

SERGIO ALBERTO DÍAZ GALLO

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Crotalaria spectabilis* EM REJEITO DA
MINERAÇÃO DE OURO POR FUNGOS RIZOSFÉRICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D542p
2014

Díaz Gallo, Sergio Alberto, 1989-

Promoção do crescimento de *Crotalaria spectabilis* em
rejeito da mineração de ouro por fungos rizosféricos / Sergio
Alberto Díaz Gallo. – Viçosa, MG, 2014.

x,60f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungos - Solos. 2. *Crotalaria spectabilis*. 3. Plantas -
Crescimento. 4. Arsênio. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5

SERGIO ALBERTO DÍAZ GALLO

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Crotalaria spectabilis* EM REJEITO DA
MINERAÇÃO DE OURO POR FUNGOS RIZOSFÉRICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2014.

Prof. Luiz Eduardo Dias

Prof^a. Cynthia Canêdo da Silva

Prof. Igor Rodrigues de Assis
(Coorientador)

Prof. Wendel Batista da Silveira

Prof. Maurício Dutra Costa
(Orientador)

À minha mãe e aos meus avós.

Aos meus amigos.

À minha família.

A todo o pessoal envolvido.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar o curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, e à minha mãe, pelos recursos concedidos ao longo de um ano.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação, pela aprendizagem e pela paciência.

Aos professores Igor Rodrigues de Assis, Luiz Eduardo Dias e Olinto Liparini Pereira, pelas contribuições e pelos conselhos.

Aos professores Cynthia Canêdo da Silva e Wendel Batista da Silveira, pelas contribuições para o trabalho e pela participação na defesa da dissertação.

Aos estagiários Ana Clara, Ramon, Thalita, Josi, Helena, Víctor Hugo, pela ajuda na execução dos experimentos.

A Christiane, ao André e ao Marcos, pela ajuda nas análises estatísticas e na língua portuguesa.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e do Laboratório de Associações Micorrízicas.

BIOGRAFIA

Sergio Alberto Díaz Gallo, filho de Gladys Gallo Rodrigues e Jesus Alberto Díaz Ariza, nasceu em Bogotá D.C., no dia 13 de abril de 1989. Em 2006, ingressou na Pontificia Universidad Javeriana, graduando-se em Microbiologia Agrícola y Veterinaria em fevereiro de 2012. Em julho de 2012, iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Situação atual do Brasil frente à mineração do ouro	4
Mineração e desequilíbrio ambiental	4
Presença do arsênio no ambiente.....	5
Salinidade no solo.....	6
Importância das plantas na recuperação de áreas degradadas	6
Uso de <i>Crotalaria spectabilis</i>	7
Importância dos microrganismos no ambiente	8
Fungos promotores do crescimento vegetal.....	9
Auxinas	9
Giberelinas.....	10
Citocininas	11
Sideróforos	11
Disponibilização de nutrientes.....	12
BIBLIOGRAFIA	14
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Crotalaria spectabilis</i> EM REJEITO DA MINERAÇÃO DE OURO POR FUNGOS RIZOSFÉRICOS.....	21
ABSTRACT.....	23

INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44
APÊNDICE	48

RESUMO

DÍAZ GALLO, Sergio Alberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014.
Promoção do crescimento de *Crotalaria spectabilis* em rejeito da mineração de ouro por fungos rizosféricos. Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Igor Rodrigues de Assis e Olinto Liparini Pereira.

A presença de arsênio (As) e a elevada salinidade de alguns rejeitos oriundos do processo de mineração de ouro dificultam as ações de revegetação dos locais de deposição desses materiais. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de isolar e caracterizar fungos rizosféricos que contribuam para o crescimento de *Crotalaria spectabilis* Roth. em condições de elevada salinidade e disponibilidade de As, comuns nos rejeitos da mineração do ouro. Os isolados foram obtidos a partir da rizosfera de gramíneas cultivadas em bacias com diferentes tipos de rejeitos denominados 'rejeito B1' 'rejeito B2' e 'Blend', no Município de Paracatu, MG. O rejeito B1 corresponde a um substrato mais intemperizado, com menor teor de sulfetos; o rejeito B2 é substrato pouco intemperizado, com maior teor de sulfetos; e o Blend é oriundo do processamento dos dois substratos juntos. Foram obtidos 227 isolados fúngicos a partir da rizosfera de plantas cultivadas nesses substratos, dos quais 57 foram selecionados segundo características morfológicas distintas. Em um primeiro experimento, quando inoculados no sistema radicular de *C. spectabilis*, cultivada em mistura de solo e areia, 7:3 (v/v), os isolados 8, 27, 31, 33, 44, 45, 49, 50, 54 e 57 promoveram incrementos de até 65,8 % da matéria seca total das plantas em comparação ao controle, sem inoculação. Esses dez isolados fúngicos expressaram mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, tais como a produção de ácido indol-3-acético (AIA) e de giberelinas (GAs) e a solubilização de fosfatos. A produção máxima de AIA foi de 23 mg L⁻¹, obtida pelo isolado 27. O isolado 44 teve produção de 45,4 mg L⁻¹ de GAs. A fonte de fosfato inorgânico mais solubilizada foi o fosfato de cálcio, com valores entre 47 e 655 mg L⁻¹ de P solubilizado. Em um segundo experimento, foi testada a capacidade de promoção de crescimento de *C. spectabilis* dos isolados inoculados no sistema radicular da planta

cultivada em solo (Latossolo) e nos rejeitos B1, B2, Blend e Mix (mistura de areia com B2 na proporção 8:2, v/v). Os dez isolados fúngico selecionados promoveram diferenças significativas na produção de matéria seca das plantas, a depender do substrato utilizado para o cultivo. No Latossolo, o isolado 57 teve o melhor desempenho. No rejeito B1 e B2, os isolados 31, 33 e 49 proporcionaram maior aumento da produção de matéria seca total. No substrato Blend, os melhores isolados foram o 27, 44 e 57. Já no substrato denominado Mix, os isolados que demonstraram maior capacidade de promoção do crescimento de *C. spectabilis* foram o 33, 49 e 57. Esses resultados indicam a necessidade de seleção prévia dos microrganismos com maior potencial para um dado local ou substrato. O uso de fungos promotores de crescimento de planta é uma estratégia promissora para a revegetação de áreas de deposição dos rejeitos da mineração do ouro.

ABSTRACT

DÍAZ GALLO, Sergio Alberto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2014. **Growth promotion of *Crotalaria spectabilis* in gold mine tailings by rhizospheric fungi.** Advisor: Maurício Dutra Costa. Co-Advisors: Igor Rodrigues de Assis and Olinto Liparini Pereira.

The presence of arsenic (As) and the high salinity of gold mine tailings make it difficult to reclaim mined sites and tailing deposits. Thus, the objective of this work was to isolate and characterize rhizospheric fungi capable of promoting *Crotalaria spectabilis* Roth. growth under high salinity and As availability prevalent in the gold mine tailings. The fungal isolates were obtained from the rhizosphere of plants grown in different tailings, namely B1, B2, and Blend, at Paracatu, MG, Brazil. The B1 tailing corresponds to a weathered substrate, with low sulfite content; the B2 tailing is a less weathered substrate than B1 and contains high sulfite levels; the Blend results from the processing of B1 and B2 simultaneously. A total of 227 fungal isolates were obtained, from which 57 were selected based on distinct morphological traits. In a first experiment, when the selected isolates were inoculated onto the roots of *C. spectabilis*, grown in a soil:sand mixture, 7:3 (v/v), the isolates 8, 27, 31, 33, 44, 45, 49, 50, 54, and 57 promoted increases in total dry matter of up to 65.8% in comparison to the control, without inoculation. These isolates were also capable of expressing plant growth promoting mechanisms *in vitro*, such as indol-3-acetic acid (IAA) and gibberellin (GAs) production and phosphate solubilization activity. The maximum production of IAA was 23 mg L⁻¹ by the isolate 27. The isolate 44 produced 45.4 mg L⁻¹ of GAs. The solubilization of calcium phosphate varied from 47 to 655 mg L⁻¹ soluble P. In a second experiment, the inoculation of *C. spectabilis* roots, grown in a soil substrate (Oxysol), B1, B2, Blend or Mix (sand and B2 at 8:2, v/v), with the ten selected isolates promoted significant differences in total dry matter production that varied according to the substrate used for plant growth. In the Oxysol, isolate 57 had the best performance. In B1 and B2,

the isolates 31, 33, and 49 promoted the highest increases in total dry matter. In the Blend substrate, the best isolates were 27, 44, and 57. In the Mix, the isolates that showed the highest growth promoting capacity were 33, 49, and 57. Our results indicate the need to previously select the adequate microorganisms with the highest potential of use for a given location or substrate. The use of plant growth promoting fungi is a promising strategy for the reclamation mined sites and tailing deposits.

INTRODUÇÃO GERAL

O ouro, Au, é elemento químico de número atômico 79, pertencente ao grupo dos metais de transição da tabela periódica. É considerado um dos metais preciosos mais importantes, sendo usado pelo homem como padrão monetário internacional, na joalheria e nas indústrias eletrônica e civil. Por essa razão, a demanda pelo elemento no mundo é elevada, fomentando as atividades de mineração em vários países.

O Brasil ocupa o 13º lugar no *ranking* mundial de produção desse mineral, gerando divisas ao País da ordem de US\$ 2,2 bilhões por ano, com tendência de aumento desse montante a longo prazo.

Embora na atualidade tenham sido desenvolvidas diferentes técnicas para melhorar o processo de extração e purificação do metal, muitas perturbações ambientais ainda são causadas pela atividade de mineração do ouro, a exemplo da supressão da vegetação e a geração de resíduos tóxicos, contendo As e, ou Hg, que levam à perda das propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo. Tais perturbações afetam negativamente as plantas, os animais silvestres e os microrganismos presentes na área explorada, levando ao comprometimento da capacidade de resiliência do ambiente e, por consequência, da capacidade de ciclagem biogeoquímica.

No caso das jazidas de ouro, a presença do As na forma de minerais primários (arsenopirita, orpimento e realgar) ou em formas iônicas (arsenatos e arsenitos) é comum. Por essa razão, para a autorização do licenciamento ambiental visando à extração do minério, o Brasil exige, por meio da legislação vigente, estudos de impacto ambiental e o relatório de impacto ambiental no qual, dentre outros documentos, deve constar a elaboração e execução de Plano de Recuperação de Área Degradada (PRAD), cujos objetivos podem ser a reabilitação, a recuperação, a regeneração, a restauração do solo ou mudanças no uso do mesmo após o processo de mineração.

A capacidade de recuperação de áreas degradada depende da disponibilidade de nutrientes e água para que os diferentes organismos possam se desenvolver, razão pela qual têm sido incluídos em alguns PRADs, a adição de resíduos orgânicos naturais ou a introdução de produtores primários de biomassa, representados majoritariamente pelas plantas. Nesse contexto, a *Crotalaria spectabilis* Roth. é reconhecidamente tolerante ao As, podendo ser introduzida como pioneira em áreas contaminadas com esse elemento. Esta espécie apresenta ainda bom desenvolvimento radicular em solos compactados.

Por outro lado, o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal tem sido preconizado com vistas à introdução de plantas pioneiras em áreas degradadas pela atividade de mineração. Esses microrganismos habitam a rizosfera da planta e promovem crescimento vegetal por meio de vários mecanismos, dentre os quais citam-se a fixação de N₂, a solubilização de fosfato, a produção da desaminase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC desaminase), a produção de fitormônios e sideróforos e a supressão de patógenos. Além desses mecanismos, os microrganismos promotores de crescimento vegetal beneficiam as plantas por meio da detoxificação de espécies reativas de oxigênio, comumente induzidas sob condições de estresse. Esse benefício é obtido pela produção e secreção das enzimas catalase, peroxidase, superóxido-dismutase, glutatona-peroxidase e ascorbato-peroxidase pelo microrganismo.

Tendo em vista as múltiplas interações benéficas entre plantas e microrganismos rizosféricos, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar fungos rizosféricos que contribuam para o desenvolvimento de *C. spectabilis* em condições de elevada salinidade e disponibilidade de As, visando à revegetação de áreas de deposição dos rejeitos da mineração de ouro.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Situação atual do Brasil frente à mineração do ouro

O ouro é um dos metais preciosos mais importantes e explorados no mundo. A China é a maior produtora, com 13,14 % da produção mundial, seguida pela Austrália (10 %), EUA (8,77 %), África do Sul (7,03 %) e, na 13ª colocação, o Brasil, com 2,44 % em 2011 (IBRAM, 2013).

No Brasil, as reservas de ouro estão estimadas em 2,6 mil toneladas, estando distribuídas nos estados do Pará (42,7 %), Minas Gerais (28 %), Mato Grosso (6,9 %), Goiás (5 %), Bahia (4,5 %) e outras unidades federativas (12,9 %). Nessas regiões, as principais empresas que realizam a extração do mineral são a Kinross (29 %), a Anglo Gold Ashanti (22 %), a Yamana Gold (17 %), a Jaguar Mining (7 %) e outras empresas (13 %). A atividade de mineração no Brasil contabilizou o aporte de quase US\$ 2,2 bilhões em divisas para o País em 2011. O ouro é o segundo mineral mais importante em termos de exportação, atrás apenas do minério de ferro (IBRAM, 2013).

Mineração e desequilíbrio ambiental

No processo de lavra a céu aberto, a extração do metal remove completamente a flora, a fauna e parte do solo. Após a mineração, as áreas exploradas caracterizam-se pelo baixo conteúdo de matéria orgânica, baixo teor de nutrientes e pelas perdas das propriedades biológicas do solo (OHSOWSKI *et al.*, 2012). Essas mudanças nas características físico-químicas e biológicas do solo levam à maior compactação do mesmo, afetando a distribuição de água no lençol freático, e à maior resistência à penetração das raízes de plantas pioneiras (ROSOLEM *et al.*, 2002; SCHIMANN *et al.*, 2012). Na ausência de raízes, os microrganismos associados sofrem diminuição significativa em suas funções ecológicas, a exemplo da capacidade de destoxificação e de ciclagem biogeoquímica (NESSNER & ESPOSITO, 2010). Outro fator que afeta a capacidade funcional dos microrganismos é o acúmulo de elementos químicos tóxicos como o As, o Bi, o Cd, o Cu, o Se, o Te, o Pb, o Hg, o Zn e os cianetos (RODRIGUES *et al.*, 2004; PETERSON & HEEMSKERK, 2005; ARETS *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2008; ASSIS, 2010; KYLE *et al.*, 2012; MAPELLI *et al.*, 2012). Outras atividades executadas por microrganismos também podem ser afetadas negativamente como consequência da mineração do ouro, como reportado por Schimann *et al.* (2012), os quais avaliaram a atividade da enzima desnitrificadora (DEA) e a respiração tanto dos solos da mina como do solos da reserva. As áreas de lavra tiveram diminuição de 10 vezes no valor da DEA e diminuição da respiração de 1,63 a 0,82 $\mu\text{g C-CO}_2/\text{g}$, quando comparados com o solo de referência.

Presença do arsênio no ambiente

O arsênio (As) é elemento químico classificado como metaloide ou semimetal. Apresenta cinco estados de valência, -3, -1, 0, +3, +5, sendo que a forma inorgânica reduzida, As^{3+} , apresenta maior mobilidade no solo e na água em comparação ao As^{5+} (LADEIRA & CIMINELLI, 2000; TOUJAGUES *et al.*, 2013). Segundo a lista de substâncias perigosas para a saúde humana, estabelecida pela Agência para Substâncias Tóxicas e Registros de Doenças do Departamento de Saúde dos Estados Unidos, o As foi classificado como o elemento químico mais perigoso naquele país, desde 1997 (ATSDR, 2013). No ambiente, o As livre liga-se ao oxigênio, formando óxidos, ácidos fracos ou oxiânions, semelhantemente ao fósforo. Dessa forma, esse elemento pode competir com o P por seus sítios de absorção nas plantas (LEUNG *et al.*, 2013).

A presença de As no solo pode variar entre os estados mineral, inorgânico e orgânico. O As no estado mineral encontra-se na forma de arsenopirita ($FeAsS$), orpimento (As_2S_3) e realgar (AsS), cujos teores médios são de 2 mg kg^{-1} (CARBONELL *et al.*, 1995; ZHANG & SELIM, 2008). No estado inorgânico, está na configuração de antimonatos, arsenatos, antimonitos e arsenitos (CARBONELL *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 2010; KYLE *et al.*, 2012); e em forma orgânica, principalmente como ácido monometilarsênio (MMA) e ácido dimetilarsênio (DMA), além de arsênio-açúcares; arsênio-biotina; arsênio-colina; arsênio-lipídios (BISEEN & FRIMMEL, 2000; KYLE *et al.*, 2012).

No homem, o As altera as funções do sistema respiratório, gastrointestinal, cardiovascular, nervoso e renal. Além disso, gera lesões oculares, cutâneas e nas mucosas, sendo também cancerígeno (CARBONELL *et al.*, 1995).

O As, quando absorvido pela célula vegetal, é transportado para a parte aérea da planta (MENHARG & MACNAIR, 1990), onde interage com os grupamentos sulfídricos das proteínas e os grupamentos fosfato do DNA (WAUCHOPE, 1983). A interação do As com os grupamentos mencionados pode gerar degradação das membranas, deslocando os grupamentos fosfato da mitocôndria, além de interferir nos processos fotossintéticos (LEPP, 1981; WAUCHOPE, 1983). Na presença do As, as plantas ativam mecanismos bioquímicos de tolerância ao elemento, acumulando-o nos tecidos ou produzindo moléculas de baixo peso molecular, denominadas fitoquelatinas, que complexam o elemento (BATISTA *et al.*, 2014). As fitoquelatinas são tióis formados pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, sintetizadas pela fitoquelatina-sintase (BATISTA *et al.*, 2014). Os grupos tióis ligam-se a íons, a exemplo do Cd e do As, permitindo que as fitoquelatinas atuem como agentes quelantes, sendo armazenadas no interior dos vacúolos.

Salinidade no solo

Na mineração, é frequente a presença de compostos que contribuem para o desbalanço osmótico e iônico das células, afetando assim seu metabolismo (KHAN *et al.*, 2011; BAREEN *et al.*, 2012; KYLE *et al.*, 2012). Após o processo de extração de ouro, é comum a ocorrência de altos níveis de sódio, cálcio e cloretos nos rejeitos, induzindo estresse abiótico nas plantas (KHAN *et al.*, 2011). A toxicidade gerada pelos íons Na^+ é atribuída à competição com o K^+ . O sódio movimenta-se com mais facilidade no xilema, chegando a ser acumulado nos brotos e folhas da planta, impedindo o funcionamento celular normal (GAMALERO *et al.*, 2009). Com relação ao Cl^- , sabe-se que é um micronutriente essencial para as plantas. Tem como função manter a osmolaridade celular, mantendo estável o turgor e a osmoregulação (WHITE & BROADLEY, 2001). O cloro na célula regula algumas enzimas em nível de citoplasma e estabiliza e regula o gradiente de pH na membrana (WHITE & BROADLEY, 2001).

Plantas expostas a altas concentrações de sais apresentam clorose, redução da biomassa, limitação no desenvolvimento fisiológico, inibição da germinação de sementes, da floração e produção de frutos (GAMALERO *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2011). Sob estresse salino, há aumento na produção de etileno, plasmólise, desbalanço de nutrientes e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GAMALERO *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2011).

De modo geral, quando exposto ao estresse salino, a planta também entra em estresse hídrico, pois há mudança na absorção de água e de nutrientes e na permeabilidade das membranas, causando desidratação celular, citotoxicidade iônica, desbalanços hormonais e super-produção de EROs (PRISCO & GOMES, 2010). Em resposta ao estresse salino, as plantas ativam cascata de sinais mudando os níveis iônicos/osmóticos, visando ao fechamento dos estômatos (KHAN *et al.*, 2011). Além disso, aumentam a produção de fitormônios como o ácido abscísico, ácido jasmônico entre outros, os quais apresentam funções osmoprotetoras (KHAN *et al.*, 2011).

Importância das plantas na recuperação de áreas degradadas

Plantas como *Stylosanthes humilis*, *Arachis pintoi*, *Avena strigosa* e *Lolium multiflorum* têm sido usadas nos processos de recuperação de áreas degradadas (RADs) dentro dos processos de fitorremediação, quando há presença de altas concentrações de arsênio no solo ou nos rejeitos (MELO *et al.*, 2009; NESSNER & ESPOSITO, 2010). Em geral, as plantas usadas na RAD estão adaptadas genotípica e fenotipicamente aos fatores abióticos do meio, a exemplo do pH, altas temperaturas, umidade, concentrações de metais e sais, entre outros, favorecendo seu estabelecimento na área (VAN LOON & GLICK, 2004).

Dentro do termo fitorremediação estão incluídos os processos de fitoextração, absorção do contaminante por meio da raiz e translocação até o caule, de fitoestimulação, a raiz estimula a atividade dos microrganismos rizosféricos que apresentam a capacidade de degradar ou imobilizar o composto tóxico, de fitovolatilização, os íons dos elementos dos subgrupos II, V e VI da tabela periódica, são convertidos em formas voláteis pela raiz, (NESSNER & ESPOSITO, 2010) e de fitoestabilização, imobilização do metal, quando transformado em formas menos solúveis na superfície da raiz, nos tecidos ou no solo (MENDEZ & MAIER, 2008).

Além do uso de plantas fitorremediadoras, algumas espécies vegetais são utilizadas como adubação verde, visando à incorporação de resíduos vegetais não decompostos para aumentar o teor de matéria orgânica do solo (MENDES *et al.*, 2012). Essas plantas têm a capacidade de produzir grande quantidade de biomassa, suprindo o solo e as raízes com nutrientes e matéria orgânica (EWEL, 1976). Além disso, as raízes liberam exsudados radiculares de baixo peso molecular que favorecem a diversidade microbiana na rizosfera, modificando o micro-habitat radicular (BASHAN *et al.*, 2006; MAPELLI *et al.*, 2012).

Uso de *Crotalaria spectabilis*

Crotalaria spectabilis encontra-se classificada na tribo Crotalarieae (Benth), composta por 16 gêneros, a saber, *Aspalathus*, *Wiborgia*, *Wiborgiella*, *Calobota*, *Lebeckia*, *Rafnia*, *Ezoloba*, *Lotononis*, *Leobordea*, *Listia*, *Pearsonia*, *Rothia*, *Robynsiophyton*, *Euchlora*, *Bolusia* e *Crotalaria*. A tribo Crotalarieae pertence à subfamília das Papilionoidae, dentro da família Fabaceae (Hunt) (MARIANNE & VAN WYK, 2012). São plantas de metabolismo fotossintético C3 (CASTILHO *et al.*, 2012). O uso de *Crotalaria* spp. em regiões da Ásia, Japão, Coreia e China têm contribuído para redução da demanda de fertilizantes a base de N, pois essa planta apresenta capacidade de se associar com microrganismos fixadores (CHOI *et al.*, 2008). O reconhecimento de *Crotalaria* como planta de adubo verde deve-se ao seu rápido crescimento, elevado potencial de produção de biomassa, reciclagem de nutrientes (KAPPES *et al.*, 2011) e fácil degradação das raízes e nódulos, levando à mineralização de C e N no solo (CHOI *et al.*, 2008). Cultivos comerciais de *Crotalaria* utilizam consórcio com milho para aumentar a produção de matéria seca no solo, sem interferir na operação de colheita e na produtividade da cultura (KAPPES *et al.*, 2011; CASTILHO *et al.*, 2012).

A espécie *C. spectabilis* Roth. é conhecida como crotalária, guizo-de-cascavel e chocalho-de-cascavel. É planta de origem indiana e usada como adubo verde ou como controladora de nematoides nos sistemas de cultivo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2000). Na recuperação de áreas degradadas, *C. spectabilis* consegue desenvolver-se na presença de

As em concentrações de até 4,8 mg L⁻¹ na solução do solo, imobilizando o elemento nas suas raízes (FELIPE *et al.*, 2009). A crotalária também têm a capacidade de fragmentar o solo com vistas a aprofundar suas raízes, quebrando a resistência mecânica desse substrato. Ao fazê-lo, a planta não muda o padrão de absorção de nutrientes ou água (ROSOLEM *et al.*, 2002). Na literatura, relata-se a associação dessa planta com bactérias fixadoras de nitrogênio, a exemplo de *Methylobacterium nodulans*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Burkholderia* sp. (SY *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2007).

Importância dos microrganismos no ambiente

Estudos ecológicos das comunidades microbianas rizosféricas tomaram-se mais frequentes após os primeiros relatos de interações biológicas de microrganismos com plantas (NESSNER & ESPOSITO, 2010). O termo rizosfera refere-se à região do solo sob a influência direta das raízes. Estas modificam física e quimicamente o entorno do solo por meio de trocas gasosas, mudanças na concentração de nutrientes, produção de metabolitos secundários, alteração do pH, entre outros fatores (DAL FERRO *et al.*, 2014; MCGAHAN *et al.*, 2014). Na rizosfera, as comunidades microbianas obtêm a energia necessária para o crescimento a partir dos exsudatos radiculares e da mineralização da matéria orgânica, com consequente liberação de nutrientes (MORGAN & WHIPPS, 2001; SHARMA *et al.*, 2004). O carbono e os nutrientes liberados estimulam o crescimento da microbiota, cuja população pode atingir valores na ordem de 10⁹ a 10¹² células por grama de solo (PINTON *et al.*, 2001).

Dentre as populações rizosféricas, encontram-se microrganismos saprófitos e simbiontes (WHIPPS, 2001; RICHARDSON *et al.*, 2009). Esses grupos exercem influência benéfica sobre as plantas de diversas maneiras, incluindo a secreção de compostos inibitórios ao crescimento de patógenos e pela competição com esses por nutrientes (WHIPPS, 2001).

A capacidade dos fungos de se desenvolver no solo está relacionada à produção e alongação das hifas, as quais procuram nutrientes e água nas diferentes topografias dos substratos, passando por ranhuras e sulcos (HOFFLAND *et al.*, 2004). Além disso, as hifas contribuem para a dissolução de minerais por meio dos processos biomecânicos e bioquímicos (BURFORD *et al.*, 2003). O processo biomecânico é dividido entre direto e indireto. O direto ocorre através da penetração das hifas no substrato, ao passo que o processo biomecânico indireto é resultado da ação de substâncias mucilaginosas como glomalinas, produzidas por fungos visando à formação de biofilmes e adesão ao substrato (LIAN *et al.*, 2008).

Uma vez que as populações fúngicas encontram-se instaladas no solo, contribuem na decomposição de resíduos vegetais, ciclagem de elementos vitais, transporte de nutrientes, formação de agregados, supressão de doenças associadas às plantas e sequestro de carbono (DEGENS *et al.*, 1996; KOWALCHUK, 1999; HE *et al.*, 2005; OROS-SICHLER *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2006; SHANKAR *et al.*, 2011; MAGER & THOMAS, 2011; MAPELLI *et al.*, 2012). Estes quando associados a plantas podem estabelecer relações simbióticas, endofíticas, saprófitas ou patogênicas (AGUILAR-TRIGUEROS *et al.*, 2014).

Fungos promotores do crescimento vegetal

Os fungos promotores do crescimento vegetal são organismos saprófitas, não patogênicos, que exercem ações de antagonismo contra patógenos por meio da competição por nutrientes e produção de antibióticos (SHIVANNA *et al.*, 1996; WHIPPS, 2001; VESSEY, 2003), solubilização de fosfato (MITTAL *et al.*, 2008), bioabsorção e bioacumulação de elementos tóxicos (DENG *et al.*, 2011), e produção de fitormônios (MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2011). Todos eles alojam-se na superfície da raiz ou nos espaços intercelulares da epiderme e do córtex radicular das plantas (ANDREWS & HARRIS, 2000).

Embora não estejam totalmente elucidados os mecanismos utilizados pelos fungos promotores do crescimento vegetal, foram detectados alguns mecanismos diretos responsáveis pela produção e transporte de fitormônios e reguladores de crescimento, tais como auxinas, giberelinas, e outros mecanismos indiretos, que induzem a resistência sistêmica da planta ou aliviam o estresse oxidativo (SINGH *et al.*, 2013).

Os fitormônios são moléculas sinalizadoras que atuam como mensageiras químicas, controlando o crescimento e desenvolvimento das plantas. São também os principais agentes reguladores da expressão genética intrínseca dos vegetais (BACA & ELMERICH, 2007).

Auxinas

O ácido indol-3-acético (AIA) foi purificado pela primeira vez em 1935 do fungo *Rhizopus suinus* (BACA & ELMERICH, 2007) e relatado ocorrendo conjuntamente com outros compostos como o ácido indol-3-butírico (AIB), ou formas conjugadas do ácido indol-acético. Sabe-se que o AIA promove o desenvolvimento dos tecidos radiculares, promovendo a rizogênese. As raízes produzidas atraem microrganismos pela exsudação de triptofano, principalmente quando estão sob estresse abiótico induzido pela presença de metais pesados (TANIMOTO, 2005; KAMILOVA *et al.*, 2006; GRAVEL *et al.*, 2007;

FASSLER *et al.*, 2010). O triptofano é considerado o principal precursor da síntese de AIA em plantas e fungos. Nas plantas, o triptófano é convertido em triptamina nas vias alternativas para a biossíntese de indol-3-acetaldeído, precursor do AIA (TSAVKELOVA *et al.*, 2012). No caso dos fungos, a fonte de triptofano é geralmente externa, pois a maioria deles não apresenta a capacidade de sintetizar esse aminoácido (ROBINSON *et al.*, 1998). No entanto, foi documentado em culturas puras de *Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *aeschyromene*, a presença de genes que codificam a indol-3-acetaldeído desidrogenase, responsável pela síntese de auxina (ROBINSON *et al.*, 1998).

A presença de microrganismos produtores do AIA nas raízes alteram o perfil hormonal da planta, aumentando a biomassa tanto do sistema radicular quanto da parte aérea (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2009). A presença de auxina induz a extrusão de prótons com a consequente acidificação do apoplasto e enfraquecimento da parede celular (KIM *et al.*, 2001), levando à expansão das células radiculares. Embora diferentes fungos produzam AIA, o efeito na promoção de crescimento vegetal só é exercido na rizosfera (TOUMI *et al.*, 1993).

Giberelinas

As giberelinas (GA) foram descritas por Kurosawa (1926) nos estudos da doença gerada pelo fungo *Gibberella fujikuroi*. Esses compostos correspondem a diterpenoides e compartilham estrutura tetracíclica denominada *ent*-giberelano. Possuem 19 ou 20 átomos de carbono, sendo mais bioativas as de 19 (BOMKE & TUDZYNSKI, 2009). Já foram descritas mais de 136 tipos de giberelinas produzidas por bactérias, plantas e fungos, sendo GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇ as de maior atividade biológica (BOMKE & TUDZYNSKI, 2009; HASAN, 2005). Os fungos sintetizam as GAs a partir do acetil-CoA, via ácido mevalônico (MVA) e da unidade isoprenoide isopentil difosfato (IPP) (BOMKE & TUDZYNSKI, 2009).

As GA estimulam a alongação celular, a germinação de sementes, a determinação do sexo da planta, o florescimento, a formação de frutos e a senescência do vegetal (BOMKE e TUDZYNSKI, 2009), além de auxiliarem na proteção de danos osmóticos na membrana plasmática (HASAN, 2005).

Por exemplo, *Aspergillus fumigatus* sp. LH02, quando crescido em condições de laboratório, apresentou produção média de GA₄ (24,8 ng/mL) GA₉ (1,2 ng/mL) e GA₁₂ (9,8 ng/mL). Uma vez conhecida sua capacidade de produção do fitormônio, este foi inoculado no sistema radicular de plantas de soja, crescida em concentrações salinas entre 70 e 140 mM. Sob essas condições, o microrganismo promoveu aumentos no comprimento, altura matéria seca, área folhar e conteúdo de clorofila e diminuiu as concentrações do ácido

abscísico (ABA) na planta, sendo ferramenta biotecnológica potencial para uso em culturas sob estresse salino (KHAN *et al.*, 2011).

Citocininas

As citocininas foram descobertas em 1955 por Skoog. Inicialmente a substância foi denominada cinetina, apresentando atividade de promoção da mitose de tecidos de tabaco *in vitro* (MOORE, 1979). Esses fitormônios são reguladores do crescimento das plantas, possuindo papel importante na divisão e diferenciação celular. Estimulam a iniciação do broto, formação de gemas, crescimento de gemas laterais, expansão foliar e síntese de clorofila. Além disso, aumentam a resistência à salinidade e baixas temperaturas (TASSI *et al.*, 2008).

Sideróforos

Na natureza, o ferro (Fe^{3+}) apresenta baixa solubilidade, constituindo fator limitante ao desenvolvimento vegetal (YU *et al.*, 2011). Bactérias e fungos desenvolveram adaptação ecológica para contornar essa limitação pela síntese de moléculas de baixo peso molecular, denominadas sideróforos, que são capazes de complexar o Fe^{3+} , formando complexos facilmente absorvíveis pela célula produtora do sideróforo (BAAKZA *et al.*, 2004).

Os sideróforos apresentam diferentes naturezas químicas dependendo do organismo que o produz. Os do tipo hidroxamato são sintetizados pela grande maioria de fungos; já os carboxilatos, são produzidos pelos zigomicetos; e os catecolatos, sintetizados por bactérias (BAAKZA *et al.*, 2004; JOHNSON, 2008). Os hidroxamatos são moléculas derivadas da ornitina, responsáveis pela ligação do ferro (JOHNSON, 2008).

Em fungos, os hidroxamatos podem ser compostos por fusarinas, coprogens e ferricromos. As fusarinas estão compostas por dois ou três subunidades de *cis*-fusarinas, os coprogens contêm subunidades de *trans*-fusarinas, as quais são lineares e podem formar dihidroximatos ou trihidroximatos, e os ferricromos que são moléculas de hexapeptídeos cíclicos (HOLINSWORTH & MARTIN, 2009).

Os sideróforos sintetizados pelos fungos absorvem o ferro de quatro formas diferentes. A primeira é pelo mecanismo de simporte, onde o complexo sideróforo-Fe (III) é transportado através da membrana citoplasmática por proteínas específicas. Uma vez introduzido na célula, o ferro é removido do complexo e reduzido para ser armazenado no interior celular (HOLINSWORTH & MARTIN, 2009). O segundo mecanismo de absorção do ferro é por meio das proteínas carregadoras ou de transporte que transferem o ferro (III) ao interior celular. O terceiro mecanismo é por meio da redução e degradação do sideróforo catalisada pelas enzimas esterases. Uma vez degradada a molécula, enzimas específicas

removem o Fe^{+3} que é, então, transportado para o interior da célula. Por último, o Fe^{+3} é reduzido a Fe^{+2} na membrana por redutases, sendo, em seguida, transportado para o interior da célula (HOLINSWORTH & MARTIN, 2009).

Na literatura foram descritos 20 isolados fúngicos de ambientes marinhos e terrestres com resposta positiva para a produção de sideróforos do tipo hidroxamato e carboxilatos, observando-se que os isolados terrestres produzem maior quantidade de sideróforos em relação aos marinhos (BAAKZA *et al.*, 2004). No solo, o complexo sideróforo-Fe (III) pode ser diretamente absorvido pela planta através da via de redução de Fe^{3+} (YEHUDA *et al.*, 1996), ou imobilizado no solo (YU *et al.*, 2011).

Disponibilização de nutrientes

Muitos microrganismos promotores de crescimento vegetal atuam aumentando a disponibilidade de nutrientes na rizosfera (VESSEI, 2003). Quando há escassez de nutrientes nesse local, ocorre aumento na mineralização da matéria orgânica do solo, liberando os nutrientes dos compostos recalcitrantes. Em condições de abundância, ocorre a imobilização de nutrientes, pela formação de biomassa, diminuindo a disponibilidade de nutrientes para as plantas (FONTAINE *et al.*, 2011).

Um dos mecanismos de aumento da disponibilidade de nutrientes pela microbiota do solo corresponde às reações de solubilização. Dentre os nutrientes mais importantes neste processo, encontra-se o P.

Na maioria dos solos brasileiros, o fósforo constitui fator limitante para a produção agrícola, devido à formação de fosfatos de baixa solubilidade no solo (FROSSARD *et al.*, 2014). Os produtos iniciais da reação de fosfato com partículas de solo são principalmente fosfato mono-hidrogênio de cálcio di-hidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato mono-hidrogênio de cálcio (CaHPO_4), fosfato férrico coloidal e fosfato de alumínio coloidal (LINDSAY, 1962). A solubilização de fosfatos metálicos por fungos promotores de crescimento vegetal é importante já que torna fosfatos disponíveis para as plantas e outros microrganismos. Os dois principais mecanismos empregados pelos fungos são a acidólise, oriunda da excreção de prótons H^+ acidificando o meio e a liberação de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico (JACOBS *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2014).

Pelo exposto acima, conclui-se que o emprego de microrganismos promotores de crescimento na revegetação de áreas mineradas ou nos locais de deposição dos rejeitos da atividade de mineração tem grande potencial de aplicação no Brasil. A associação desses microrganismos com as espécies de plantas utilizadas na revegetação pode facilitar o restabelecimento da base de produção primária, fundamental para o funcionamento dos ecossistemas. Por meio dos mecanismos de promoção de crescimento, os microrganismos

rizosféricos podem, além de aumentar a disponibilidade de nutrientes essenciais às plantas, mitigar os efeitos negativos das condições do meio sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal.

No Brasil, pesquisas sobre o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal, e em especial de fungos, são escassos, a despeito da grande diversidade biológica existente no País. Dessa forma, trabalhos de prospecção de microrganismos com potencial de aplicação na solução de diversos problemas ambientais são de grande valor.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR-TRIGUEROS, C.; POWEL, J.; ANDERSON, I.; ANTONOVICS, J.; RILLING, M. Ecological understanding of root-infecting fungi using trait-based approaches. *CellPress*, 2014, doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.006.
- ALBUQUERQUE, M.; RODRIGUES, T.; MENDOSA, E. Absorção de água por sementes de *Crotalaria spectabilis* Roth determinada em diferentes temperaturas e disponibilidade hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, **22 (1)**: 206-215, 2000.
- ANDREWS, J.; HARRIS, R. The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, **38**:145-180, 2000.
- ARETS, E.; VAN DER MEER, P.; VAN DEN BRINK, N.; TJON, K.; ATMOPAWIRO, V.; OUBOTER, P. Assessment of the impacts of gold mining on soil and vegetation in Brownsberg Natural Park, Suriname. **Alterra-Rapport**, **1359**: 7-26, 2006.
- ASSIS, I. Adsorção e disponibilidade de arsênio em solos com diferentes composições mineralógicas. Tese (**Doutorado em solos e nutrição de plantas**). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2010.
- ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Priority list of hazardous substances. **Atlanta, Georgia, USA**, 2013.
- BAAKZA, A.; VALA, A.; DAVE, B.; DUBE, H. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, **311**: 1-9, 2004.
- BACA, B.; ELMERICH, C. Microbial production of plant hormones. In *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer Netherlands, pp. 113-143, 2007.
- BAREEN, F.; SHAFIQ, M.; JAMIL, S. Role of plant growth regulators and a saprobic fungus in enhancement of metal phytoextraction potential and stress alleviation in pearl millet. **Journal of Hazardous Materials**, **237-238**: 186-193, 2012.
- BASHAN, Y.; VIERHEILIG, H.; SALAZAR, B.; BASHAN, L. Primary colonization and breakdown of igneous rocks by endemic, succulent elephant trees (*Pachycormus discolor*) of the desert in Baja California, Mexico. **Naturwissenschaften**, **93**: 344-347, 2006.
- BATISTA, B.; NIGAR, M.; MESTROT, A.; ROCHA, B.; JÚNIOR, F.; PRICE, A.; RAAB, A.; FELDMANN, J. Identification and quantification of phytochelatins in roots of rice to long-term exposure: evidence of individual role on arsenic accumulation and translocation. **Journal of Experimental Botany Advance**, 2014, doi: 10.1093/jxb/eru018.
- BISSEN, M.; FRIMMEL, F. Speciation of As (III), As (V), MMA and DMA in contaminated soil extracts by HPLC-ICP/MS. **Fresenius Journal Annal Chemical**, **367**: 51-55, 2000.
- BOMKE, C.; TUDZYNSKI, B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plant and bacteria. **Phytochemistry**, **70**: 1876-1893, 2009.

- IBRAM. Instituto Brasileiro de Mineração. *Informações e análises da economia mineral Brasileira*. Disponível em: <<http://www.ibram.org.br/>>. Acesso em: 13 de Setembro, 2013.
- BURFORD, E.; KIERANS, M.; GADD, G. Geomycology: fungi in mineral substrata. **Mycologist**, **17**: 98-107, 2003.
- CARBONELL, A.; BURLÓ, F.; MATAIX, J. Arsénico en el sistema suelo-planta. ed. **Universidad de Alicante**. España. Espagráfic, pp.139, 1995.
- CASTILHO, D.; ORIVALDO, A.; GONÇÁLVES, R.; ROBERTO, J.; HIROSHI, F.; FERREIRA, R. Épocas de semeadura de *Crotalaria* em consórcio com milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, **11 (2)**: 156-168, 2012.
- CHOI, B.; OHE, M.; HARADA, J.; DAIMON, H. Role of belowground parts of green manure legumes, *Crotalaria spectabilis* and *Sesbania rostrata*, in N uptake by succeeding tendergreen mustard plant. **Plant Production Science**, **11**: 116-123, 2008.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, **149**: 1579-1592, 2009.
- DAL FERRO, N.; SARTORI, L.; SIMONETTI, G.; BERTI, A.; MORARI, F. Soil macro- and microstructure as affected by different tillage systems and their effects on maize root growth. **Soil & Tillage Research**, **140**: 55-65, 2014.
- MENDES, G.; FREITAS, A.; PEREIRA, O.; DA SILVA, I.; VASSILEV, N.; COSTA, M. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, **64**: 239-249, 2014.
- DEGENS, B.; SPARLING, G.; ABBOTT, L. Increasing the length of hyphae in a sandy soil increases the amount of water-stable aggregates. **Applied Soil Ecology**, **3**: 149-159, 1996.
- DENG, Z.; CAO, L.; HUANG, H.; JIANG, X.; WANG, W.; SHI, Y.; ZHANG, R. Characterization of Cd- and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapeseed (*Brassica chinensis*) in a metal-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, **185**: 717-724, 2011.
- EWEL, J. Litter fall and leaf decomposition in a tropical forest succession in eastern Guatemala. **Journal of Ecology**, **64**: 293-308, 1976.
- FASSLER, E.; EVANGELOU, M.; ROBINSON, B.; SCHULIN, R. Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS). **Chemosphere**, **80**: 901-907, 2010.
- FELIPE, R.; OLIVEIRA, J.; LEÃO, G. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: Absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Arvore** **33 (2)**: 245-254, 2009.
- FONTAINE, S.; HENAULT, C.; AAMOR, A.; BDIQUI, N.; BLOOR, J.; MAIRE, V.; MARY, B.; REVAILLLOT, S.; MARON, P. Fungi mediate long term sequestration of carbon and

- nitrogen in soil through their priming effect. **Soil Biology and Biochemistry**, **43**: 86-96, 2011.
- FROSSARD, E.; DEMARIA, P.; SINAJ, S.; SCHARER, M. A flow-through reactor to assess potential phosphate release from agricultural soils. **Geoderma**, **219-220**: 125-135, 2014.
- GAMALERO, E.; BERTA, G.; GLICK, B. The use of Microorganisms to Facilitate the Growth of Plants in Saline Soils. **Microbial Strategies for Crop Improvement**, pp. 1-22, 2009.
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviridae*: Possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry** **39**: 1968-1977, 2007.
- HASAN, H. Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. **Acta Microbiologica e Immunologica Hungarica**, **49**: 105-118, 2005.
- HE, J.; XU, Z.; HUGHES, J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letters**, **247**:91-100, 2005.
- HOFFLAND, E.; KUYPER, T.; WALLANDER, H.; OTHER AUTORS. The role of fungi in weathering. **Frontiers in Ecology and Environment**, **2**: 258-264, 2004.
- HOLINSWORTH, B.; MARTIN, J. Siderophore production by marine-derived fungi. **Biometals**, **22**: 625-632, 2009.
- JACOBS, H.; BOSWELL, G.; HARPER, F.; RITZ, A.; DAVIDSON, F.; GADD, G. Solubilization of metal phosphates by *Rizoctonia solani*. **Mycological Research**, **106**: 1468-1479, 2002
- JOHNSON, L. Iron and siderophores in fungal-host interactions. **Mycological Research**, **112**: 170-183, 2008.
- KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.; SHAPOSHNIKOV, A.; AZAROVA, T.; MAKAROVA, N.; LUGTEMBERG, B. Organic acids, sugars, and 1-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **19**: 250-256, 2006.
- KAPPES, C.; ARF, O.; SÁ, M.; FERREIRA, J.; PORTUGAL, J.; ALCALDE, A.; VILELA, R. Reguladores de crescimento e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes e crescimento de plântulas de *Crotalaria*. **Bioscience Journal**, **28 (2)**: 180-190, 2012.
- KHAN, A.; HAMAYUN, M.; KIM, Y.; KANG, S.; LEE, J.; LEE, I. Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. **Process Biochemistry**, **46**: 440-447, 2011.
- KIM, Y.; MIN, J.; KIM, D.; JUNG, J. A soluble auxin-binding protein, ABP57. **Journal of Biology and Biochemistry**, **276**: 10730-10736, 2001.

- KOWALCHUK, G. New perspectives towards analysing fungal communities in terrestrial environments. **Current Opinion in Biotechnology**, **10**: 247-251, 1999.
- KUROSAWA, E. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the 'bakane' fungus. **Nature. History. Society. Formosa**, **16**: 213-227, 1926.
- KYLE, J.; BREUER, P.; BUNNEY, K.; PLEYSIER, R. Review of trace toxic elements (Pb, Cd, Hg, As, Sb, Bi, Se, Te) and their deportment in gold processing Part II: Deportment in gold ore processing by cyanidation. **Hydrometallurgy**, **111-112**: 10-21, 2012.
- LADEIRA, A.; CIMINELLI, V. Movility of As (III) and As (V) in soils. In: **Courtney Young** (ed) Minor elements: processing and enviromental aspects of As, Sb, Se, Te and Bi. Proc Conf Minor elements, Littleton Society for Mining, Metallurgy and Exploration, Littleton, pp. 191-198, 2000.
- LEPP, N. Effect of heavy metals pollution on plants. **Applied Science Publishers**, vol. 1. London and New Yersey, 1981.
- LEUNG, H.; LEUNG, A.; YE, Z.; CHEUNG, K.; YUNG, K. Mixed arbuscular mycorrhizal (AM) fungal application to improve growth and arsenic accumulation of *Pteris vittata* (As hyperaccumulator) growth in As-contaminated soil. **Chemosphere**, **92**: 1367-1374, 2013.
- LIAN, B.; CHEN, Y.; ZHU, L.; YANG, R. Effect of Microbial Weathering on Carbonate Rocks. **Earth Science Frontiers** **15**: 90-99, 2008.
- LIU, X.; WANG, E.; CHEN, X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. **Archives of Microbiology**, **188**: 1-14, 2007.
- LINDSAY, W.; FLAZIER, A.; STEPHENSON, F. Identification of Reaction Products from Phosphate Fertilizers in Soil. **Soil science Society of America Journal**, **26**: 446-452, 1962.
- MAGER, D.; THOMAS, A. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crust: a review of their role in dryland soil processes. **Journal Arid Environmental**, **75**: 91-97, 2011.
- MAPELLI, F.; MARASCO, R.; BALLOI, A.; ROLLI, E.; CAPPITELLI, F.; DAFFONCHIO, D.; BORIN, S. Mineral-microbe interactions: Biotechnological potential of bioweathering. **Journal of Biotechnology**, **157**: 473-481, 2012.
- MARIANNE, J.; VAN WYK, B. The systematic value of flower structure in *Crotalaria* and related genera of the tribe Crotalarieae (Fabaceae). **Flora**, **207**: 414-426, 2012.
- MARTÍNES-MEDINA, A.; ROLDÁN, A.; ALBACETE, A.; PASCUAL, J. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. **Phytochemistry**, **72**: 223-229, 2011.
- MCGAHAN, D.; SOUTHARD, R.; ZASOSKI, R. Rhizosphere effects on soil solution composition and mineral stability. **Geoderma**, **226-227**: 340-347, 2014.
- MEE, G.; KIEBER, J. ACC as a signaling Molecule in Plants. **AoB Plants Advance Access**. pp.1-14, 2013.

- MEHARG, A.; MACNAIR, M. An alterate phosphate up-take system in arsenate tolerant *Holcus lanatus* L. **New Phytology**, **116**: 29-35, 1990.
- MELO, R., DIAS, L.; VARGAS, J.; ALVES, J. Pontencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, **33**: 455-465, 2009.
- MENDES, G.; VALADÃO, D.; RODRIGUES, R.; PAOLINELLI, F.; ALVES, E.; BARBOSA, J. Fitomassa de adubos verdes e cobertura do solo na região do Alto Vale do Jequitinhonha, Minas Gerais. **Revista Agroambiente on-line**, **6**: 110-116, 2012.
- MENDEZ, M., MAIER, R. Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments- An emerging remediation technology. **Environmental Health Perspectives**, **116(3)**: 278-283, 2008.
- MITTAL, V.; SINGH, O.; NAYYAR, H.; KAUR, J.; TEWARI, R.; Stimulatory effect on phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). **Soil Biology and Biotechnology**, **40**: 718-727, 2008.
- MOORE, T. Biochemistry and physiology of plants hormones. New York: Springer-Verlag, 1979.
- MORGAN, J.; WHIPPS, J. Methodological approaches to the study rhizosphere carbon flow and microbial population dynamics. **New York: Marcel Dekker**, 2001.
- NESSNER, V.; ESPOSITO, E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils pollutet with heavy metals. **Biotechnology Advances**, **28**: 61-69, 2010.
- OHSWSKI, B.; KLIRONOMOS, J.; DUNFIELD, K.; HART, M. The potential of soil amendments for restoring severely disturbed grasslands. **Applied Soil Ecology**, **60**:77-83. 2012.
- OROS-SICHLER, M.; GOMES, N.; NEUBER, G.; SMALLA, K. A new seminested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, **65**: 63-75, 2006.
- PETERSON, G.; HEEMSKERK, M. Deforestation and forest regeneration following small-scale gold mining in the Amazon: The case of suriname. **Environnemental Conservation**, **28 (2)**: 117-126, 2005.
- PINTON, R.; Z, V.; NANNIPIERI, P. The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. 1st edn. New York: CRC Press, 2001.
- PRISCO, J.; GOMES, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. INCTSal (Org.). Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Fortaleza, CE. pp. 148-164, 2010.
- RICHARDSON, A.; BAREA, J.-M.; MCNEILL, A.; PRIGENT-COMBARET. C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, **321**: 305-339, 2009.

- ROBINSON, M.; RIOV, J.; SHARON, A. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Apply Environmental Microbiology**, **64**: 5030-5032, 1998.
- RODRIGUES, R.; MARTINS, S.; BARROS, L. Tropical rain forest regeneration in an area degraded by mining in MatoGrosso state, Brazil. **Forest Ecology and Management**, **190**: 323-333, 2004.
- ROSOLEM, C.; FOLONI, J.; TIRITAN, C. Root growth and nutrient accumulation in cover crops as affected by soil compaction. **Soil & Tillage Research**, **65**: 109-115, 2002.
- SCHIMANN, H.; PETIT-JEANB, C.; GUITETC, S.; REISD, T.; DOMENACHE, A.; ROGGYA, J. Microbial bioindicators of soil functioning after disturbance: The case of gold mining in tropical rainforests of French Guiana. **Ecological Indicators**, **20**: 34-41, 2012.
- SHANKAR, J.; CHANDRA, V.; SINGH, D. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, **140**: 339-353, 2011.
- SHARMA, S.; ANEJA, M.; MAYER, J.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. RNA fingerprinting of microbial community in the rhizosphere soil of grain legumes. **FEMS Microbiology Letters**, **240**:181-186, 2004.
- SHIVANNA, M.; MEERA, M.; HYAKUMACHI, M. Role of root colonization ability of plant growth promoting fungi in the suppression of take-all and common root rot of wheat. **Crop protection** **15**: 497-504, 1996.
- SINGH, A.; JAIN, A.; SARMA, B.; UPADHYAY, R.; SINGH, H. Rhizosphere microbes facilitate redox homeostasis in *Cicer arietinum* against biotic stress. **Annals of Applied Biology**, **163**: 33-46, 2013.
- SINGH, B.; MUNRO, S.; REID, E.; ORD, B.; POTTS, J.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soil by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science**, **57**: 72-82, 2006.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; de LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, **183**: 214-220, 2001.
- TANIMOTO, E. Regulation of root growth by plant hormones—roles for auxin and gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **24 (4)**: 249-265, 2005.
- TASSI, E.; POUGET, J.; PETRUZZELLI, G.; BARBAFIERI, M. The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals. **Chemosphere**, **71**: 66-73, 2008.
- TOUJAGUEZ, R.; ONO, B.; MARTINS, V.; CABRERA, P.; BLANCO, A.; BUNDSCHUH, J.; GUILHERME, L. Arsenic bioaccessibility in gold mine tailings of Delita, Cuba. **Journal of Hazardous Materials**. In press, 2013.
- TOUMI, T.; ILVESOKSA, J.; LAAKSO, S.; ROSENQVIST, H. Interaction of abscisic acid and indole-3-acetic acid-producing fungi with *Salix* leaves. **Journal of plant Growth regulation**, **12**: 149-156, 1993.

- TSAVKELOVA, E.; OESER, B.; OREN-YOUNG, L.; ISRAELI, M.; SASSON, Y.; TUDZYNSKI, B.; SHARON, A. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, **49**: 48-57, 2012.
- VAN LOON, L.; GLICK, B. Increased plant fitness by rhizobacteria. **Molecular Ecotoxicology of Plants**. pp. 177-205, 2004.
- VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. **Plant and Soil**, **255**: 571-586, 2003.
- WAUCHOPE, R. Fixation of arsenical herbicides, phosphate, and arsenate in alluvial soils. **Journal of Environmental Quality**, **4**: 355-358, 1975.
- WESTON, R. Gold (Routledge Revivals): A world Survey. Routledge, 2012.
- WHIPPS, J. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, **52**: 487-511, 2001.
- WHITE, P.; BROADLEY, M. Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: A review. **Annals of Botany**, **88**: 967-988, 2001.
- WILSON, S.; LOCKWOOD, P.; ASHLEY, P.; TIGHE, M. The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review. **Environmental Pollution**, **158**: 1169-1181, 2010.
- YEHUDA, Z.; SHENKER, M.; ROMHELD, V.; MARSCHNER, H.; HADAR, Y.; CHEN, Y. The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. **Plant physiology**, **112**: 1273-1280, 1996.
- YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, **47**: 138-145, 2011.
- ZHANG, H.; SELIM, H. Reaction and transport of Arsenic in soils: Equilibrium and Kinetic Modeling. Chapter two. **Advances in Agronomy**, **98**: 45-115, 2008.

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Crotalaria spectabilis* EM REJEITO
DA MINERAÇÃO DE OURO POR FUNGOS RIZOSFÉRICOS**

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Crotalaria spectabilis* EM REJEITO DA MINERAÇÃO DE OURO POR FUNGOS RIZOSFÉRICOS⁽¹⁾

Sergio Alberto Diaz Gallo⁽²⁾, Igor Rodrigues de Assis⁽³⁾, Olinto Liparini Pereira⁽⁴⁾, Luiz Eduardo Dias⁽⁵⁾, Christiane Augusta Diniz⁽⁶⁾, Maurício Dutra Costa⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro Autor apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, da Universidade Federal de Viçosa, UFV.

⁽²⁾ Mestre em Microbiologia Agrícola, UFV.

⁽³⁻⁵⁾ Departamento de Solos, UFV, Viçosa, MG.

⁽⁴⁾ Departamento de Fitopatologia, UFV, Viçosa, MG.

⁽⁶⁾ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Departamento de Fitotecnia, UFV, Viçosa, MG.

⁽⁷⁾ Departamento de Microbiologia, Campus Universitário, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-900, Viçosa, MG.

RESUMO

A presença de arsênio (As) e a elevada salinidade de alguns rejeitos oriundos do processo de mineração de ouro dificultam as ações de revegetação dos locais de deposição desses materiais. Assim, os objetivos deste trabalho foram isolar e caracterizar fungos rizosféricos que contribuam para o crescimento de *Crotalaria spectabilis* Roth. em condições de elevada salinidade e disponibilidade de As, comuns nos rejeitos da mineração do ouro. Os isolados foram obtidos a partir da rizosfera de gramíneas cultivadas em bacias com diferentes tipos de rejeitos denominados 'rejeito B1' 'rejeito B2' e 'Blend', no Município de Paracatu, MG. O rejeito B1 corresponde a um substrato mais intemperizado, com menor teor de sulfetos; o rejeito B2 é substrato pouco intemperizado, com maior teor de sulfetos; e o Blend é oriundo do processamento dos dois substratos juntos. Foram obtidos 227 isolados fúngicos a partir da rizosfera de plantas cultivadas nesses substratos, dos quais 57 foram selecionados segundo características morfológicas distintas. Em um primeiro experimento, quando inoculados no sistema radicular de *C. spectabilis*, cultivada em mistura de solo e areia, 7:3 (v/v), os isolados 8, 27, 31, 33, 44, 45, 49, 50, 54 e 57 promoveram incrementos de até 65,8 % da matéria seca total das plantas em comparação ao controle, sem inoculação. Esses dez isolados fúngicos expressaram mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, tais como a produção de ácido indol-3-acético (AIA) e de giberelinas (GAs) e a solubilização de fosfatos. A produção máxima de AIA foi de 23 mg L⁻¹, obtida pelo isolado 27. O isolado 44 teve produção de 45,4 mg L⁻¹ de GAs. A fonte de fosfato inorgânico mais solubilizada foi o fosfato de cálcio, com valores entre 47 e 655 mg L⁻¹ de P solubilizado. Em um segundo experimento, foi testada a capacidade de promoção de

crescimento de *C. spectabilis* dos isolados inoculados no sistema radicular da planta cultivada em solo (Latossolo) e nos rejeitos B1, B2, Blend e Mix (mistura de areia com B2 na proporção 8:2, v/v). Os dez isolados fúngico selecionados promoveram diferenças significativas na produção de matéria seca das plantas, a depender do substrato utilizado para o cultivo. No Latossolo, o isolado 57 teve o melhor desempenho. No rejeito B1 e B2, os isolados 31, 33 e 49 proporcionaram maior aumento da produção de matéria seca total. No substrato Blend, os melhores isolados foram o 27, 44 e 57. Já no substrato denominado Mix, os isolados que demonstraram maior capacidade de promoção do crescimento de *C. spectabilis* foram o 33, 49 e 57. Esses resultados indicam a necessidade de seleção prévia dos microrganismos com maior potencial para um dado local ou substrato. O uso de fungos promotores de crescimento de planta é uma estratégia promissora para a revegetação de áreas de deposição dos rejeitos da mineração do ouro.

ABSTRACT

The presence of arsenic (As) and the high salinity of gold mine tailings make it difficult to reclaim mined sites and tailing deposits. Thus, the objective of this work was to isolate and characterize rhizospheric fungi capable of promoting *Crotalaria spectabilis* Roth. growth under high salinity and As availability prevalent in the gold mine tailings. The fungal isolates were obtained from the rhizosphere of plants grown in different tailings, namely B1, B2, and Blend, at Paracatu, MG, Brazil. The B1 tailing corresponds to a weathered substrate, with low sulfite content; the B2 tailing is a less weathered substrate than B1 and contains high sulfite levels; the Blend results from the processing of B1 and B2 simultaneously. A total of 227 fungal isolates were obtained, from which 57 were selected based on distinct morphological traits. In a first experiment, when the selected isolates were inoculated onto the roots of *C. spectabilis*, grown in a soil:sand mixture, 7:3 (v/v), the isolates 8, 27, 31, 33, 44, 45, 49, 50, 54, and 57 promoted increases in total dry matter of up to 65.8% in comparison to the control, without inoculation. These isolates were also capable of expressing plant growth promoting mechanisms *in vitro*, such as indol-3-acetic acid (IAA) and gibberellin (GAs) production and phosphate solubilization activity. The maximum production of IAA was 23 mg L⁻¹ by the isolate 27. The isolate 44 produced 45.4 mg L⁻¹ of GAs. The solubilization of calcium phosphate varied from 47 to 655 mg L⁻¹ soluble P. In a second experiment, the inoculation of *C. spectabilis* roots, grown in a soil substrate (Oxysol), B1, B2, Blend or Mix (sand and B2 at 8:2, v/v), with the ten selected isolates promoted significant differences in total dry matter production that varied according to the substrate used for plant growth. In the Oxysol, isolate 57 had the best performance. In B1 and B2, the isolates 31, 33, and 49 promoted the highest increases in total dry matter. In the Blend substrate, the best isolates were 27, 44, and 57. In the Mix, the isolates that showed the highest growth promoting capacity were 33, 49, and 57. Our results indicate the need to previously select the adequate microorganisms with the highest potential of use for a given location or substrate. The use of plant growth promoting fungi is a promising strategy for the reclamation mined sites and tailing deposits.

INTRODUÇÃO

O ouro, Au, é elemento químico de número atômico 79, pertencente ao grupo dos metais de transição da tabela periódica. É considerado um dos metais preciosos mais importantes, sendo usado pelo homem como padrão monetário internacional, na joalheria e nas indústrias eletrônica e civil. Por essa razão, a demanda pelo elemento no mundo é elevada, fomentando as atividades de mineração em vários países (WESTON, 2012; SILVA *et al.*, 2013). O Brasil ocupa o 13º lugar no *ranking* mundial de produção desse mineral, gerando divisas ao país da ordem de US\$ 2,2 bilhões por ano, com tendência de aumento desse montante a longo prazo (IBRAM, 2013)

Embora na atualidade tenham sido desenvolvidas diferentes técnicas para melhorar o processo de extração e purificação do metal, muitas perturbações ambientais ainda são causadas pela atividade de mineração do ouro, a exemplo da supressão da vegetação e a geração de resíduos tóxicos, contendo As e, ou Hg, que levam à perda das propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo. Tais perturbações afetam negativamente as plantas, os animais silvestres e os microrganismos presentes na área explorada, levando ao comprometimento da capacidade de resiliência do ambiente e, por consequência, da capacidade de ciclagem biogeoquímica (KYLE *et al.*, 2012; MAPELLI *et al.*, 2012).

No caso das jazidas de ouro, a presença do As na forma de minerais primários (arsenopirita; orpimento; realgar) ou em formas iônicas (arsenatos e arsenitos) é comum. Por essa razão, para a autorização do licenciamento ambiental visando a extração do minério, o Brasil exige, por meio da legislação vigente, estudos de impacto ambiental e o relatório de impacto ambiental no qual, dentre outros documentos, deve conter a elaboração e execução de Plano de Recuperação de Área Degradada (PRAD), cujos objetivos podem ser a reabilitação, a recuperação, a regeneração, a restauração do solo ou mudanças no uso do mesmo após o processo de mineração (IBAMA, 2011).

A capacidade de recuperação de áreas degradada depende da disponibilidade de nutrientes e água para que os diferentes organismos possam se desenvolver, razão pela qual têm sido incluídos em alguns PRADs, a adição de resíduos orgânicos naturais ou a introdução de produtores primários de biomassa, representados majoritariamente pelas plantas (PATRICIO, 2009). Nesse contexto, a *Crotalaria spectabilis* Roth. é reconhecidamente tolerante ao As, podendo ser introduzida como pioneira em áreas contaminadas com esse elemento (FELIPE *et al.*, 2009; KAPPES *et al.*, 2011). Essa espécie apresenta ainda bom desenvolvimento radicular em solos compactados (ROSOLEM *et al.*, 2002).

Por outro lado, o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal tem sido preconizado com vistas à introdução de plantas pioneiras em áreas degradadas pela

atividade de mineração (MAGER & THOMAS, 2011; MAPELLI *et al.*, 2012). Esses microrganismos habitam a rizosfera da planta e promovem crescimento vegetal por meio de vários mecanismos, dentre os quais citam-se a fixação de N₂, a solubilização de fosfato, a produção da desaminase do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC desaminase), a produção de fitormônios e sideróforos e a supressão de patógenos (MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2013). Além desses mecanismos, os microrganismos promotores de crescimento vegetal beneficiam as plantas por meio da destoxificação de espécies reativas de oxigênio, comumente induzidas sob condições de estresse (BAREEN *et al.*, 2012). Esse benefício é obtido pela produção e secreção das enzimas catalase, peroxidase, superóxido-dismutase, glutatona-peroxidase e ascorbato-peroxidase pelo microrganismo (MEE & KIEBER, 2013).

Tendo em vista as múltiplas interações benéficas entre planta e microrganismos rizosféricos, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar fungos rizosféricos que contribuam para o desenvolvimento de *C. spectabilis* em condições de elevada salinidade e disponibilidade de As, visando à revegetação de áreas de deposição dos rejeitos da mineração de ouro.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Para isolamento fúngico, amostras de substrato foram coletadas a partir do sistema radicular de plantas gramináceas cultivadas nos rejeitos de mineração de ouro no Município de Paracatu, MG (17° 08' 23.7" S, 46° 52' 35.8" WO, a 661 m), Brasil, em fevereiro de 2013. As plantas existentes nesses substratos, em condições de viveiro, bem como o rejeito aderido às raízes, foram coletados, acondicionados em sacos plástico de polietileno e mantidos a 4 °C até a manipulação. No laboratório, as partículas finas do rejeito firmemente aderido às raízes foram coletadas após agitação mecânica das plantas, constituindo uma amostra composta denominada rejeito rizosférico.

Os substratos utilizados para o cultivo das plantas foram Latossolo, Latossolo:areia (7:3 v/v), rejeito B1 (substrato mais intemperizado, com menor teor de sulfetos), rejeito B2 (substrato pouco intemperizado, com maior teor de sulfetos), Blend (substrato oriundo do processamento de B1 e B2 juntos) e Mix (mistura de areia com B2 na proporção 8:2, v/v). Os substratos foram caracterizados química e fisicamente de acordo com as metodologias de análise de solo de RAIJ et al. (2001), DEFELIPO & RIBEIRO (1997) e EMBRAPA (2011) (Tabela 1).

Isolamento fúngico

Um grama do rejeito rizosférico foi diluído em 9 mL de solução salina (NaCl, 0,85%). Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas em meio Batata-Dextrose-Ágar, BDA, e Ágar Martin (glicose, 10 g; peptona, 5 g; KH₂PO₄, 1 g; MgSO₄.7H₂O, 0,5 g; rosa bengala, 0,03 g; ágar, 15 g; estreptomicina, 30 mg/L). As diferentes diluições foram plaqueadas cinco vezes em cada meio. As placas foram incubadas por sete dias a 25 °C. As colônias com morfologias distintas foram purificadas por repicagens sucessivas do micélio em BDA suplementado com estreptomicina a 30 mg/L (LACAP *et al.*, 2003). Foram descartados fungos do gênero *Trichoderma* e os reconhecidamente fitopatogênicos. As culturas puras obtidas foram mantidas em BDA a 25 °C.

Tabela 1. Caracterização físico-química dos substratos utilizados.

Amostra	pH	Caracterização química																
		As	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	CE	P-rem	m	Na	S	Cu	Mn	Fe	Zn
		-mg/dm ³		-----cmol _c /dm ³ -----						mS/cm	Mg/L	%						
B1	4,3	3,08	2,0	0,82	2,61	1,4	3,44	3,73	4,84	5,55	---	7,8	1,54	64,3	0,85	58,9	657,7	11,54
B2	6,3	1,41	88	2,12	1,16	0,6	3,51	3,51	4,11	4,05	---	0	0,73	41,8	0,92	59,1	1827	6,28
Mix	6,2	0,83	44	1,23	0,56	0,5	1,9	1,9	2,4	2,56	15,43	0	0,0	19,6	1,07	59,8	928,7	4,75
Blend	7,0	6,74	41	1,76	0,65	0,5	2,52	2,52	3,02	2,56	---	0	0,33	18,1	7,09	19,1	707,1	8,58
Latossolo	4,9	---	17	0,62	0,15	2,6	0,81	1,2	3,41	0,9	25,75	32,5	0,0	40,6	2,12	36,7	184,8	3,51
Latossolo 7:3	6,0	---	53	1,39	0,44	2,3	1,97	1,97	4,27	----	34,8	0,0	---	---	---	---	---	---

Substrato	Caracterização física						
	Equivalente umidade	Densidade de partículas	Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Classe textural
	----kg/kg----	-----kg/dm ³ -----		-----dag/kg-----			
B1	0,271	2,66	23	6	69	2	Franco-Siltosa
B2	0,069	2,80	27	54	18	1	Areia-Franca
MIX	0,034	2,82	59	25	11	6	Areia-Franca
BLEND	0,505	2,70	0	0	97	3	Silte
Latossolo	0,091	2,75	69	9	5	17	Franco-Arenosa
Latossolo 7:3	-----	-----	60	10	15	15	Franco-Arenosa

pH em água – Relação 1:2,5. P e K: extrator Mehlich 1. Ca, Mg: extrator KCl 1 mol/L. H+Al: extrator Acetato de cálcio 0,5 mol/L pH 7,0. SB: soma de bases. CTC(t): capacidade de troca catiônica efetiva. CTC(T): capacidade de troca catiônica a pH 7,0. V: índice de saturação de bases. m= Índice de saturação de alumínio. S:extrator fosfato monocálcico em ácido acético. Cu, Mn, Fe, Zn, Condutividade Elétrica (CE): extrator Mehlich 1. As extrator Mehlich 3.

Triagem de isolados promotores de crescimento de *C. spectabilis* em mistura solo: areia

Para a obtenção de plântulas, sementes de *C. spectabilis* foram desinfestadas superficialmente pela imersão em álcool a 70 %, por um minuto, seguido de enxágue com água destilada esterilizada e imersão em peróxido de hidrogênio a 65 %, por 6 minutos. Após o tratamento de desinfestação, as sementes foram enxaguadas com água destilada esterilizada por três vezes e semeadas em bandeja contendo mistura de solo e areia autoclavada na proporção de 7:3 (v/v).

Quinze dias após a semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos, contendo 390 g do mesmo substrato, e inoculadas no sistema radicular com três discos de ágar de 9 mm de diâmetro, contendo micélio dos isolados fúngicos crescidos em BDA por sete dias a 25 °C. Testaram-se o total de 57 isolados fúngico e um controle, sem inoculação, foi também incluído. As plantas foram cultivadas por 60 dias em casa de vegetação, sendo irrigadas diariamente com água destilada, conforme a necessidade. Cada vaso recebeu semanalmente 20 mL de solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) a ¼ da força. A altura da planta foi medida semanalmente, correspondendo à distância do coleto ao ápice do último ramo com folhas.

Após 60 dias, as plantas foram coletadas e a parte aérea e o sistema radicular separado. A matéria seca foi determinada após secagem em estufa a 70°C até peso constante. O material foi moído em moinho com malha de 2 mm e submetido à digestão nítrico-perclórica. Os teores de Ca, Mg e Fe foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica; o teor de K, por fotometria de chama; e o P pelo método da vitamina C (BRAGA & DEFELIPPO, 1974; SINGH *et al.*, 2009). A eficiência de utilização de nutrientes foi definida de acordo com a quantidade de biomassa produzida por unidade de nutrientes nos tecidos vegetais (ASRAR & ELHINDI, 2011).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias para as variáveis analisadas foram avaliadas segundo o teste de Scott-Knott a 5 % de significância. Efetuou-se análise de componentes principais para eficiência e conteúdo de macro- e micronutrientes presentes nas plantas segundo DUNTEMAN (1989) e KOSLOV & ENRIGHT (1985).

Avaliação da expressão de mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*.

Dez isolados fúngicos foram selecionados segundo o aumento da matéria seca pelo teste Scott-Knott a 5% de significância, para a avaliação dos diferentes mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Três discos de 9 mm do meio de cultura BDA, contendo micélio, foram inoculados em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL dos meios apropriados descritos abaixo. Os experimentos de produção de ácido indól-3-acético (AIA), giberelinas (GA), sideróforos e de solubilização de fosfato foram montados em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à ANOVA e testes de agrupamento (Scott-Knott) a 5% de probabilidade.

Produção de AIA: Os isolados foram inoculados em meio Czapek-Dox (NaNO_3 , 3,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; KCl, 0,5 g, FeSO_4 , 55 mg; KH_2PO_4 , 1,0 g; sacarose, 30 g) suplementado com triptofano a 5 mmol/L. Os frascos foram incubados a 28 °C e 180 rpm por sete dias, na ausência de luz (TSAVKELOVA *et al.*, 2012). Uma alíquota de 1 mL do meio de cultura foi retirada para quantificação do AIA. Após centrifugação por 7000 g por 15 min, a concentração de AIA no meio foi determinada pelo método colorimétrico de Salkowski (GORDON & WEBER, 1951), com modificações ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mol/L; HClO_4 a 35%; comprimento de onda de 540 nm).

Produção de GA: Os isolados foram inoculados em meio ICI (Glucose, 80 g; NH_4NO_3 , 2,4 g; KH_2PO_4 , 5,0 g; MgSO_4 , 1,0 g; elementos traço, 2 mL) e cultivados a 25 °C e 250 rpm, por sete dias (BORROW *et al.*, 1955). Os sobrenadantes das culturas foram coletados e centrifugados a 3360 g por cinco min. Os teores de GA foram determinados utilizando-se o reagente de Folling-Wu, segundo o método descrito por ATZHORM *et al.* (1988).

Produção de sideróforos: Os isolados foram inoculados em meio para *Ascomycota* descrito por Grimm e Allen (1954) (K_2SO_2 , 1,0 g; acetato de amônia, 3,0 g; K_2HPO_4 , 3,0 g; ácido cítrico, 1,0 g; sacarose, 20 g; tiamina, 2,0 mg; de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0005 mg; MnSO_4 , 0,035 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mg; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 80 mg; pH 6,8). Para a detecção química dos sideróforos tipo hidroxamato foi usada a técnica colorimétrica (NEILANDS, 1981) e o teste de sais de tetrazolium (SNOW, 1954). Os sideróforos de tipo catecolatos foram detectados pela técnica colorimétrica (ARNOW, 1937).

Solubilização de fontes inorgânicas de fosfatos: Os fungos foram inoculados em meio NBRIP líquido (NAUTIYAL, 1999), com adição de diferentes fontes inorgânicas de fósforo ($\text{Ca}_5\text{P}_3\text{HO}_{13}$, FePO_4 ou AlPO_4), em quantidades equivalentes a 5 g L⁻¹ de P. Os frascos

foram incubados a 25 °C e 250 rpm por sete dias. Ao final da incubação o P solúvel foi medido no sobrenadante das culturas pelo método colorimétrico descrito por JOHN (1970).

Promoção do crescimento de *C. spectabilis* em solo e rejeitos da mineração de ouro por fungos rizosféricos

Plântulas de *C. spectabilis*, obtidas como descrito anteriormente, foram transplantadas, aos 15 dias após a semeadura, para vasos plásticos contendo 1,0 kg de substrato, a saber Latossolo, B1, B2, Blend e Mix. No momento do transplante, as plântulas foram inoculadas com os isolados fúngicos selecionados de acordo com o descrito acima. Para cada tipo de substrato foram acrescentados controles com plantas não inoculadas. As plantas foram cultivadas por 60 dias em casa de vegetação, com aplicações semanais de 20 mL de solução nutritiva de Clark, ¼ da força, e irrigação diária com água destilada para manutenção do conteúdo de água próximo a capacidade de campo. A altura das plantas foi medida semanalmente, correspondendo à distância do coleto ao ápice do último ramo com folhas. Ao final do cultivo, as plantas foram coletadas e a parte aérea e o sistema radicular separados. A matéria seca foi determinada após secagem em estufa a 70°C até peso constante. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento dos fungos rizosféricos

Foram obtidos o total de 227 isolados fúngicos a partir do rejeito rizosférico. Na sua maioria, os isolados corresponderam a indivíduos do filo Ascomycota. Desse total, os microrganismos com características morfológicas semelhantes entre si ou que pertencessem ao gênero *Trichoderma* ou a táxons reconhecidamente fitopatogênicos, tais como *Fusarium*, e *Cladosporium*, ou saprófitas, como *Rhizopus*, foram descartados, restando, ao final, o total de 57 isolados.

A maioria dos morfotipos fúngicos isolados corresponderam aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, indicando baixa riqueza fúngica no substrato. Esse resultado pode ser comparado com os obtidos no bioma semiárido do nordeste do Brasil, onde as condições ambientais de salinidade e de matéria orgânica do solo são similares às condições adversas do rejeito (OLIVEIRA *et al.*, 2013), reduzindo a diversidade de plantas e diminuindo a presença da fauna, responsável, em parte, pela dispersão de fungos (KASEL *et al.*, 2008).

Da mesma forma, relata-se que em quatro solos diferentes, com relação C:N entre 0,4 e 5,0, os Ascomycota são capazes de se desenvolver, mesmo em condições de baixo teor de nutrientes, baixas concentrações de P extraível e baixa relação C:N (LAUBER *et al.*, 2008), sendo compatíveis com os isolados obtidos do rejeito da mineração do ouro.

A amostragem do rejeito rizosférico foi realizada em apenas uma época do ano. É possível que a diversidade fúngica possa sofrer variações sazonais, como relatado por GÓMEZ-CORNELIO *et al.* (2012) para os gêneros *Cladosporium*, *Monodictys* e *Fusarium*, que se desenvolveram no período de alta umidade e pouco sol. Da mesma forma, WOLLENZIEN *et al.*, (1995) relataram a ocorrência de *Alternaria*, *Aspergillus* e *Cladosporium* na época de chuvas, condições climáticas similares ao momento da coleta das amostras utilizadas no presente trabalho.

Como o escopo deste trabalho não foi o de fazer levantamento da diversidade fúngica do rejeito rizosférico ao longo do tempo, concluiu-se que as estratégias de amostragem e de isolamento adotadas permitiram a obtenção de um conjunto significativo de isolados para a prospecção da capacidade de promoção de crescimento de *C. spectabilis*.

Triagem de isolados promotores de crescimento de *C. spectabilis* em mistura solo: areia

A inoculação do sistema radicular de plantas de *C. spectabilis* com os 57 isolados provocou aumentos ou diminuições significativas na produção de matéria seca total, matéria seca da parte aérea, matéria seca das raízes, na altura das plantas e no comprimento das

raízes (Figura 1 e 2) (Tabela 2). Esses resultados indicam ampla variação na comunidade fúngica rizosférica em trazer benefícios para a planta hospedeira em condições de inoculação controlada, evidenciando a obrigatoriedade de se triar previamente os isolados de maior potencial de promoção de crescimento. Dentre os 57 isolados, 72 % estimularam o desenvolvimento das plântulas de *C. spectabilis*.

Os isolados fúngicos foram divididos em 4 grupos ($p < 0,05$) (Figura 1). O grupo I possui 15 isolados fúngicos com médias de matéria seca entre 1,33 a 1,89 g/planta. O grupo II possui 21 isolados, com médias entre 2,02 a 2,29 g/planta. O grupo III possui 13 fungos, com médias entre 2,39 a 2,75 g/planta. O grupo IV possui 8 isolados, com médias entre 2,85 a 3,31 g/planta. O controle teve como média 1,76 g/planta. Em média, o aumento da matéria seca das plantas inoculadas foi de 17 % para o grupo II, 36 % para o grupo III e 66 % para o grupo IV.

Em relação à altura e ao comprimento do sistema radicular, os isolados agruparam-se em 3 e 2 grupos ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 2). Para altura, o grupo I possui 5 isolados fúngicos com médias entre 14,3 e 16 cm/planta; o grupo II possui 21 fungos, com médias entre 17,5 a 19,6 cm/planta; o grupo III possui 30 isolados fúngicos com médias entre 19,7 a 25,1 cm/planta e o controle com média de 18,3 cm/planta. O grupo I apresentou valores abaixo da média do controle, uma vez que nessas condições, certos fungos rizosféricos, agora em ambiente biótico diferente do original, podem manter interações negativas com a planta, inclusive a de parasitismo. De fato, os fungos do solo podem apresentar comportamento biotrófico, necrotrófico, saprofítico ou de simbiose temporária, a depender das condições ambientais vigentes (AGUILAR-TRIGUEROS *et al.*, 2014). Alternativamente, alguns fungos que provocaram respostas negativas na produção de matéria seca, altura e comprimento do sistema radicular podem representar indivíduos fitopatogênicos que escaparam da triagem inicial realizada.

Considerando-se as médias de produção de matéria seca total, os isolados testados foram agrupados em quatro grupos, a saber, grupo I, com 8 isolados, grupo II, com 13, grupo III, com 20 e grupo IV, com 16 mais o tratamento controle, sem inoculação. Em média o grupo I promoveu aumento da matéria seca total de 65,8%, seguido pelo grupo II, com 35,9%, e pelo grupo III, com 16,4%.

Por outro lado, a inoculação do sistema radicular da *C. spectabilis* com os isolados fúngicos rizosféricos levou a diferentes comportamentos nutricionais da planta em relação ao conteúdo e ao uso de macro- e micronutrientes na parte aérea (Figuras 3 e 4). As reduções e aumentos no conteúdo variaram de -17,5 a 93,7 % para o N, de -49,0 a 82,9 % para o P, de -47,2 a 80,8 % para o K, de -39,6 a 127,9 % para o Ca, de -19,0 a 129,7 % para o Mg, de -51,9 a 91,1 % para o S, de -17,2 a 585,2 % para o Cu, de 0,4 a 714,6 % para o Fe, de -56,4 a 92,8 % para o Zn, de -20,9 a 219,6 % para o Mn, e de -75,5 a 160,6 % para o B (Tabelas 5, 6, 7 e 8 do Apêndice).

Destaca-se que o comportamento das plantas na presença dos fungos não foi o mesmo observado quando as mesmas receberam somente nutrição mineral. As reduções na eficiência de uso de macro- e micronutrientes podem estar relacionadas à desbalanços no suprimento dos mesmos, fazendo com que um ou mais de um elemento seja limitante à produção de matéria seca, mesmo estando os outros prontamente disponíveis. Da mesma forma, a inoculação com os isolados fúngicos pode alterar a atividade fotossintética e a assimilação de carbono, com consequências significativas para a eficiência no uso de nutrientes pelas plantas.

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 3), explicou 51,37% da variabilidade entre os isolados em relação ao conteúdo de macro- e micronutrientes da parte aérea de *C. spectabilis*. Para o componente 1, a PCA explicou 39,42 % da variabilidade, sendo as variáveis de maior peso o conteúdo de K, Ca, Mg e Zn. Para o componente 2, a PCA explicou 11,95 % da variabilidade, com maior peso para o conteúdo de P, Mn e B.

A PCA explicou o 71,68 % da variabilidade entre os isolados na eficiência do uso de macro- e micronutrientes na parte aérea de *C. spectabilis* (Figura 4). Para o componente 1, a PCA explicou 62,09 % da variabilidade, sendo as variáveis de maior peso o uso de N, P, Ca, Mg, Zn. Para o componente 2, a PCA explicou 9,65 % da variabilidade, com maior peso para o uso do Cu e o B.

Hipotetiza-se que a variação na absorção de nutrientes pelas plantas inoculadas possa estar relacionada à eficiência relativa dos isolados em expressar os mecanismos de disponibilização desses elementos nas condições testadas ou nas modificações qualitativas e quantitativas que os mesmos induzem na produção de sistema radicular. Essa variação na expressão dos mecanismos de promoção de crescimento de plantas por isolados fúngicos obtidos da rizosfera, do solo ou de resíduos agrícolas tem sido amplamente relatada (ARRIAGADA *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; KAHAN *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2012; DAL FERRO *et al.*, 2014).

Os isolados 4 e 53 foram os que promoveram os maiores aumentos de N na parte aérea, 94 e 99 %, respectivamente. Em sistemas naturais, o aumento do conteúdo de N em plantas tem sido atribuído à contribuição dos fungos na redução de perdas de NO, N₂O e N₂ provenientes da desnitrificação e na redução da lixiviação pela imobilização do nutriente no micélio (DE VRIES *et al.*, 2011).

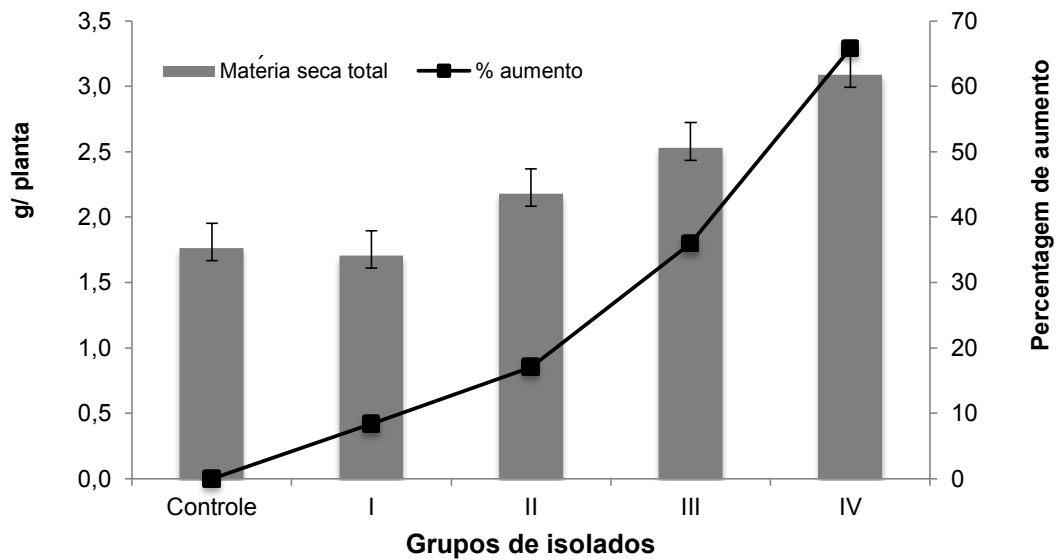


Figura 1. Produção de matéria seca de plantas de *Crotalaria spectabilis* inoculadas com fungos rizosféricos agrupados nos grupos I, II, III e IV, após 60 de crescimento em casa de vegetação. Grupo I: médias entre 1,33 a 1,89 g/planta; grupo II, médias entre 2,02 a 2,29 g/planta; grupo III, médias entre 2,39 a 2,75 g/planta; grupo IV, médias entre 2,85 a 3,31 g/planta. Aumento percentual foi, em média, de 17 % para o grupo II, de 36 % para o grupo III e de 66 % para o grupo IV. As médias do grupo I não diferiram da média do tratamento controle

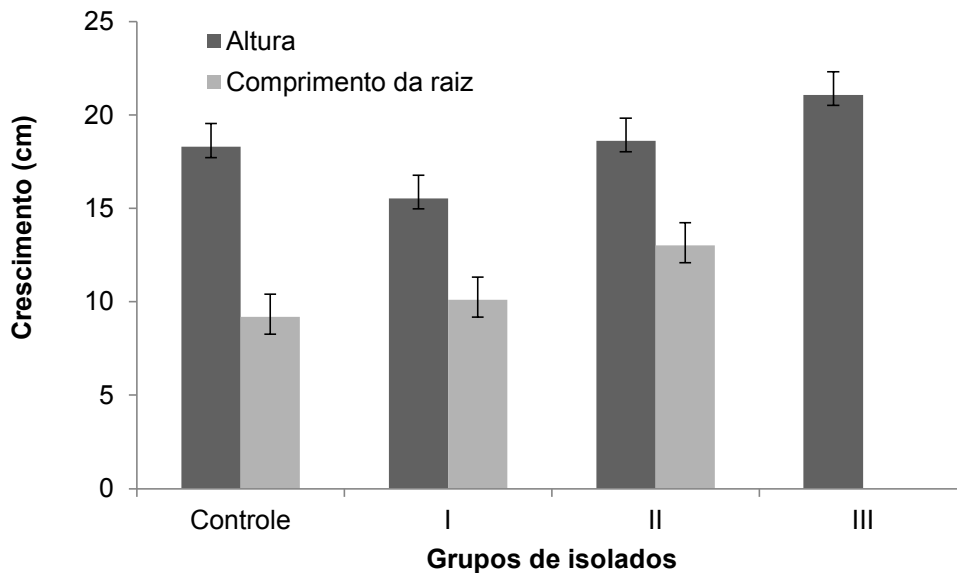


Figura 2. Crescimento de plantas de *Crotalaria spectabilis* inoculadas com fungos rizosféricos agrupados nos grupos I, II, III, após 60 de crescimento em casa de vegetação. Para altura, as médias do grupo I variaram entre 14,3 e 16 cm; para o grupo II, entre 17,5 a 19,6 cm; para o grupo III, entre 19,7 a 25,1 cm; o controle situou-se no grupo II. Para comprimento da raiz, as médias do grupo I variaram entre 6,4 a 11,5 cm; para o grupo II entre 11,7 a 15,8 cm; o controle situou-se no grupo I.

Tabela 2. Matéria seca total, matéria seca da raiz, matéria seca da parte aérea, comprimento da raiz e altura de plântulas de *Crotalaria spectabilis* inoculadas no sistema radicular com fungos rizosféricos, após 60 dias de cultivo em casa de vegetação.

Isolados	Matéria seca total		Matéria seca da raiz		Matéria seca da parte aérea		Comprimento da raiz		Altura	
	----g----	--%--	----g----	--%--	----g----	--%--	----g----	--%--	----g----	--%--
0	1,86	D 0	0,32	C 0	1,54	A 0	9,2	B 0	19,25	B 0
1	1,52	D -18	0,38	C 19	1,14	C -26	10,1	B 10	15,95	C -17
2	2,07	C 11	0,83	C 157	1,24	B -19	15,8	A 72	19,25	B 0
3	1,85	D 0	0,61	C 90	1,24	B -19	9,5	B 3	18,45	B -4
4	2,13	C 15	0,60	C 87	1,53	A -1	10,6	B 15	18,4	B -4
5	2,29	C 23	0,91	B 182	1,38	B -10	10,5	B 14	19,65	A 2
6	1,89	D 2	0,70	C 119	1,19	C -23	6,4	B -30	17,5	B -9
7	1,79	D -4	0,42	C 30	1,37	B -11	9,8	B 7	19	B -1
8	2,60	B 39	1,00	B 212	1,59	A 3	8,5	B -8	19,6	A 2
9	1,48	D -20	0,54	C 68	0,94	C -39	9,8	B 7	18,1	B -6
10	1,34	D -28	0,42	C 31	0,92	C -40	9,7	B 5	15,25	C -21
11	2,04	C 10	0,65	C 103	1,39	B -10	10,3	B 12	18,25	B -5
12	1,58	D -15	0,38	C 18	1,20	C -22	12,1	A 32	19,4	A 1
13	2,22	C 19	1,00	B 210	1,23	B -20	12	A 30	18,5	B -4
14	1,79	D -4	0,71	C 121	1,07	C -30	9,7	B 5	15,8	C -18
15	1,34	D -28	0,34	C 5	1,00	C -35	11,9	A 29	16,3	C -15
16	1,83	D -2	0,42	C 32	1,40	B -9	13,6	A 48	18,45	B -4
17	1,70	D -9	0,61	C 90	1,09	C -30	10,7	B 16	18,25	B -5
18	2,51	B 35	0,96	B 199	1,55	A 1	11,7	A 27	20,6	A 7
19	2,24	C 20	0,81	C 153	1,42	B -8	9,1	B -1	18,6	B -3
20	2,27	C 22	1,07	B 233	1,20	C -22	9,5	B 3	18,5	B -4
21	2,46	B 32	0,90	B 180	1,56	A 1	9,5	B 3	20,05	A 4
22	1,86	D 0	0,50	C 56	1,36	B -12	10,3	B 12	17,85	B -7
23	2,29	C 23	0,65	C 103	1,63	A 6	10,6	B 15	20,2	A 5
24	2,49	B 33	1,14	B 254	1,35	B -12	14,8	A 61	20,6	A 7
25	2,31	C 24	0,74	C 129	1,57	A 2	10,1	B 10	21,7	A 13
26	2,45	B 32	0,91	B 182	1,54	A 0	10,3	B 12	21	A 9
27	3,22	A 73	1,60	A 398	1,62	A 5	10,5	B 14	20,85	A 8
28	2,10	C 13	0,71	C 122	1,39	B -10	10,4	B 13	19,3	A 0
29	2,27	C 22	0,56	C 73	1,71	A 11	11,7	A 27	21,3	A 11
30	2,54	B 36	0,96	B 200	1,57	A 2	10,2	B 11	20,95	A 9
31	3,14	A 69	1,80	A 459	1,35	B -13	14	A 52	18,9	B -2
32	1,97	C 6	0,62	C 93	1,35	B -12	13,7	A 49	19,55	B 2
33	3,31	A 78	1,56	A 384	1,76	A 14	13,1	A 42	20,2	A 5
34	2,21	C 19	0,42	C 31	1,79	A 16	10,9	B 18	21,85	A 14
35	2,56	B 37	0,92	B 185	1,64	A 6	9	B -2	25,1	A 30
36	2,32	C 24	0,81	C 151	1,51	A -2	11,3	B 23	20,55	A 7

Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Tabela 2. Continuação

Isolados	Matéria seca Total		Matéria seca da raiz		Matéria seca aérea		Comprimento da raiz		Altura	
	---g---	--%--	---g---	--%--	---g---	--%--	---g---	--%--	---g---	--%--
37	2,29	C 23	0,97	B 203	1,32	B -15	10,9	B 18	19,4	B 1
38	1,87	D 0	0,45	C 40	1,42	B -8	10,3	B 12	18,4	B -4
39	2,02	C 8	0,47	C 45	1,55	A 1	9	B -2	20,65	A 7
40	2,25	C 21	0,91	B 182	1,35	B -13	14,1	A 53	18,95	B -2
41	2,57	B 38	0,98	B 204	1,60	A 4	10,8	B 17	21,65	A 12
42	2,19	C 18	0,56	C 73	1,64	A 6	11,4	B 24	21,7	A 13
43	2,14	C 15	0,71	C 120	1,43	B -7	10,5	B 14	20	A 4
44	3,17	A 70	1,33	A 314	1,84	A 19	12,8	A 39	21,55	A 12
45	3,16	A 70	1,40	A 334	1,77	A 15	11,4	B 24	23,55	A 22
46	2,64	B 42	0,80	C 150	1,84	A 19	10	B 9	19,85	A 3
47	2,39	B 29	0,95	B 195	1,44	B -6	11,5	B 25	20,55	A 7
48	2,05	C 10	0,52	C 62	1,53	A -1	9,5	B 3	19,3	B 0
49	2,92	A 57	1,24	B 285	1,68	A 9	9,7	B 5	21,6	A 12
50	2,91	A 56	1,21	B 277	1,70	A 10	10	B 9	21,8	A 13
51	2,48	B 33	0,49	C 52	1,99	A 29	11,9	A 29	22,45	A 17
52	1,79	D -4	0,42	C 30	1,37	B -11	12	A 30	17,6	B -9
53	2,46	B 32	0,64	C 100	1,82	A 18	13	A 41	21,7	A 13
54	2,76	B 48	1,23	B 283	1,52	A -1	11,4	B 24	21,7	A 13
55	1,81	D -3	0,52	C 63	1,29	B -16	11,1	B 21	18	B -6
56	2,08	C 12	0,99	B 208	1,09	C -29	13,2	A 43	14,25	C -26
57	2,86	A 53	1,22	B 280	1,64	A 6	10,8	B 17	18,9	B -2

Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

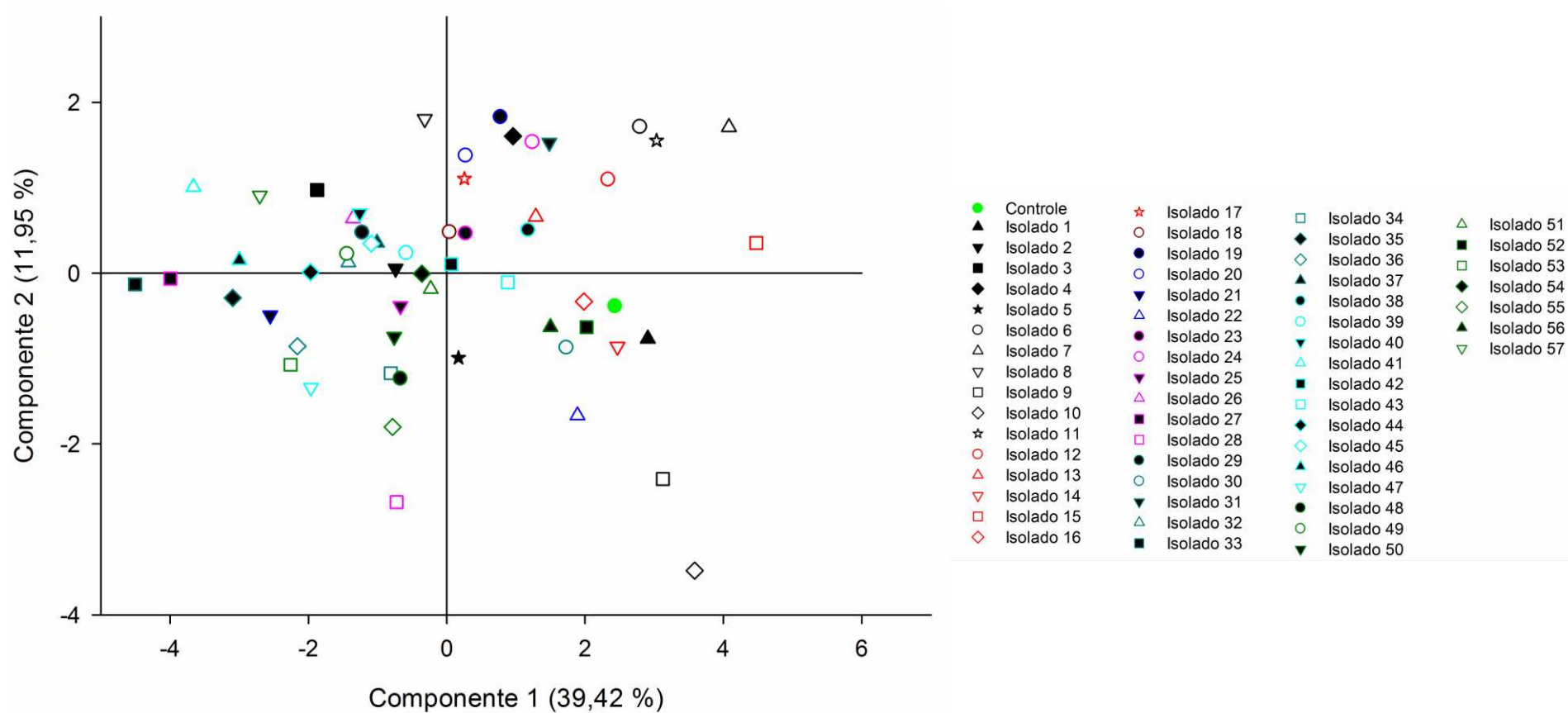


Figura 3. Análise de componentes principais baseada no conteúdo de macro- e micronutrientes presentes na parte aérea de plântulas de *Crotalaria spectabilis* inoculadas com fungos rizosféricos e cultivadas por 60 dias em casa de vegetação.

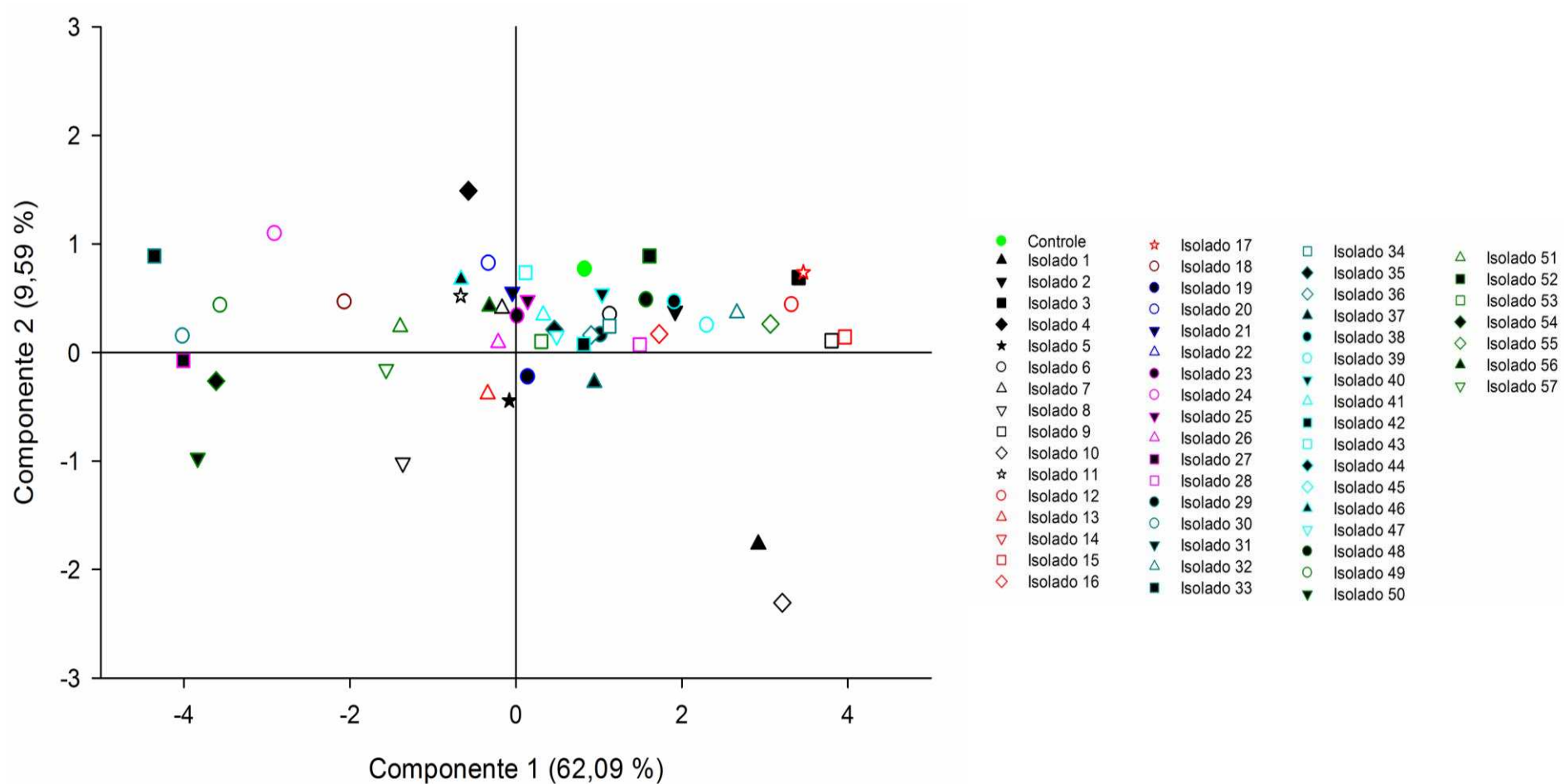


Figura 4. Análise de componentes principais baseada na eficiência de utilização de macro- e micronutrientes presentes na parte aérea de plântulas de *Crotalaria spectabilis* inoculadas com fungos rizosféricos e cultivadas por 60 dias em casa de vegetação.

Avaliação da expressão de mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*

Com base na maior produção de biomassa de *C. spectabilis* medida no experimento de casa de vegetação anterior, foram selecionados os 10 isolados mais promissores para a continuidade das estudos. Os isolados selecionados foram o 8, 27, 31, 33, 44, 45, 49, 50, 54 e 57 ($p < 0,05$). Esses microrganismos expressaram diferentes mecanismos de promoção do crescimento vegetal *in vitro*. Não foi detectada a produção de sideróforos para nenhum deles.

A produção de AIA variou de 0,13 a 23,07 mg L⁻¹ (Tabela 4). O pico de produção ocorreu entre 144 e 168 h de cultivo, sendo os isolados 27 e 50 os maiores produtores desse fitormônio. Fungos do gênero *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp., quando cultivados nas mesmas condições avaliadas, apresentaram maiores valores de produção de AIA (50,37 e 46,95 mg/L) no mesmo intervalo de incubação (TSAVKELOVA *et al.*, 2012). Essa variação deve ocorrer em função das características fisiológicas particulares de cada isolado ou espécie fúngica. Neste trabalho, detectou-se, também, a produção de GA em concentrações que variaram de 5,6 a 40,3 mg/L (Tabela 4).

Os dez isolados fúngicos testados foram capazes de solubilizar diferentes fontes de P adicionadas ao meio de cultura (Tabela 5). A fonte mais solubilizada foi o fosfato de cálcio, seguido do fosfato de alumínio e do fosfato de ferro (Tabela 5). Os isolados apresentaram diferentes potenciais de solubilização de cada uma das fontes de P, indicando a ocorrência de diferentes mecanismos de solubilização para cada uma delas. De fato, a solubilização do fosfato de cálcio ocorre principalmente em função da acidificação do meio, enquanto que para outras fontes, a acidez titulável e a natureza dos ácidos orgânicos envolvidos são mais preponderantes (MENDES *et al.*, 2013, MENDES *et al.*, 2014).

Tabela 3. Produção de auxina (AIA), giberelinas e sideróforos por isolados fúngicos promotores do crescimento vegetal após 7 dias de incubação a 25 °C e 180 rpm.

Isolado	AIA		Giberelinas		Sideróforos
	-----mg L ⁻¹ -----		--- mg mL ⁻¹ ---		
8	0,38	F	18,0	C	ND
27	23,07	A	14,0	C	ND
31	0,66	F	5,6	C	ND
33	2,79	C	21,1	B	ND
44	1,92	D	45,4	A	ND
45	1,41	E	22,8	B	ND
49	0,13	F	16,8	B	ND
50	8,39	B	40,3	A	ND
54	2,12	D	31,9	A	ND
57	2,20	C	19,4	B	ND
CV (%)	9,66		6,71		

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. ND = não detectado. AIA: meio Czapek-Doz enriquecido com triptofano; Giberelinas: meio ICI; sideróforos: meio de Grimm e Allen (1954)

Tabela 4. Solubilização de fosfatos inorgânicos por isolados fúngicos promotores do crescimento vegetal após sete dias de crescimento em meio NBRIP a 25 °C e 250 rpm.

Isolado	Ca ₃ O ₈ P ₂		AlPO ₄		FePO ₄ H ₂ O	
	----- P solúvel (mg L ⁻¹) -----					
8	47,69	E	10,00	D	12,73	D
27	655,23	A	426,78	A	157,25	A
31	38,97	F	41,26	B	14,23	D
33	299,77	B	20,82	C	24,63	C
44	51,83	E	5,31	D	13,77	D
45	92,90	C	20,99	C	19,72	C
49	65,15	D	21,83	C	6,31	E
50	295,67	B	46,35	B	53,43	B
54	51,29	E	8,68	D	3,27	E
57	47,12	E	15,87	C	9,75	D
CV (%)	4,93		4,93		4,93	

Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Promoção do crescimento de *C. spectabilis* em solo e nos rejeitos da mineração de ouro por fungos rizosféricos

A produção de matéria seca total das plantas de *C. spectabilis* no segundo experimento variou de 0,05 a 0,24 g/vaso, a depender do tipo de substrato e do isolado fúngico inoculado no sistema radicular (Figura 5; Tabela 9 do Apêndice). Esses valores são consideravelmente mais baixos do que aqueles obtidos no primeiro experimento com a mistura Latossolo:areia 7:1 (v/v). O primeiro experimento foi montado e conduzido nos meses de setembro e outubro, enquanto que o segundo, nos meses de março e abril. Também, os substratos utilizados no segundo experimento diferiram daquele do primeiro, apresentando condições mais restritivas ao crescimento das plantas, como a maior disponibilidade de alguns metais, a exemplo de Fe, Mn e Zn, presença de As e elevada salinidade (Tabela 1). Dessa forma, conclui-se que a inoculação com os fungos rizosféricos teve o potencial de promover benefícios para o crescimento das plantas de *C. spectabilis* reduzido em função das condições mais adversas vigentes no segundo experimento. Nas simbioses mutualistas entre plantas e fungos micorrízicos e leguminosas e rizóbios, o resultado final da interação em relação à promoção de crescimento da planta é fortemente dependente das condições físico-químicas do meio (WHIPPS & BROADLEY, 2001; VAN LOON & GLICK, 2004; KASEL *et al.*, 2008; ARRIAGADA *et al.*, 2009; ASRAR & ELHINDI, 2011). O mesmo parece aplicar-se às interações entre plantas e fungos rizosféricos promotores do crescimento vegetal.

Nos rejeitos B1 e B2, os fungos que maior estimularam o crescimento de *C. spectabilis* foram os isolados 31, 33 e 49. No substrato Solo, o isolado 57 foi o que promoveu maior produção de matéria seca. No substrato Blend, os isolados 27, 44 e 57 obtiveram os maiores valores de promoção de crescimento. No Mix, os isolados fúngicos 33, 49 e 57 estimularam a produção de biomassa (Figura 5).

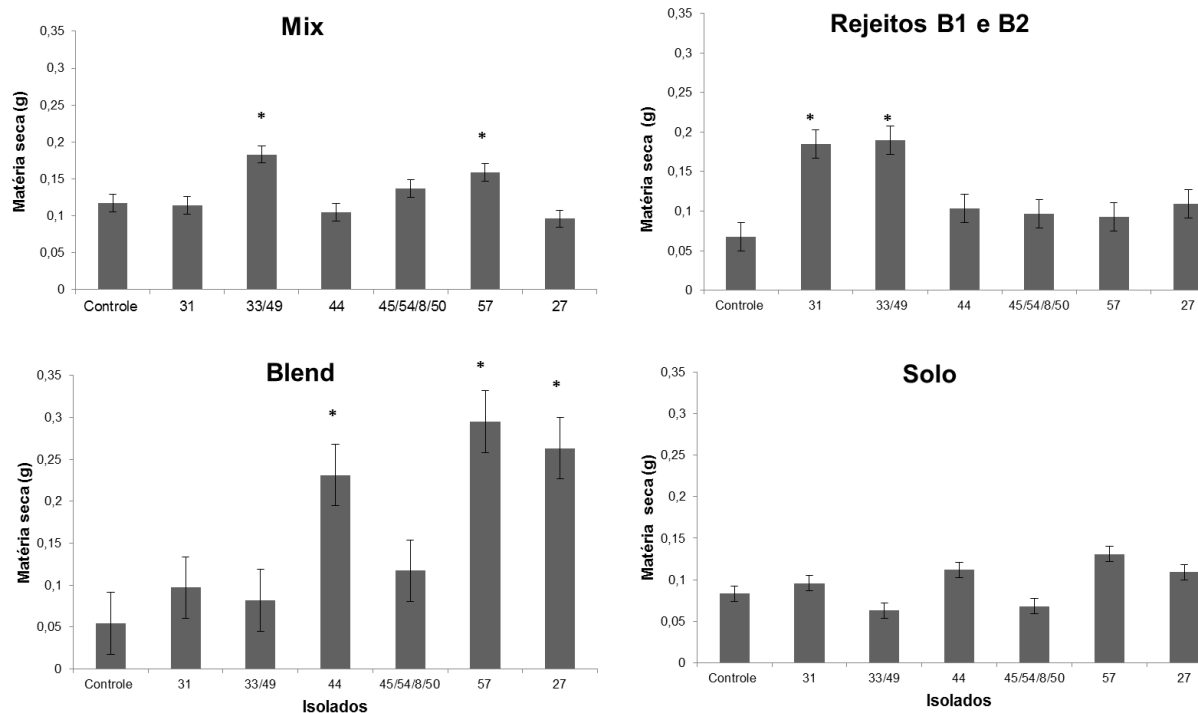


Figura 5. Matéria seca total de plântulas de *Crotalaria spectabilis* cultivada em solo, rejeitos B1 e B2 (substrato intemperizado com menor teor de sulfetos e substrato pouco intemperizado com maior teor de sulfetos, respectivamente), Blend (Substrato oriundo do processamento de B1 e B2 juntos) e Mix (mistura de areia com B2 na proporção 8:2, v/v), por 60 dias em casa de vegetação, inoculadas ou não com diferentes fungos rizoféricos.

A prospecção de microrganismos rizoféricos com capacidade de promoção de crescimento vegetal constitui estratégia promissora para a descoberta de novas espécies com potencial de aplicação na agricultura e na área ambiental. Neste trabalho, os isolados obtidos apresentaram propriedades distintas que podem ser mais ou menos expressas a depender do ambiente onde se encontram. Essa variabilidade é de grande interesse para o entendimento dos mecanismos fisiológicos e genéticos da interação entre plantas e microrganismos, abrindo novas perspectivas de pesquisa na área.

CONCLUSÕES

- I. A rizosfera de gramíneas crescidas em rejeito de mineração de ouro contém fungos rizosféricos promotores de crescimento de plantas.
- II. Alguns desses fungos rizosféricos são capazes de promover o crescimento e a maior absorção de macro- e micronutrientes por *C. spectabilis*.
- III. A promoção de crescimento de *C. spectabilis* por fungos rizosféricos depende do tipo de substrato utilizado no cultivo, levando à necessidade de seleção do microrganismo mais eficiente para um dado tipo de rejeito.
- IV. Em vista da promoção do crescimento e da melhor absorção de nutrientes de plantas de *C. spectabilis*, os fungos promotores do crescimento vegetal obtidos têm potencial de aplicação na revegetação das áreas de deposição de rejeitos da mineração do ouro.

BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR-TRIGUEROS, C.; POWEL, J.; ANDERSON, I.; ANTONOVICS, J.; RILLING, M. Ecological understanding of root-infecting fungi using trait-based approaches. **CellPress**, 2014, doi: 10.1016/j.tplants.2014.02.006.
- ARNOW, L. Colorimetric determination of components of 3,4-dihydroxyphenylalanine tyrosine mixtures. **Journal of Biology and Biochemistry**, **118**: 531, 1937.
- ARRIAGADA, C.; ARANDA, E.; SAMPEDRO, I.; GARCIA-ROMERA, I.; OCAMPO, J. Contribution of the saprobic fungi *Trametes versicolor* and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of *Eucalyptus globulus*. **Bioresource Technology**, **100**: 6250-6257, 2009.
- ASRAR, A.; ELHINDI, K. Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. **Saudi Journal Biological Science**, **10**: 93-98, 2011.
- ATZHORN, R.; CROZIER, A.; WHEELER, C.; SANDBERG, G. Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. **Planta**, **175**: 532-538, 1988.
- BAREEN, F.; SHAFIQ, M.; JAMIL, S. Role of plant growth regulators and a saprobic fungus in enhancement of metal phytoextraction potential and stress alleviation in pearl millet. **Journal of Hazardous Materials**, **237-238**: 186-193, 2012.
- BORROW, A.; BRIAN, P.; CHESTER, V.; other autors. Gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*: Some observations on its production and isolation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **6**: 340-348, 1955.
- BRAGA, J.; DEFELIPO, B. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e planta. **Revista Ceres**, **21**: 73-85, 1974.
- CHEN, L.; LUO, S.; XIAO, X.; GUO, H.; CHEN, J.; WAN, Y.; LI, B.; XU, T.; XI, Q.; RAO, C.; LIU, C.; ZENG, G. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. **Applied Soil Ecology**, **46**: 383-389, 2010.
- CLARK, R. Characterization of phosphatases of intact maize roots. **Journal Agriculture Food Chemistry**, **23**: 458- 460, 1975.
- DA SILVA, A.; PEREIRA, A.; HOLANDA-FILHO, I. O número de ouro e suas aplicações na história da humanidade. **Anais do SNHM**, 2013.
- DAL FERRO, N.; SARTORI, L.; SIMONETTI, G.; BERTI, A.; MORARI, F. Soil macro- and microstructure as affected by different tillage systems and their effects on maize root growth. **Soil & Tillage Research**, **140**: 55-65, 2014.
- DE VRIES, W.; LEIP, A.; REINDS, G.; KROS, J.; LESSECHEN, J.; BOUWMAN, A. Comparison of land nitrogen budget for European agriculture by various modeling approaches. **In Press, Corrected proof**. 2011.
- DEFELIPO, B.; RIVEIRO, A. Análise química do solo (metodologia). 2. Ed. Viçosa, MG: UFV. pp. 26, 1997.
- DUNTEMAN, G. Principal components analysis, No 69. **Sage**, 1989.

- EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. Brasília. pp 370, 2011.
- FELIPE, R.; OLIVEIRA, J.; LEÃO, G. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: Absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Arvore** **33 (2)**: 245-254, 2009.
- GÓMEZ-CORNELIO, S.; MENDOZA-VEJA, J.; GAYLARDE, C.; REYES-ESTEBANEZ, M.; MORÓN-RÍOS, A.; DE LA ROSA-GARCÍA, S.; ORTEGA-MORALES, B. Succession of fungi colonizing porous and compact limestones exposed to subtropical environments. **Fungal Biology**, **116**: 1064-1072, 2012.
- GORDON, S.; WEBER, R. Colorimetric estimation of indole acetic acid. **Plant Physiology**, **26**:192-195, 1951.
- IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). Disponível em: www.ibama.gov.br/phocadownload/supes_go/in_04_11_prad.doc. Acesso: 3 de Outubro, 2011.
- IBRAM. Instituto Brasileiro de Mineração. *Informações e análises da economia mineral Brasileira*. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/>. Acesso em: 13 de Setembro, 2013.
- JHON. M. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic acid. **Soil Science**, **109** : 214-220, 1970.
- KAHAN, A.; HAMAYUN, M.; KIM, Y.; KANG, S.; LEE, I. Ameliorative symbiosis of endophyte (*Penicillium funiculosum* LHL06) under salt stress elevated plant growth of *Glycine max* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, **49**: 852-861, 2011.
- KAPPES, C.; ARF, O.; SÁ, M.; FERREIRA, J.; PORTUGAL, J.; ALCALDE, A.; VILELA, R. Reguladores de crescimento e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes e crescimento de plântulas de *Crotalaria*. **Bioscience Journal**, **28 (2)**: 180-190, 2012.
- KASEL, S.; BENNETT, L.; TIBBITS, J. Land use influences soil fungal community composition across central Victoria, south-eastern Australia. **Soil Biology and Biochemistry**, **40**: 1724-1732, 2008.
- KOSLOV, J.; ENRIGHT, P. RANOVA, TTESTR, TTESTS: Randomization test programs. **American Statistician**, pp 314-315, 1985.
- KYLE, J.; BREUER, P.; BUNNEY, K.; PLEYSIER, R. Review of trace toxic elements (Pb, Cd, Hg, As, Sb, Bi, Se, Te) and their deportment in gold processing Part II: Deportment in gold ore processing by cyanidation. **Hydrometallurgy**, **111-112**: 10-21, 2012.
- LACAP, D.; HYDE, K.; LIEW, E. An evaluation of the fungal morphotype concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Divers**, **12**: 53-66, 2003.
- LAUBER, C.; STRICKLAND, M.; BRADFORD, M.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology & Biochemistry**, **40**: 2407-2415, 2008.

- LUO, S.; XU, T.; CHEN, L.; CHEN, J.; RAO, C.; XIAO, X.; WAN, Y.; ZENG, G.; LONG, F.; LIU, C.; LIU, Y. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. **Applied Microbiology Biotechnology**, **93**:1745–1753, 2012.
- MAGER, D.; THOMAS, A. Extracellular polysaccharides from cyanobacterial soil crust: a review of their role in dryland soil processes. **Journal Arid Environmental**, **75**: 91–97, 2011.
- MAPELLI, F.; MARASCO, R.; BALLOI, A.; ROLLI, E.; CAPPITELLI, F.; DAFFONCHIO, D.; BORIN, S. Mineral-microbe interactions: Biotechnological potential of bioweathering. **Journal of Biotechnology**, **157**: 473-481, 2012.
- MARTÍNES-MEDINA, A.; ROLDÁN, A.; ALBACETE, A.; PASCUAL, J. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. **Phytochemistry**, **72**: 223-229, 2011.
- MEE, G.; KIEBER, J. ACC as a signaling Molecule in Plants. **AoB Plants Advance Access**. pp.1-14, 2013.
- MENDES, G.; FREITAS, A.; PEREIRA, O.; DA SILVA, I.; VASSILEV, N.; COSTA, M. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to deferent P sources. **Annals of Microbiology**, **64**: 239-249, 2014.
- MENDES, G.; VASSILEV, N.; BONDUKI, V.; DA SILVA, I.; RIBEIRP, J.; COSTA, M. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by flouride released from rock phosphate. **Applied and Environmental Microbiology**, **79 (16)**: 4906-4913, 2013.
- NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, **170**: 265-270, 1999.
- NEILANDS, J. Microbial iron compounds. Annu. **Review Biochemical**, **50**: 715-731, 1981.
- OLIVEIRA, L.; CAVALCANTI, M.; FERNANDES, M.; LIMA, D. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, **95**: 49-54, 2013.
- PATRICIO, R.; Avaliação de métodos de revegetação de áreas degradadas utilizados na mineração de níquel em Niquelândia Goiás. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.
- RAIJ, B.; De ANDRADE, J.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J, eds. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas, Instituto Agrônômico. pp 285, 2001.
- ROSOLEM, C.; FOLONI, J.; TIRITAN, C. Root growth and nutrient accumulation in cover crops as affected by soil compaction. **Soil & Tillage Research**, **65**: 109-115, 2002.
- SINGH, A.; JAIN, A.; SARMA, B.; UPADHYAY, R.; SINGH, H. Rhizosphere microbes facilitate redox homeostasis in *Cicer arietinum* against biotic stress. **Annals of Applied Biology**, **163**: 33-46, 2013.
- SINGH, R.; PARAMENSWARAN, E.; RAO, K.; PUTTANNA, A.; KALRA, K.; SRINIVAS, D.; BAGYARAJ, J.; DIVYA, S. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and *Pseudomonas*

- fluorescens* on root-rot and wilt, growth and yield of *Coleus forskohlii*. **Biocontrol Science Technology**, **19**: 835-841, 2009.
- SNOW, G. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*: II. Degradation and identification of fragments. **Journal of the Chemical Society**: 2588-2596, 1954.
- TSAVKELOVA, E.; OESER, B.; OREN-YOUNG, L.; ISRAELI, M.; SASSON, Y.; TUDZYNSKI, B.; SHARON, A. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, **49**: 48-57, 2012.
- VAN LOON, L.; GLICK, B. Increased plant fitness by rhizobacteria. **Molecular Ecotoxicology of Plants**. pp. 177-205, 2004.
- WESTON, R. Gold (Routledge Revivals): A world Survey. Routledge, 2012.
- WHIPPS, J. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, **52**: 487-511, 2001.
- WOLLENZIEN, U.; HOOG, G.; KRUMBEIN, W.; URZÌ, C. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. **Science of the Total Environment**, **167**: 287-294, 1995.

APÊNDICE

Tabela 5. Conteúdo de macronutrientes na parte aérea de plântulas de *Crotalaria spectabilis*, inoculadas no sistema radicular com fungos rizosféricos, após 60 dias de cultivo em casa de vegetação.

Isolado	N		P		K		Ca		Mg		S	
	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---
Controle	17,1 G	0,0	5,6 E	0,1	23,8 F	0,0	34,5 H	0,0	4,7 E	0,1	4,7 D	0,1
1	16,5 G	-3,9	2,9 G	-49,0	12,6 H	-47,2	48,9 E	41,6	8,0 C	71,8	6,8 C	43,9
2	19,4 F	13,1	7,4 C	32,2	28,2 D	18,4	45,2 F	31,0	7,0 D	50,1	7,4 B	57,1
3	17,2 G	0,5	6,9 D	22,8	28,0 D	17,4	59,6 C	72,7	8,4 C	81,3	6,0 C	28,7
4	33,2 A	93,7	6,0 E	6,2	45,3 A	90,2	25,7 I	-25,5	3,7 F	-20,4	3,1 E	-33,3
5	20,7 E	20,6	7,0 C	25,0	25,2 E	5,6	54,1 D	56,6	5,7 C	21,9	5,1 D	8,8
6	15,8 G	-7,7	4,6 F	-18,5	19,2 G	-19,4	33,4 H	-3,3	4,5 E	-2,8	4,4 D	-5,9
7	11,6 I	-32,5	3,5 G	-37,8	13,4 H	-43,9	24,5 I	-29,1	3,4 F	-27,7	2,7 F	-41,5
8	17,2 G	0,2	6,4 D	13,1	35,7 C	49,9	42,9 F	24,3	6,8 D	46,3	8,3 A	76,8
9	18,5 F	7,8	4,4 F	-22,2	20,8 F	-13,0	35,0 H	1,4	4,8 E	2,1	5,0 D	7,4
10	28,5 C	66,1	9,0 B	60,1	13,3 H	-44,1	20,9 I	-39,6	3,2 F	-31,6	2,3 F	-51,9
11	14,2 H	-17,5	5,0 E	-11,8	20,7 F	-13,2	36,1 H	4,7	4,7 E	0,0	4,3 D	-8,1
12	14,4 H	-16,1	4,8 F	-15,7	22,5 F	-5,8	45,1 F	30,5	4,6 E	-1,0	3,5 E	-25,5
13	24,3 D	41,9	3,4 G	-40,1	29,4 D	23,3	36,7 H	6,3	5,9 C	26,6	4,7 D	-0,4
14	17,7 G	3,0	5,9 E	4,7	19,3 G	-19,2	34,6 H	0,2	5,3 C	14,8	6,1 C	29,9
15	14,2 H	-17,1	3,8 G	-31,9	17,3 H	-27,2	30,2 H	-12,4	3,8 F	-19,0	3,2 E	-32,8
16	21,6 E	26,2	4,3 F	-23,4	12,8 H	-46,5	32,0 H	-7,4	6,9 D	48,0	3,7 E	-21,0
17	15,6 G	-9,0	5,4 E	-4,7	22,8 F	-4,2	54,8 D	58,9	7,3 D	56,7	4,2 D	-11,0
18	22,4 E	30,7	5,6 E	-1,3	19,1 G	-19,9	64,3 C	86,2	7,2 D	54,7	4,8 D	1,7
19	27,1 C	58,2	6,2 D	10,3	24,5 E	2,6	37,1 H	7,4	4,6 E	-2,0	5,3 D	13,3
20	15,9 G	-7,3	7,2 C	27,6	26,5 E	11,1	60,4 C	74,9	5,2 C	11,4	4,4 D	-6,9

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Tabela 5. Continuação

Isolado	N		P		K		Ca		Mg		S							
	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---						
21	26,9	C	57,0	6,5	D	15,1	29,1	D	21,9	67,3	C	95,0	8,6	C	84,5	4,9	D	3,5
22	19,4	F	13,1	5,8	E	2,3	23,2	F	-2,7	52,6	E	52,5	5,5	C	18,9	3,9	E	-16,6
23	18,7	F	9,3	6,4	D	13,8	32,1	C	34,8	51,1	E	48,0	6,1	C	32,0	4,4	D	-6,2
24	15,7	G	-8,3	4,9	E	-13,2	24,2	E	1,3	38,7	G	12,1	5,6	C	20,2	4,2	D	-10,5
25	22,3	E	30,3	6,3	D	12,5	28,2	D	18,3	47,0	F	36,2	7,2	D	53,8	6,3	C	33,8
26	21,3	E	24,0	5,3	E	-6,4	32,7	C	37,1	57,3	D	65,9	7,2	D	54,8	6,5	C	38,4
27	25,6	D	49,1	7,4	C	31,5	33,4	C	40,0	63,4	C	83,7	7,9	C	69,5	7,0	B	48,8
28	30,2	B	76,4	10,3	A	82,9	21,5	F	-9,8	33,3	H	-3,5	7,7	C	65,3	5,6	C	20,0
29	24,2	D	41,0	6,1	E	8,9	34,4	C	44,1	60,4	C	74,9	6,4	C	38,4	5,6	C	20,2
30	22,1	E	29,2	6,7	D	18,7	22,9	F	-4,1	31,7	H	-8,3	5,4	C	15,2	4,4	D	-6,4
31	19,9	F	16,1	4,6	F	-18,9	22,9	F	-4,1	32,4	H	-6,1	4,7	E	1,8	5,0	D	5,7
32	21,2	E	23,5	5,5	E	-2,3	33,7	C	41,4	45,8	F	32,7	7,9	C	70,4	9,0	A	91,1
33	29,3	B	70,8	8,1	B	44,1	43,2	A	81,2	70,4	B	103,9	10,7	A	129,1	6,1	C	30,6
34	27,2	C	58,5	6,8	D	20,2	30,8	D	29,4	44,2	F	28,1	7,5	D	61,3	6,4	C	37,2
35	24,3	D	41,9	8,2	B	45,6	31,9	C	33,8	61,5	C	78,3	9,5	B	103,3	7,2	B	52,8
36	17,5	G	2,1	8,9	B	58,0	32,3	C	35,4	48,4	E	40,2	8,2	C	76,1	7,6	B	61,7
37	19,4	F	13,4	6,7	D	18,1	35,8	C	50,1	46,5	F	34,8	7,3	D	57,4	7,0	C	48,7
38	19,9	F	16,0	5,5	E	-3,1	26,0	E	9,1	39,1	G	13,3	6,2	C	34,1	5,1	D	7,7
39	21,7	E	26,7	6,1	E	8,8	33,0	C	38,4	50,3	E	45,7	6,3	C	36,3	5,3	D	13,8
40	22,3	E	30,0	8,1	B	43,6	34,5	C	4,6	52,6	E	52,3	6,7	D	43,7	6,2	C	31,9
41	25,0	D	45,9	7,5	C	32,6	38,6	B	61,8	78,7	A	127,9	7,9	C	70,8	6,2	C	32,6

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Tabela 5. Continuação

Isolado	N		P		K		Ca		Mg		S	
	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---
42	22,4 E	30,4	5,6 E	-1,0	26,2 E	10,0	47,5 F	37,7	6,2 C	33,6	6,6 D	39,7
43	17,1 G	-0,5	6,4 D	13,9	27,9 D	17,2	45,6 F	32,2	5,6 C	20,9	4,8 D	1,2
44	27,0 C	57,7	6,5 D	15,0	35,3 C	48,2	55,9 D	62,1	6,8 D	47,1	5,9 C	26,5
45	19,1 F	11,3	5,1 E	-9,4	29,4 D	23,3	39,0 G	13,1	10,7 A	129,7	9,2 A	95,2
46	32,2 A	88,1	7,3 C	30,2	33,8 C	41,6	57,5 D	66,6	9,6 B	107,4	4,9 D	3,6
47	25,1 D	46,3	7,5 C	33,5	43,1 A	80,8	44,4 F	28,7	8,3 C	77,6	7,3 B	55,7
48	25,3 D	47,4	5,4 E	-3,7	27,5 D	15,3	45,7 F	32,4	7,7 C	65,7	6,4 C	36,8
49	25,0 D	45,7	6,5 D	15,0	34,0 C	42,5	50,0 E	44,7	7,7 C	64,9	5,7 C	20,8
50	21,0 E	22,4	8,0 B	42,0	34,1 C	43,1	52,1 E	51,0	7,9 C	68,8	5,6 C	20,1
51	20,1 F	17,3	5,8 E	2,4	30,2 D	26,7	44,9 F	30,0	7,4 D	58,9	6,1 C	30,9
52	16,5 G	-3,8	7,5 C	32,8	18,7 G	-21,6	40,2 G	16,5	5,7 C	21,4	3,7 E	-21,0
53	34,1 A	98,7	7,6 C	35,5	32,8 C	37,7	46,4 F	34,6	7,7 C	66,3	6,7 C	42,9
54	17,1 G	-0,1	8,3 B	46,9	23,1 F	-2,9	54,4 D	57,5	6,2 C	33,3	5,6 C	19,8
55	23,3 D	36,0	8,0 B	42,7	21,6 F	-9,6	41,0 G	18,8	5,2 D	12,5	7,7 B	63,0
56	22,4 E	30,5	4,4 F	-21,7	26,4 E	10,6	42,7 G	23,7	5,9 C	27,6	3,4 E	-28,7
57	27,9 C	62,5	6,7 D	19,0	35,8 C	50,0	60,5 C	75,4	8,4 C	80,2	7,0 B	50,1
CV (%)	7,11		9,03		8,26		8,13		9,04		10,02	

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Tabela 6. Conteúdo de micronutrientes na parte aérea de plântulas de *Crotalaria spectabilis*, inoculadas no sistema radicular com fungos rizosféricos, após 60 dias de cultivo em casa de vegetação.

Isolado	Cu		Fe		Zn		Mn		B	
	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---
Controle	0,00	H 0,0	0,14	F 0,0	0,09	E 0,0	0,27	F 0,0	0,08	D 0,0
1	0,00	G 49,7	0,46	C 218,4	0,05	H -48,5	0,37	E 37,9	0,03	E -65,7
2	0,01	F 187,6	0,24	E 68,9	0,11	D 29,3	0,42	D 57,4	0,13	C 65,9
3	0,01	C 279,7	0,29	E 104,9	0,14	B 59,3	0,47	C 76,2	0,17	B 119,5
4	0,00	H -17,2	0,47	C 228,0	0,09	E -0,7	0,71	B 163,8	0,15	B 98,0
5	0,01	B 381,5	0,32	E 120,2	0,08	F -7,5	0,32	F 18,7	0,10	D 29,4
6	0,00	G 84,1	0,33	D 132,3	0,08	F -12,2	0,64	G 136,1	0,12	C 63,0
7	0,01	F 188,8	0,24	E 64,7	0,06	G -30,9	0,49	C 81,6	0,16	B 108,5
8	0,01	F 191,4	0,29	E 100,6	0,10	D 17,8	0,79	A 192,5	0,08	D 10,4
9	0,00	G 78,7	1,17	A 714,6	0,07	F -18,0	0,21	G -21,6	0,06	D -18,9
10	0,01	C 284,4	0,34	D 138,9	0,04	H -56,4	0,25	G -8,6	0,02	E -78,8
11	0,00	H -2,5	0,18	F 21,9	0,08	E -5,3	0,61	C 127,0	0,08	D 3,8
12	0,00	F 122,4	0,25	E 75,7	0,10	D 18,4	0,52	C 92,9	0,08	D 1,5
13	0,01	C 272,4	0,28	E 92,1	0,08	E -5,0	0,50	C 86,7	0,09	D 24,0
14	0,00	F 164,5	0,29	E 103,4	0,08	F -12,6	0,44	D 62,9	0,02	E -77,5
15	0,00	G 69,8	0,50	C 250,2	0,06	G -31,7	0,51	C 89,1	0,05	D -28,2
16	0,01	F 183,6	0,38	D 164,2	0,11	D 21,7	0,38	E 41,3	0,10	C 34,4
17	0,00	F 161,8	0,32	E 126,0	0,12	C 39,3	0,47	C 72,7	0,14	B 85,9
18	0,00	G 89,5	0,24	E 69,4	0,11	D 19,2	0,40	D 49,5	0,14	C 82,1
19	0,01	C 322,8	0,36	D 148,7	0,07	F -15,5	0,86	A 219,6	0,14	B 86,2

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Tabela 6. Continuação

Isolado	Cu		Fe		Zn		Mn		B					
	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---				
20	0,00	G	60,6	F	53,0	0,13	C	47,8	0,55	C	104,2	0,12	C	54,6
21	0,01	B	337,6	E	84,5	0,15	B	71,5	0,28	F	2,4	0,14	B	91,1
22	0,01	C	277,4	E	72,0	0,07	E	-23,6	0,24	G	-11,3	0,02	E	-75,5
23	0,00	F	158,1	E	122,5	0,09	E	5,5	0,42	D	54,6	0,13	C	72,2
24	0,00	H	39,5	E	72,7	0,13	C	47,9	0,47	C	73,3	0,15	B	94,1
25	0,00	F	172,6	E	60,5	0,12	C	35,0	0,28	F	5,2	0,13	C	73,0
26	0,01	C	272,0	E	65,3	0,14	B	58,8	0,43	D	61,0	0,11	C	51,2
27	0,01	A	585,2	D	130,8	0,17	A	92,8	0,39	E	44,3	0,17	A	129,2
28	0,01	D	234,6	D	193,2	0,10	E	8,6	0,26	F	-2,3	0,12	C	56,5
29	0,01	D	238,8	E	68,1	0,13	C	49,5	0,47	C	73,6	0,10	C	37,0
30	0,00	G	89,7	F	23,1	0,08	F	-9,7	0,27	F	-0,6	0,10	C	37,8
31	0,01	B	357,1	D	131,6	0,07	F	-19,0	0,62	C	130,1	0,16	B	112,7
32	0,01	D	248,2	E	78,9	0,11	D	27,1	0,38	E	40,6	0,13	C	67,8
33	0,00	F	132,9	D	173,0	0,17	A	88,3	0,33	F	21,5	0,18	A	139,2
34	0,00	F	167,2	D	148,2	0,10	D	16,9	0,27	F	-0,5	0,12	C	59,0
35	0,01	D	255,5	C	216,3	0,14	B	62,7	0,42	D	54,9	0,16	B	107,5
36	0,01	B	371,8	E	89,4	0,13	C	46,8	0,32	F	17,5	0,13	C	65,9
37	0,01	C	301,4	E	89,4	0,12	D	31,3	0,51	C	89,0	0,09	D	25,0
38	0,00	F	156,5	F	7,8	0,08	F	-9,3	0,44	D	63,8	0,11	C	48,2
39	0,01	C	278,9	E	115,0	0,12	C	38,2	0,44	D	64,6	0,11	C	41,8
40	0,00	F	149,7	F	50,6	0,12	C	34,7	0,53	G	96,5	0,13	C	75,4

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Tabela 6. Continuação

Isolado	Cu		Fe		Zn		Mn		B	
	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---	---mg---	---%---
41	0,01 B	378,0	0,28 E	95,7	0,15 B	68,7	0,54 G	100,2	0,16 C	106,1
42	0,01 F	194,1	0,25 E	76,2	0,11 D	19,0	0,41 D	53,5	0,11 B	44,1
43	0,00 G	91,2	0,22 F	55,2	0,09 E	1,4	0,26 F	-4,2	0,13 C	77,3
44	0,01 F	187,7	0,26 E	78,3	0,15 B	73,3	0,34 E	26,5	0,14 C	81,3
45	0,00 F	129,8	0,60 B	318,6	0,12 C	36,3	0,55 C	104,7	0,11 C	47,2
46	0,01 D	242,5	0,30 E	112,2	0,13 C	45,3	0,42 D	54,5	0,20 A	160,6
47	0,00 F	157,7	0,39 D	173,2	0,12 C	40,5	0,23 G	-15,1	0,11 C	41,1
48	0,01 D	232,7	0,28 E	97,3	0,11 D	24,8	0,17 G	-37,0	0,12 C	59,8
49	0,00 F	153,1	0,27 E	90,0	0,13 C	48,5	0,38 E	39,2	0,15 B	97,3
50	0,00 F	133,0	0,26 E	82,4	0,11 D	25,4	0,36 E	32,2	0,08 D	4,6
51	0,00 F	145,8	0,21 F	43,7	0,12 D	30,3	0,30 F	12,1	0,11 C	45,4
52	0,00 H	22,9	0,20 F	42,6	0,07 F	-17,5	0,26 F	-3,9	0,12 C	59,6
53	0,01 D	218,2	0,26 E	78,7	0,15 B	65,4	0,36 E	35,1	0,11 C	44,9
54	0,01 C	270,6	0,18 F	26,8	0,12 D	31,5	0,44 D	64,1	0,11 C	43,8
55	0,01 B	360,2	0,29 E	103,8	0,14 B	58,6	0,24 G	-12,8	0,09 D	25,1
56	0,00 F	172,6	0,14 F	0,4	0,09 E	3,5	0,21 G	-20,9	0,08 D	11,8
57	0,01 C	308,1	0,36 D	147,7	0,12 C	39,3	0,59 C	120,6	0,16 B	108,2
CV (%)	12,17		19,44		7,29		10,89		14,25	

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. A porcentagem de aumento (%) foi calculada em relação ao tratamento controle, sem inoculação.

Tabela 5. Eficiência de utilização de macronutrientes na parte aérea de *Crotalaria spectabilis* inoculadas no sistema radicular com fungos rizosféricos, após 60 dias de cultivo em casa de vegetação.

Isolado	N		P		K		Ca		Mg		S	
	-----g ² mg ⁻¹ -----											
Controle	0,20	B	0,62	C	0,15	B	0,10	C	0,75	C	0,74	B
1	0,14	B	0,81	C	0,18	B	0,05	C	0,29	C	0,34	B
2	0,22	B	0,57	C	0,15	B	0,09	C	0,61	C	0,58	B
3	0,20	B	0,50	C	0,12	B	0,06	C	0,41	C	0,57	B
4	0,14	B	0,76	C	0,10	B	0,18	B	1,23	B	1,46	A
5	0,25	B	0,75	C	0,21	B	0,10	C	0,93	C	1,03	B
6	0,23	B	0,78	C	0,19	B	0,11	C	0,79	C	0,81	B
7	0,28	B	0,92	C	0,24	A	0,13	C	0,95	B	1,17	A
8	0,39	A	1,06	C	0,19	B	0,16	B	0,99	B	0,81	B
9	0,12	B	0,50	C	0,11	B	0,06	C	0,46	C	0,44	B
10	0,06	B	0,20	C	0,13	B	0,09	C	0,56	C	0,80	B
11	0,30	B	0,84	C	0,20	B	0,12	C	0,90	C	0,97	B
12	0,17	B	0,53	C	0,11	B	0,06	C	0,54	C	0,72	B
13	0,20	B	1,46	B	0,17	B	0,13	C	0,84	C	1,06	B
14	0,18	B	0,54	C	0,17	B	0,09	C	0,60	C	0,52	B
15	0,13	B	0,47	C	0,10	B	0,06	C	0,47	C	0,57	B
16	0,15	B	0,77	C	0,26	A	0,10	C	0,48	C	0,90	B
17	0,18	B	0,54	C	0,13	B	0,05	C	0,39	C	0,69	B
18	0,28	B	1,14	B	0,33	A	0,10	C	0,88	C	1,33	A
19	0,18	B	0,81	C	0,20	B	0,14	C	1,10	B	0,94	B
20	0,32	A	0,72	C	0,19	B	0,09	C	0,99	B	1,18	A
21	0,22	B	0,93	C	0,21	B	0,09	C	0,71	C	1,25	A
22	0,18	B	0,60	C	0,15	B	0,07	C	0,62	C	0,88	B
23	0,28	B	0,82	C	0,16	B	0,10	C	0,85	C	1,19	A
24	0,39	A	1,26	B	0,26	A	0,16	B	1,10	B	1,47	A
25	0,24	B	0,84	C	0,19	B	0,11	C	0,74	C	0,85	B
26	0,28	B	1,14	B	0,18	B	0,11	C	0,84	C	0,93	B
27	0,41	A	1,40	B	0,31	A	0,16	B	1,32	B	1,49	A
28	0,15	B	0,43	C	0,21	B	0,13	C	0,57	C	0,78	B
29	0,21	B	0,84	C	0,15	B	0,09	C	0,80	C	0,91	B
30	0,29	B	0,96	C	0,28	A	0,20	B	1,20	B	1,46	A
31	0,50	A	2,17	A	0,43	A	0,31	A	2,09	A	1,99	A
32	0,18	B	0,71	C	0,12	B	0,08	C	0,49	C	0,43	B
33	0,37	A	1,35	B	0,25	A	0,16	B	1,03	B	1,79	A
34	0,18	B	0,72	C	0,16	B	0,11	C	0,65	C	0,76	B
35	0,27	B	0,80	C	0,20	B	0,11	C	0,69	C	0,91	B
36	0,31	B	0,60	C	0,17	B	0,11	C	0,65	C	0,71	B
37	0,27	B	0,79	C	0,15	B	0,11	C	0,72	C	0,75	B
38	0,18	B	0,64	C	0,13	B	0,09	C	0,56	C	0,69	B
39	0,19	B	0,67	C	0,12	B	0,08	C	0,64	C	0,76	B
40	0,23	B	0,63	C	0,15	B	0,10	C	0,76	C	0,82	B

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Tabela 7. Continuação

Isolado	-----g ² mg ⁻¹ -----											
	N		P		K		Ca		Mg		S	
41	0,26	B	0,89	C	0,17	B	0,08	C	0,83	C	1,07	B
42	0,22	B	0,86	C	0,18	B	0,10	C	0,77	C	0,73	B
43	0,27	B	0,71	C	0,16	B	0,10	C	0,81	C	0,96	B
44	0,37	A	1,55	B	0,28	A	0,18	B	1,47	B	1,69	A
45	0,52	A	1,96	A	0,34	A	0,26	A	0,94	C	1,09	A
46	0,22	B	0,95	C	0,21	B	0,12	C	0,72	C	1,43	A
47	0,23	B	0,76	C	0,13	B	0,13	C	0,69	C	0,78	B
48	0,17	B	0,77	C	0,15	B	0,09	C	0,54	C	0,65	B
49	0,34	A	1,32	B	0,25	A	0,17	B	1,11	B	1,51	A
50	0,40	A	1,06	C	0,25	A	0,16	B	1,08	B	1,50	A
51	0,31	B	1,07	C	0,20	B	0,14	C	0,83	C	1,00	B
52	0,19	B	0,43	C	0,17	B	0,08	C	0,56	C	0,86	B
53	0,18	B	0,79	C	0,18	B	0,13	C	0,78	C	0,90	B
54	0,44	A	0,92	C	0,33	A	0,14	C	1,23	B	1,35	A
55	0,14	B	0,41	C	0,15	B	0,08	C	0,63	C	0,43	B
56	0,19	B	0,98	C	0,16	B	0,10	C	0,73	C	1,30	A
57	0,29	B	1,22	B	0,23	B	0,13	C	0,97	B	1,16	A
CV	33,68		34,73		34,48		36,86		35,63		36,93	

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Tabela 8. Eficiência de utilização de micronutrientes na parte aérea de plantas de *Crotalaria spectabilis* inoculadas no sistema radicular com fungos rizosféricos, após 60 dias de cultivo em casa de vegetação.

Isolado	Cu		Fe		Zn		Mn		B	
	-----g ² mg ⁻¹ -----									
0	1915,4	B	24,1	B	39,2	C	12,9	C	45,9	C
1	861,0	C	5,1	C	50,9	C	6,2	C	89,6	C
2	824,7	C	17,6	C	37,3	C	10,1	C	34,1	C
3	502,9	C	11,7	C	24,4	C	7,2	C	20,7	C
4	3058,2	A	9,7	C	51,8	C	6,4	C	30,4	C
5	605,6	C	16,6	C	64,1	B	16,4	B	53,7	B
6	1082,8	C	10,7	C	46,2	C	5,6	C	29,1	C
7	617,1	C	13,6	C	52,4	C	6,6	C	20,4	C
8	1285,8	C	23,4	B	64,7	B	8,6	C	80,8	A
9	683,6	C	1,9	C	30,3	C	10,4	C	35,9	C
10	259,5	C	5,2	C	46,5	C	7,3	C	112,1	C
11	2381,6	A	23,9	B	49,9	C	6,8	C	53,3	B
12	625,6	C	9,9	C	23,9	C	4,8	C	32,6	C
13	736,8	C	17,9	C	58,7	B	9,8	C	52,7	B
14	669,6	C	10,9	C	41,2	C	7,3	C	187,2	C
15	583,6	C	3,5	C	29,5	C	3,5	C	32,9	C
16	652,6	C	8,8	C	30,9	C	8,7	C	32,8	C
17	609,8	C	8,8	C	23,3	C	6,2	C	20,5	C
18	1853,1	B	26,0	B	59,9	B	15,7	B	45,9	C
19	657,7	C	14,0	C	66,9	B	5,8	C	35,6	C
20	1782,2	B	23,4	B	39,4	C	9,4	C	44,1	C
21	768,3	C	22,8	B	39,9	C	21,9	A	41,9	C
22	507,5	C	13,9	C	51,0	B	14,4	C	186,2	C
23	1124,4	C	16,3	C	56,0	C	12,5	C	40,2	C
24	2458,6	A	24,9	B	47,2	C	13,2	C	42,1	C
25	1085,6	C	23,1	B	44,6	C	18,8	B	40,8	C
26	898,3	C	25,3	B	42,8	C	13,9	C	52,7	B
27	842,2	C	31,3	A	60,9	B	26,7	A	60,0	B
28	733,7	C	10,5	C	46,0	C	16,8	B	37,4	C
29	843,4	C	21,3	B	38,9	C	11,0	C	49,7	B
30	1883,1	B	36,3	A	80,5	B	24,0	A	61,8	B
31	1202,0	C	29,7	A	137,9	A	15,9	B	61,5	B
32	620,2	C	15,1	C	34,6	C	10,3	C	30,7	C
33	2618,1	A	28,0	B	65,9	B	33,5	A	60,7	B
34	1017,1	C	13,7	C	47,3	C	18,2	B	40,7	C
35	1021,2	C	14,4	C	45,4	C	15,7	B	41,7	C
36	631,2	C	19,7	C	41,3	C	16,9	B	42,8	C
37	724,9	C	19,2	C	45,1	C	10,3	C	55,5	B
38	756,8	C	22,6	B	43,5	C	7,9	C	31,2	C
39	598,2	C	13,2	C	33,4	C	9,2	C	38,1	C
40	1130,2	C	23,5	B	42,6	C	9,6	C	38,3	C
41	769,9	C	23,6	B	44,4	C	12,3	C	42,5	C

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Tabela 8. Continuação

Isolado	Cu	Fe	Zn	Mn	B
	-----g ² mg ⁻¹ -----				
42	908,5 C	19,0 C	45,7 C	11,6 C	44,2 C
43	1329,9 C	20,5 B	51,0 C	17,7 B	34,1 C
44	1939,0 B	39,2 A	65,5 B	29,5 A	73,3 B
45	2416,8 A	16,6 C	82,9 B	18,1 B	89,9 A
46	1131,4 C	22,9 B	54,2 C	16,8 B	35,4 C
47	1235,4 C	14,6 C	46,1 C	25,1 A	53,7 B
48	699,9 C	14,8 C	37,9 C	24,7 A	34,7 C
49	1874,1 B	31,3 A	64,9 B	22,7 A	57,3 B
50	2015,3 B	32,3 A	76,2 B	23,7 A	106,9 A
51	1391,7 C	29,8 A	53,4 C	20,4 B	56,0 B
52	1441,6 C	15,6 C	43,7 C	12,3 C	26,5 C
53	1056,3 C	23,6 B	41,3 C	16,6 B	55,2 B
54	1140,1 C	41,7 A	65,3 B	17,2 B	70,0 B
55	397,0 C	11,2 C	23,4 C	14,0 C	34,8 C
56	884,1 C	30,1 A	47,3 C	20,3 A	51,4 B
57	1111,2 C	22,9 B	66,2 B	13,7 C	51,9 B
CV	44,9	38,3	37,1	33,5	39,9

Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Tabela 9. Matéria seca total, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, comprimento da raiz e altura de plântulas de *Crotalaria spectabilis* crescidas em Solo (Latossolo), rejeito B1 (substrato intemperizado com menor teor de sulfetos), rejeito B2 (substrato pouco intemperizado com maior teor de sulfetos), Blend (Substrato oriundo do processamento) e Mix (mistura de areia com B2 na proporção 8:2, v/v, respectivamente), por 60 dias em casa de vegetação.

Isolado	Matéria seca total		Matéria seca parte aérea		Matéria seca da raiz		Comprimento raiz		Altura	
-----Solo-----										
Controle	0,07	Ca	0,04	Aa	0,03	Ba	17,7	Aa	3,7	Ba
8	0,16	Ba	0,09	Aa	0,07	Ba	26,7	Aa	4,5	Aa
27	0,09	Cb	0,05	Ab	0,04	Bb	11,9	Aa	4,3	Ab
31	0,22	Aa	0,1	Aa	0,12	Aa	19,2	Aa	5,4	Aa
33	0,24	Aa	0,04	Aa	0,03	Aa	18,5	Aa	3,7	Ab
44	0,1	Cb	0,05	Aa	0,05	Bb	19,7	Aa	5,1	Bc
45	0,09	Ca	0,06	Aa	0,03	Ba	12,3	Aa	3,2	Ba
49	0,16	Ba	0,06	Aa	0,06	Ba	20,6	Aa	3,4	Bb
50	0,13	Ca	0,07	Aa	0,08	Ba	14,9	Ab	3,4	Ab
54	0,07	Ca	0,1	Aa	0,14	Ba	17,2	Aa	3,7	Bb
57	0,08	Cb	0,04	Ab	0,04	Bb	16,7	Ab	3,1	Bb
-----Rejeito B1-----										
Controle	0,08	Ba	0,06	Aa	0,03	Aa	9,5	Bb	4	Ca
8	0,11	Bb	0,06	Aa	0,04	Aa	10	Bb	3	Cb
27	0,13	Bb	0,07	Ab	0,06	Ab	12,4	Ba	4,5	Bb
31	0,15	Bb	0,08	Aa	0,07	Ab	11,8	Ba	4,7	Ba
33	0,14	Bb	0,02	Aa	0,04	Aa	26,3	Aa	4,5	Bb
44	0,11	Bb	0,06	Aa	0,04	Ab	9	Bb	3,2	Cc
45	0,07	Ba	0,04	Aa	0,04	Aa	12,2	Ba	4	Ca
49	0,22	Aa	0,08	Aa	0,06	Aa	13,5	Bb	6,2	Aa
50	0,14	Ba	0,14	Aa	0,09	Aa	13,2	Bb	4,3	Bb
54	0,06	Ba	0,09	Aa	0,05	Ab	6,4	Bb	3,2	Cb
57	0,11	Bb	0,07	Ab	0,04	Ab	12,8	Bb	3,4	Cb
-----Rejeito B2-----										
Controle	0,14	Ba	0,08	Ba	0,06	Ba	8,3	Ab	4,7	Ca
8	0,1	Bb	0,05	Ba	0,04	Ba	7,8	Ab	4,2	Ca
27	0,26	Aa	0,15	Aa	0,11	Aa	10	Aa	7,4	Aa
31	0,1	Bb	0,06	Ba	0,04	Bb	7,5	Aa	3,2	Cb
33	0,08	Bc	0,06	Bb	0,05	Ba	8,5	Ab	4,6	Cb
44	0,23	Aa	0,12	Ba	0,11	Aa	6	Ab	6,1	Ba
45	0,11	Ba	0,05	Ba	0,06	Ba	10,2	Aa	3,5	Ca
49	0,08	Bb	0,05	Bb	0,07	Ba	10,7	Ab	4,3	Cb
50	0,12	Ba	0,04	Ba	0,04	Ba	10,3	Ab	3,7	Cb
54	0,11	Ba	0,05	Ba	0,05	Bb	10,2	Ab	3,7	Cb
57	0,3	Aa	0,15	Aa	0,15	Aa	9,3	Ab	6,1	Ba

Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula, para cada substrato, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Na coluna, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Tabela 9. Continuação

Isolado	Matéria seca total		Matéria seca parte aérea		Matéria seca da raiz		Comprimento raiz		Altura	
	-----Blend-----									
Controle	0,05	Aa	0,03	Aa	0,03	Aa	13,6	Ab	4,1	Ba
8	0,05	Ab	0,02	Aa	0,03	Aa	11	Ab	2,7	Ab
27	0,11	Ab	0,05	Ab	0,06	Ab	13,3	Aa	4,2	Ab
31	0,1	Ab	0,05	Aa	0,04	Ab	13,3	Aa	4,7	Aa
33	0,06	Ac	0,05	Ab	0,04	Aa	12	Ab	4,4	Ab
44	0,11	Ab	0,08	Aa	0,03	Ab	17,8	Aa	4,7	Ab
45	0,09	Aa	0,05	Aa	0,05	Aa	9,8	Aa	3,3	Ba
49	0,06	Ab	0,03	Ab	0,04	Aa	10,3	Ab	4,7	Ab
50	0,06	Aa	0,03	Aa	0,04	Aa	25,3	Aa	4,2	Ab
54	0,09	Aa	0,03	Aa	0,03	Ab	16,9	Aa	4	Ab
57	0,13	Ab	0,06	Ab	0,07	Ab	13	Ab	4,1	Ab
	-----Mix-----									
Controle	0,12	Ba	0,09	Aa	0,03	Aa	25,2	Aa	4,9	Ba
8	0,19	Aa	0,09	Aa	0,09	Aa	19,9	Aa	4,7	Ba
27	0,1	Bb	0,05	Ab	0,04	Ab	18,2	Aa	3,8	Cb
31	0,11	Bb	0,08	Aa	0,04	Ab	11,4	Ba	4,4	Ca
33	0,18	Ab	0,08	Aa	0,06	Aa	21,5	Aa	8	Aa
44	0,1	Bb	0,07	Aa	0,04	Ab	14,8	Ba	4,2	Cc
45	0,08	Ba	0,04	Aa	0,04	Aa	12,8	Ba	3,3	Ca
49	0,19	Aa	0,1	Aa	0,07	Aa	19	Aa	5,9	Ba
50	0,17	Aa	0,13	Aa	0,06	Aa	22,6	Aa	5,4	Ba
54	0,13	Ba	0,09	Aa	0,08	Ab	21,3	Aa	5,4	Ba
57	0,16	Ab	0,1	Aa	0,06	Ab	23,4	Aa	5,3	Ba

Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula, para cada substrato, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade. Na coluna, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.