma	Elevação	Borda	Superf. ⁽³⁾	Muco	Consist ⁽⁴⁾	Detalhes ópticos	Cor
UFLA209	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Elástica	Brilhante	Branca
UFLA210	3	0,3	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Escasso	Elástica	Brilhante	Branca
UFLA211	3	0,3	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Rosada
UFLA212	3	0,3	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Rosada
UFLA213	3	0,4	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA214	3	0,4	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA215	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Rugosa	Pouco	Elástica	Brilhante	Branca
UFLA216	3	0,5	Irregular	Umbilicada	Ondulada	Rugosa	Pouco	Elástica	Brilhante	Creme
UFLA217	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Elástica	Brilhante	Creme
UFLA218	3	0,2	Irregular	Umbonada	Lobada	Lisa	Pouca	Gomosa	Opaco	Creme
UFLA219	3	0,4	Irregular	Umbonada	Ondulada	Rugosa	Escasso	Elástica	Opaco	Creme
UFLA220	3	>0,5	Irregular	Umbonada	Ondulada	Rugosa	Pouco	Elástica	Brilhante	Creme
UFLA221	3	0,3	Irregular	Umbonada	Ondulada	Rugosa	Escasso	Elástica	Opaco	Creme
UFLA222	3	0,5	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Moderada	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA223	3	0,1	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA224	3	0,3	Irregular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA225	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA226	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA227	3	0,1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA228	3	0,1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA229	3	0,1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA230	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA231	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA232	3	0,3	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA233	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA234	3	0,1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA235	3	0,1	Irregular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA236	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA237	3	-	Puntiforme	-	-	-	-	-	-	-
UFLA238	3	0,3	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA239	3	0,2	Circular	Lenticular	Inteira	Lisa	Pouco	Elástica	Brilhante	Branca
UFLA240	3	0,7	Irregular	Umbonada	Inteira	Rugosa	Moderada	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA241	3	0,2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA242	3	0,3	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA243	3	0,4	Circular	Convexa	Inteira	Lisa	Pouco	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA244	3	0,2	Circular	Pulvinada	Inteira	Lisa	Moderado	Gomosa	Brilhante	Branca
UFLA245	3	0,3	Irregular	Convexa	Inteira	Lisa	Moderado	Gomosa	Brilhante	Branca

⁽¹⁾Tempo de crescimento das colônias em dias; ⁽²⁾Diâmetro das colônias em cm; ⁽³⁾Superfície das colônias;

⁽⁴⁾Consistência das colônias.

Tabela 5. Origem e identificação das estirpes isoladas das fitofisionomias sob influência de mineração de ferro.

Estirpes	Meio ⁽¹⁾	Diluição ⁽²⁾	Período ⁽³⁾	Origem ⁽⁴⁾	Espécie	Identificação baseada no acesso de maior similaridade encontrado no Genbank		
						NPB ⁽⁵⁾	%	N. de acesso NCBI
UFLA209	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	622 ^R	99	KM491515.1
UFLA210	NFb	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Agrobacterium sp</i>	1149 ^C	99	AB247607.1
UFLA211	NFb	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Azospirillum brasilense</i>	873 ^R	100	KP676398.1
UFLA212	NFb	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Azospirillum brasilense</i>	872 ^R	100	KP676398.1
UFLA213	NFb	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Azospirillum sp.</i>	1195 ^C	99	KY399208.1
UFLA214	FAM	10 ⁻²	Úmido	Capim	<i>Burkholderia caribensis</i>	1297 ^C	99	CP013103.1
UFLA215	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Burkholderia caribensis</i>	734 ^R	99	CP013103.1
UFLA216	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Burkholderia sp.</i>	1304 ^C	99	AB911055.1
UFLA217	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Burkholderia sp.</i>	1122 ^C	99	EU418711.1
UFLA218	FAM	10 ⁻²	Úmido	Capim	<i>Burkholderia sp.</i>	1122 ^C	99	EU677416.1
UFLA219	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Cerrado	<i>Burkholderia sp.</i>	807 ^R	99	EU677416.1
UFLA220	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Canga	<i>Burkholderia sp.</i>	602 ^R	99	KT387847.1
UFLA221	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Cerrado	<i>Burkholderia tropica</i>	678 ^F	99	EU723241.1
UFLA222	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Caulobacter sp.</i>	1146 ^C	99	KP165519.1
UFLA223	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Caulobacter sp.</i>	1185 ^C	99	KP165519.1
UFLA224	FAM	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1174 ^C	98	NR074284.1
UFLA225	FAM	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	935 ^C	98	NR074284.1
UFLA226	FAM	10 ⁻¹	Seco	Canga	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1297 ^C	98	NR074284.1
UFLA227	FAM	10 ⁻¹	Seco	Canga	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	937 ^C	98	NR074284.1
UFLA228	FAM	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1150 ^C	98	NR074284.1
UFLA229	FAM	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	795 ^R	98	NR074284.1
UFLA230	FAM	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1258 ^C	98	NR074284.1
UFLA231	FAM	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	514 ^R	98	NR074284.1
UFLA232	FAM	10 ⁻³	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1263 ^C	98	NR074284.1
UFLA233	FAM	10 ⁻²	Seco	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1241 ^C	98	NR074284.1
UFLA234	FAM	10 ⁻¹	Seco	Canga	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1194 ^C	98	NR074284.1
UFLA235	FAM	10 ⁻¹	Seco	Canga	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1236 ^C	98	NR074284.1
UFLA236	FAM	10 ⁻¹	Seco	Canga	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	1198 ^C	98	NR074284.1
UFLA237	FAM	10 ⁻¹	Seco	Canga	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	842 ^C	98	NR074284.1
UFLA238	FAM	10 ⁻¹	úmido	Capim	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	734 ^R	98	NR074284.1
UFLA239	FAM	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Herbaspirillum hilmeri</i>	1243 ^C	99	CP011409.1
UFLA240	NFb	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	730 ^F	100	AY918489.1
UFLA241	NFb	10 ⁻¹	seco	Capim	<i>Rhizobium miluonense</i>	1247 ^C	100	JN896360.1
UFLA242	NFb	10 ⁻¹	Seco	Capim	<i>Rhizobium sp.</i>	624 ^R	99	EU340903.1
UFLA243	NFB	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Rhizobium sp.</i>	1207 ^C	100	KY084449.1
UFLA244	NFb	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Rhizobium sp.</i>	1186 ^C	99	KY084449.1
UFLA245	NFb	10 ⁻¹	Úmido	Capim	<i>Rhizobium sp.</i>	487 ^R	99	KY084449.1

⁽¹⁾Meio de cultivo utilizado para o isolamento; ⁽²⁾ Diluição de obtenção dos isolados; ⁽³⁾ Período de coleta das amostras de solo; ⁽⁴⁾ Fitofisionomia; ⁽⁵⁾ NPB – número de pares de bases obtidos no sequenciamento parcial do gene 16S; ^C – sequências obtidas por “Contigs”; ^R – sequências obtidas por “Reverse”; ^F –sequências obtidas por Forward.

Figura 1. Mapa mostrando a localização dos pontos de coleta nos municípios de Brumadinho-MG e Nova Lima-MG nas fitofisionomias de Cerrado (CE), Canga (CR), Mata Atlântica (F) e Capim (CA) (CASTRO et al., 2017).

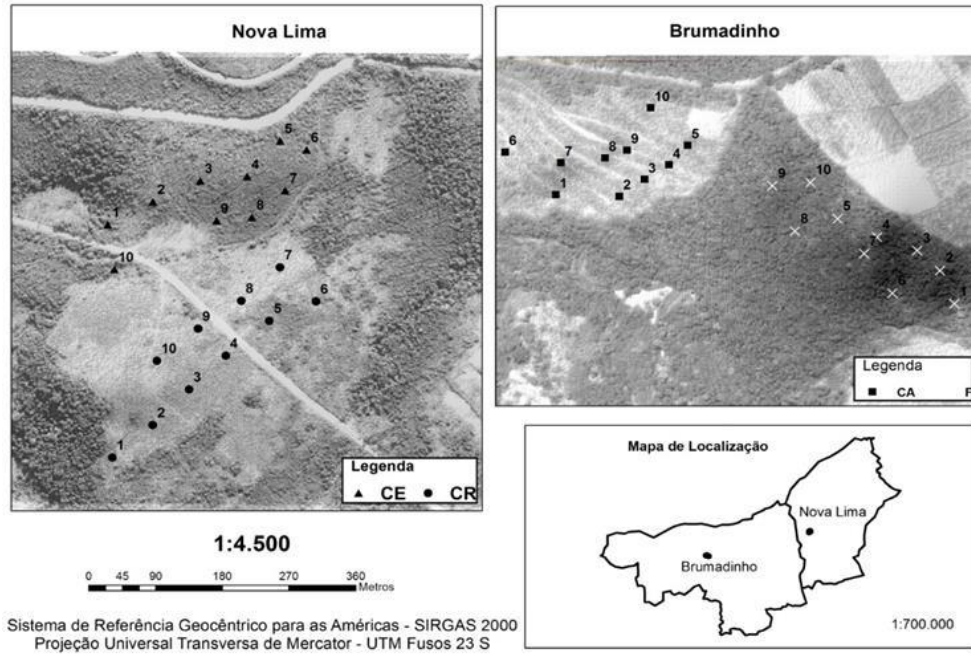


Figura 2. Aspecto das colônias em meio Batata de estirpes isoladas na fitofisionomias em estudo. (CONTINUA)

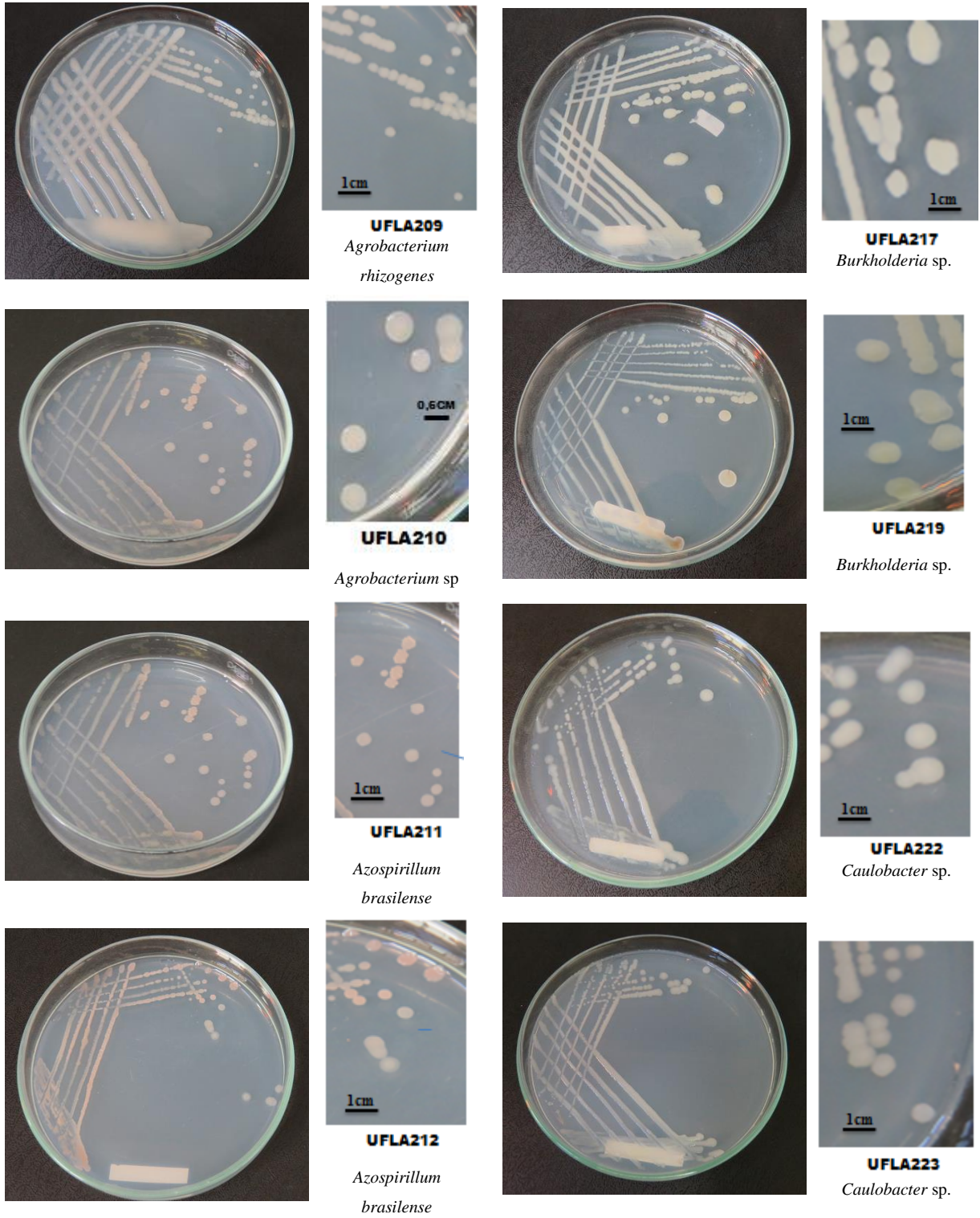
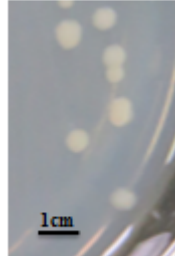
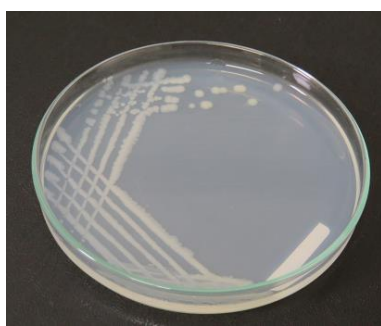


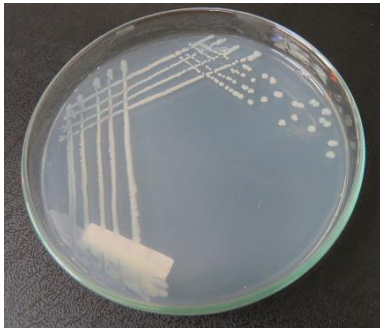
Figura 2. (CONTINUAÇÃO) Aspecto das colônias em meio Batata de estirpes isoladas na fitofisionomias em estudo.



UFLA224
gluconacetobacter diazotrophicus



UFLA238
gluconacetobacter diazotrophicus



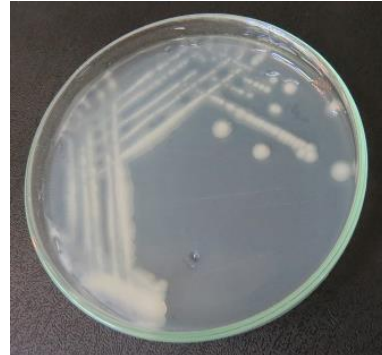
UFLA235
gluconacetobacter diazotrophicus



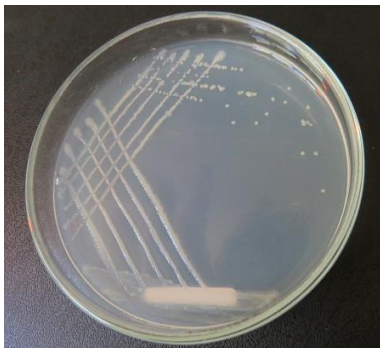
UFLA239
Herbaspirillum hitneri



UFLA236
gluconacetobacter diazotrophicus



UFLA240
Klebsiella pneumoniae



UFLA237
gluconacetobacter diazotrophicus



UFLA243
Rhizobium sp.

ANEXOS

ANEXO A – Caracterização dos meios de cultura

Meio de cultura NFb (Döbereiner et al., 1995)

Reagentes	Quantidades
ácido málico	5,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,2g
NaCl	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
solução de micronutrientes	2mL
azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH)	2mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4mL
Solução de vitaminas	1mL
KOH	4,5g

Ajustar o pH para 6,8 com KOH e completar o volume para 1000mL com água destilada. Colocar as substâncias na ordem indicada.

Para meio semissólido, adicionar 1,25g de Agar por litro, e para meio sólido adicionar 15g de Agar por litro.

Solução de micronutrientes

Reagente	Quantidade
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,04g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,20g
H ₃ BO ₃	1,40g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,00g
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175g

Completar o volume para 1000 mL com água destilada.

Solução de vitaminas

Reagente	Quantidade
Biotina	10mg
Piridoxol-HCL	20mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100mL com água destilada.
Manter a solução em geladeira.

Meio de cultura FAM (Magalhães e Döbereiner, 1984).

Reagentes	Quantidades
Sacorese	5,0g
KH ₂ PO ₄	1,8g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
solução de micronutrientes	2mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4mL
Solução de vitaminas	1mL

Ajustar o pH para 6,0 e completar o volume para 1000mL com água destilada. Adicionar 1,8g de Agar para meio semissólido e 17g para meio sólido.

Meio de cultura Batata

Reagentes	Quantidades
Batata	200g
Ácido málico	2,5g
Açúcar crital	2,5g
Solução de micronutrientes	2mL
Solução de vitaminas	1mL

Modo de preparo:

Pesar 200g de batata inglesa, descascar e cozinhar durante 30 minutos em água destilada. Em seguida filtrar em funil com algodão. Misturar as quantidades do ácido málico e açúcar dissolvendo-os em água destilada até 50mL, ajustando o pH para 6,5 a 7,0 com KOH. Adicionar no filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. Completar para 1000mL com água destilada.