

**NICOLLY ALVES VIEIRA**

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESPÉCIES FLORESTAIS A PARTIR DA  
TRIAGEM E INOCULAÇÃO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS**

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*.

Orientadora: Cynthia Canedo da Silva

Coorientadores: Maria Catarina M. Kasuya  
Maurício Dutra Costa  
Marliane de Cássia S. da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

V658p  
2021  
Vieira, Nicolly Alves, 1995-  
Promoção de crescimento de espécies florestais a partir da  
triagem e inoculação de consórcios microbianos / Nicolly Alves  
Vieira. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (75 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Orientador: Cynthia Canedo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.157>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Crescimento (Plantas). 2. Micro-organismos do solo.  
3. Fungos micorrízicos. 4. Inoculantes microbianos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 571.2

Bibliotecário(a) responsável: Renata de Fátima Alves CRB6/2578

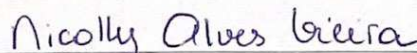
NICOLLY ALVES VIEIRA

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESPÉCIES FLORESTAIS A PARTIR DA  
TRIAGEM E INOCULAÇÃO DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS

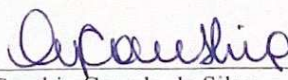
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2021.

Assentimento:



Nicolly Alves Vieira  
Autora



Cynthia Canedo da Silva  
Orientadora

*Dedico esta dissertação aos meus pais, aos  
meus orientadores, aos meus amigos e à  
valorização da ciência no Brasil.*

## AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG por possibilitarem o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação. A Deus, e todas as forças da natureza que regem minha força espiritual e me permitiram concluir o Mestrado em Microbiologia Agrícola.

Aos meus pais, Nina e Francisco, os amores da minha vida, por constituírem minha base firme, doce e sùtil, e por serem minhas raízes as quais eu sempre recorro.

Ao professor Vicente Casali que tanto cuidou do meu equilíbrio energético e compartilhou comigo uma grande amizade, além de ter me apresentado ao Departamento de Microbiologia Agrícola da UFV.

À minha orientadora, Cynthia Canedo da Silva, por todo aprendizado, amparo e confiança, por ter me acolhido e acreditado no meu potencial.

Aos meus coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya, Maurício Dutra Costa e Marliane de Cássia S. da Silva, sempre atentos e disponíveis a me auxiliar.

Às minhas companheiras e companheiros do LAMAP, especialmente Lívia, Deborah, Helena e Larissa, que me receberam com muita disposição e empatia, empenhadas também em me ajudar a contornar os obstáculos enfrentados, e que se tornaram muito importantes na minha vida.

Ao apoio recebido dos meus amigos do LAMIC, e em especial ao Paulo, por ter me guiado e contribuído intensamente nesta pesquisa.

Ao Victor Hugo, Miro e todo apoio vindo do LEM, laboratório ao qual também me senti muito acolhida e amparada.

Às amigas que pude cultivar no LIVM, por todos os apoios e trocas, especialmente ao Roberto, Bruna e Isa.

A todos meus amigos que se dispuseram a pôr as “mãos na terra”: Thiago, Paulo, Momoko, Daniela, Rafaela, Larissa, João Victor, Helena, Lutécia, José Luiz, Enilton.

Aos meus amigos d’O Bloco Viçosa pelo sentimento de pertencimento à Viçosa, que muito me fortalece e revigora.

À cidade de Viçosa e ao Paraíso, por terem sido meu lar durante toda esta pesquisa.

À comunidade Sagrado Corações, por todo acolhimento e amizade e por abrigar aquela que considero minha segunda família: vó Isabel, Solindo, Meira, as crianças e Junio pelo companheirismo e amor envolvido.

## RESUMO

VIEIRA, Nicolly Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Promoção de crescimento de espécies florestais a partir da triagem e inoculação de consórcios microbianos.** Orientadora: Cynthia Canedo da Silva. Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya, Maurício Dutra Costa e Marliane de Cássia S. da Silva.

Em novembro de 2015 ocorreu o rompimento da barragem do Fundão, localizada no distrito de Bento Rodrigues, Mariana-MG. O rompimento da barragem acarretou no derramamento de aproximadamente 50 milhões de m<sup>3</sup> de rejeito de minério de ferro no Rio Doce, afetando grandes áreas de Mata Atlântica, incluindo áreas de preservação permanente associada e cursos d'água que resultou em depósito de lama e assoreamento de rios da bacia do Rio Doce. Nesse contexto, buscou-se mitigar os impactos e favorecer a biodiversidade dos solos afetados pelo rejeito de mineração, e os microrganismos do solo, tais como as PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacterias*) e FMA (Fungos Micorrízicos Arbusculares) são instrumentos que auxiliam na recuperação de áreas degradadas, visto que eles desempenham funções ecossistêmicas importantes no solo. O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos de promoção de crescimento de plantas de isolados de actinobactérias e diazotróficas provenientes de amostras de solo de área afetada pelo rompimento da barragem de rejeito de mineração, a fim de se formular consórcios de PGPR e FMA (*on farm*) a serem testados em três espécies florestais nativas de Mata Atlântica: *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, *Caesalpinia peltophoroides* Benth e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart. Os isolados foram triados *in vitro* quanto à fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e fitohormônios. Foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Luteibacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Ponticoccus*, *Sulfitobacter* e *Kitasatospora*. Dentre os 47 isolados testados, 78 % se apresentaram como fixadoras biológicas de nitrogênio, 40 % foram capazes de realizar solubilização de fosfato, 40 % são produtoras de sideróforos, 6 % produziram AIA, e, por fim, 95 % foram capazes de sintetizar giberelinas a taxas de concentração variando de 0,37 a 3,70 mg mL<sup>-1</sup>. Assim, com base nos melhores resultados para pelo menos 3 dos testes *in vitro*, foram formulados quatro consórcios PGPR: C1, C2, C3 e C4. No experimento *in vivo*, as sementes das espécies florestais foram germinadas e transplantadas para tubetes contendo substrato. As plantas submetidas a tratamento com FMA receberam 10 % de inóculo de FMA (v:v). Após cerca de 15 dias do transplântio para os tubetes foi realizada a inoculação de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> dos consórcios e de isolados bacterianos selecionados diretamente no substrato. As plantas foram

mantidas em casa de vegetação, por 85 dias (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake), 130 dias (*Caesalpinia peltophoroides* Benth) e 280 dias (*Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart). O experimento foi conduzido em delineamento fatorial, PGPR e FMA. Não houve interação entre os fatores, porém todas as espécies florestais testadas responderam positivamente para a inoculação com FMA. As plantas inoculadas com FMA apresentaram aumento de crescimento maior que 50 % em relação à altura, diâmetro e massa seca da parte aérea. Assim, conclui-se que a inoculação com FMA (*on farm*) é uma boa alternativa para estimular o crescimento das espécies testadas.

Palavras-chave: PGPR. FMA. Bioinoculantes.

## ABSTRACT

VIEIRA, Nicolly Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2021. **Growth promotion of forest species from screening and inoculation of microbial consortia.** Adviser: Cynthia Canedo da Silva. Co-advisors: Maria Catarina Megumi Kasuya, Maurício Dutra Costa and Marliane de Cássia S. da Silva.

In November 2015 the Fundão dam, located in the district of Bento Rodrigues, Mariana-MG, broke down. The collapse of the dam resulted in the spillage of approximately 50 million m<sup>3</sup> of iron ore tailings into the Rio Doce, affecting large areas of the Atlantic Forest, including areas of associated permanent preservation and water courses that resulted in mud deposits and siltation of rivers of the Rio Doce basin. In this context, we sought to mitigate the impacts and favor the biodiversity of soils affected by mining tailings and, soil microorganisms, such as PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) and AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) are instruments that help in the recovery of degraded areas, as they perform important ecosystem functions in the soil. The objective of this work was to investigate the mechanisms of plant growth promotion of actinobacteria and diazotrophic isolates from soil samples from an area affected by the collapse of the mining tailings dam, in order to formulate consortia of PGPR and AMF (on farm) to be tested on three Atlantic Forest native forest species: *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, *Caesalpinia peltophoroides* Benth and *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart. The isolates were screened in vitro for biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore and phytohormones production. Were identified as belonging to the genera *Bacillus*, *Luteibacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Ponticoccus*, *Sulfitobacter* and *Kitasatospora*. Among the 47 isolates tested, 78% presented themselves as biological nitrogen fixatives, 40% were able to carry out phosphate solubilization, 40% are siderophore producers, 6% produced AIA, and, finally, 95% were able to synthesize gibberellins at concentration rates ranging from 0.37 to 3.70 mg.mL<sup>-1</sup>. Thus, based on the best results for at least 3 of the in vitro tests, four PGPR consortia were formulated: C1, C2, C3 e C4. In the in vivo experiment, the seeds of forest species were germinated and transplanted into tubes containing substrate. Plants subjected to FMA treatment received 10% FMA inoculum (v:v). About 15 days after transplanting into the tubes, 10<sup>8</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> of the consortia and selected bacterial isolates were inoculated directly into the substrate. The plants were kept in a greenhouse for 85 days (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake), 130 days (*Caesalpinia peltophoroides* Benth) and 280 days (*Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart). The experiment was carried out in a factorial design, PGPR and FMA. There was no

interaction between the factors, but all forest species tested responded positively to inoculation with AMF. Plants inoculated with AMF showed an increase in growth greater than 50% in relation to height, diameter and dry mass of the aerial part. Thus, it is concluded that inoculation with FMA (on farm) is a good alternative to stimulate the growth of the tested species.

Keywords: PGPR. AMF. Bioinoculants.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Abundância relativa de filos, famílias e gêneros de bactérias isoladas de áreas contaminadas com rejeito de mineração, a partir de afiliações taxonômicas com base nas análises parciais do sequenciamento parcial do rRNA 16S dos isolados..... 38
- Figura 2 - Características funcionais mais abundantes encontradas entre os isolados testados: produção de giberelinas (45 isolados), fixação biológica de nitrogênio (37 isolados), produção de sideróforos e solubilização de fosfato (19 isolados) e produção de AIA. .... 39
- Figura 3 - Identificação taxonômica dos potenciais isolados PGPR com seus respectivos mecanismos de promoção de crescimento e constituição dos consórcios formulados (C1, C2, C3 e C4)..... 43
- Figura 4 - Esquema para ilustração dos tratamentos condicionados a cada espécie vegetal, de acordo com os consórcios inoculados e suas cepas PGPR constituintes..... 59
- Figura 5 - *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake com 85 dias de idade sob diferentes tratamentos: A – planta controle, B – inoculada com FMA e C – planta inoculada com consórcio C1 de PGPR..... 61
- Figura 6 - Comparações pareadas de Tukey para o fator FMA e respostas altura, diâmetro e massa seca, em *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, a 95 % de confiança. As médias que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes. .... 62
- Figura 7 - *Caesalpinia peltophoroides* Benth com 130 dias de idade sob diferentes tratamentos: A – planta controle, B – planta inoculada com FMA, C – planta inoculada com C1. ... 63
- Figura 8 - Comparações pareadas de Tukey para o fator FMA e respostas altura, diâmetro e massa seca, em *Caesalpinia peltophoroides* Benth, a 95 % de confiança. As médias que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes. .... 64
- Figura 9 - *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart com 280 dias de idade sob diferentes tratamentos: A – planta controle, B – planta inoculada com C1, C – planta inoculada com FMA. .... 65
- Figura 10 - Comparações pareadas de Tukey para o fator FMA e respostas altura, diâmetro e massa seca, em *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, a 95 % de confiança. As médias que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes. .... 66
- Figura 11 - Nódulos radiculares (setas vermelhas) encontrados em mudas de *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart..... 66
- Figura 12 - Micrografias de raízes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake. A e B: raízes de mudas sem inóculo de FMA, C e D: raízes de mudas inoculadas com FMA. Aumento final de 200X. .... 68

Figura 13 - Micrografias de raízes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. A e B: raízes de mudas sem inóculo de FMA, C e D: raízes de mudas inoculadas com FMA onde se pode observar a presença de possíveis esporos fúngicos (setas vermelhas). Aumento final de 200X. .... 69

Figura 14 - Micrografias de raízes de *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart. A e B: plantas sem inóculo de FMA, C e D: plantas inoculadas com FMA, com emaranhado de hifas (seta laranja) e vesículas (setas brancas), conectadas por hifas (setas verdes). ..... 69

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1S - Identificação e triagem in vitro de bactérias isoladas de áreas contaminadas (Isolados BRBP – Bento Rodrigues Paracatu de Baixo) com rejeito de mineração quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal desempenhados por PGPR. .... 53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA	Ácido Indol-Acético
AM	<i>Arbuscular mychorriza</i>
AMF	<i>Arbuscular Mycorrhizal Fungi</i>
ANOVA	Análise de Variância
BFN	Bactérias Fixadoras de Nitrogênio
BRPB	Bento Rodrigues Paracatu de Baixo
CAS	<i>Chrome Azurol S</i>
C1	Consórcio 1
C2	Consórcio 2
C3	Consórcio 3
C4	Consórcio 4
DO	Densidade Óptica
FAA	Formaldeído Ácido Acético Álcool
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
ES	Eficiência de Solubilização
NBRIP	<i>National Botanical Research Institute's phosphate</i>
PGPR	<i>Plant growth promoting rhizobacterias</i>
rRNA	RNA ribossomal
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias

## LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
CAPÍTULO 1 .....	18
Revisão de literatura .....	18
1.Desastre socioambiental de Mariana-MG .....	18
2.Microrganismos do solo .....	19
2.1. <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> (PGPR) .....	19
2.2. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) .....	22
3.Espécies florestais nativas de Mata Atlântica.....	23
4.Referências Bibliográficas.....	25
CAPÍTULO 2 .....	33
Identificação taxonômica e triagem de cepas de PGPR ( <i>Plant growth-promoting rhizobacterias</i> ) isoladas de solo atingido por rejeito de minério de ferro proveniente do rompimento da Barragem de Fundão-MG.....	33
1.Introdução.....	33
2.Material e Métodos.....	33
2.1. Identificação taxonômica e análise filogenética dos isolados bacterianos .....	34
2.2. Fixação biológica de nitrogênio .....	35
2.3. Solubilização de fosfato.....	35
2.4. Produção de sideróforos .....	35
2.5. Quantificação de ácido-indol-3-acético (AIA) .....	36
2.6. Quantificação de giberelina .....	36
2.7. Formulação dos consórcios de PGPR.....	36
2.8. Análises estatísticas .....	36
3.Resultados e Discussão.....	37
3.1. Identificação taxonômica dos isolados .....	37
3.2. Triagem <i>in vivo</i> dos isolados quanto aos mecanismos de PGPR .....	38
3.3. Formulação dos consórcios microbianos de PGPR .....	42
4.Conclusões.....	44
5.Referências bibliográficas .....	45
6.Material Suplementar .....	53
CAPÍTULO 3 .....	56
Inoculação de consórcios de PGPR ( <i>Plant growth promoting rhizobacteria</i> ) e FMA (fungos micorrízicos arbusculares) para a promoção de crescimento de espécies florestais nativas de Mata Atlântica .....	56

1.Introdução.....	56
2.Material e Métodos.....	57
2.1. Preparo das sementes e manutenção do experimento <i>in vivo</i> .....	57
2.2. Preparo do substrato com e sem inóculo de FMA.....	58
2.3. Preparo dos inoculantes PGPR.....	58
2.4. Delineamento do experimento em casa de vegetação.....	58
2.5. Determinação dos parâmetros de crescimento.....	59
2.6. Análise de colonização micorrízica.....	60
2.7. Análises estatísticas.....	60
3.Resultados e Discussão.....	61
3.1. Crescimento das plantas inoculadas com os consórcios (FMA e PGPR).....	61
3.2. Avaliação da colonização micorrízica.....	68
4.Conclusões.....	70
5.Referências Bibliográficas.....	71
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

## INTRODUÇÃO

Em 5 de novembro de 2015, no distrito de Paracatu de Baixo, localizado em Mariana-MG, ocorreu o rompimento da Barragem do Fundão, pertencente à mineradora Samarco Mineração S/A. Este desastre ambiental culminou na liberação de cerca de 50 milhões de m<sup>3</sup> de rejeito de mineração na bacia do Rio Doce, destruindo grandes áreas de Mata Atlântica, matas ciliares e ocasionando muitos outros danos socioambientais. As tragédias envolvendo o rompimento de barragens de mineração, têm se tornado recorrentes. Dentre elas, pode-se citar também o rompimento da barragem B1-Vale, localizada em Brumadinho – MG.

A Mata Atlântica é um dos maiores biomas de ecossistemas tropicais, sendo um *hotspot* de biodiversidade e conservação no mundo. No Brasil, apresenta uma ampla distribuição dentre as planícies costeiras do Oceano Atlântica e o interior das regiões. Devido à intensa devastação durante a ocupação humana, assim como a exploração de recursos, a Mata Atlântica é considerada ameaçada, apresentando menos de 16 % de sua área original. Sendo assim, é de extrema relevância a inserção de soluções e alternativas para a recuperação e manutenção deste bioma.

Os microrganismos representam a maior parte da biodiversidade do solo e, devido às suas funções relacionadas ao funcionamento dos ciclos biogeoquímicos, incluindo decomposição, mineralização da matéria orgânica e disponibilização de nutrientes, são potentes bioindicadores da qualidade do solo e podem atuar como promotores do crescimento de plantas. Dentre os principais grupos funcionais de microrganismos do solo, destacam-se as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (*Plant growth promoting rhizobacteria* – PGPR) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA).

As PGPR são bactérias que colonizam a área de influência rizosférica e podem manter simbioses com as mesmas. A partir desta relação de simbiose, as PGPR são capazes de fornecer nutrientes às plantas, por diversos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, enquanto as plantas disponibilizam fotossintatos para esses microrganismos. Os mecanismos de promoção de crescimento de plantas desempenhados pelas PGPR se enquadram em dois grupos: a) diretos: fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos, solubilização de fosfato e produção de fitohormônios; b) indiretos: relacionados ao aumento da resistência das plantas a fitopatógenos.

Os fungos micorrízicos arbusculares estão amplamente distribuídos no solo. Nesta simbiose, as plantas fornecem fotossintatos como fontes de carbono para os fungos, e estes promovem o crescimento das plantas a partir da disponibilização de nutrientes, estimulação de

resistência e tolerância a estresses ambientais. Nessa associação simbiótica ocorre a formação de estruturas de troca entre os fungos e as raízes das plantas, denominadas de simbiossomas – arbúsculos.

Tendo em vista a potencialidade desses microrganismos na promoção do crescimento de plantas, eles podem ser selecionados e utilizados como inoculantes para a produção de mudas de boa qualidade a serem implementadas na revegetação de áreas degradadas. Uma das principais estratégias aplicadas nestes programas de recuperação é a utilização de mudas de espécies nativas, visando reestabelecer e conservar a biodiversidade daquelas áreas. Espécies como *Caesalpinia peltophoroides* Benth, *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, são de grande interesse, por serem nativas de Mata Atlântica e pioneiras em áreas degradadas.

Assim, este trabalho foi desenvolvido em três capítulos. O primeiro capítulo trata de uma revisão de literatura acerca de microrganismos do solo, PGPR e FMA e a utilização destes microrganismos para a promoção do crescimento de espécies nativas florestais de Mata Atlântica, visando a recuperação deste bioma. O capítulo 2 teve como objetivos realizar a identificação e triagem de cepas de PGPR isoladas de solo atingido por rejeito de mineração quanto aos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e fitohormônios e formular consórcios microbianos de PGPR. E, seguidamente, no capítulo dois objetivou-se avaliar o efeito da inoculação de FMA e PGPR, isoladamente ou combinados, em mudas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth, *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, a fim de se obter formulações de inoculantes que possam contribuir na produção de mudas de espécies florestais a serem aplicadas na recuperação de áreas degradadas.

## **CAPÍTULO 1**

### **Revisão de literatura**

#### **1. Desastre socioambiental de Mariana-MG**

O início da mineração no Brasil data do começo do século XVII e atualmente contribui com 1,4 % do PIB (IBGE, 2019). Mas foi no século XXI que ocorreu o maior avanço e crescimento da exploração de minérios no continente latino-americano, com o Brasil ocupando a posição de principal exportador de minérios (MAM, 2018). No entanto, além da movimentação da economia, seja pelas exportações minerais ou pela geração de empregos, também é relatado a grande produção de rejeitos que são acumulados em barragens e que representam riscos ambientais. Nos últimos 34 anos em Minas Gerais foram relatados sete acidentes envolvendo a mineração e cerca de 40 barragens funcionando de maneira instável com capacidade total (Cordeiro et al., 2019; Lacaz et al., 2017).

Nesse cenário, no dia 05 de novembro de 2015, a barragem do Fundão, localizada no rio Gualaxo do Norte, distrito de Bento Rodrigues pertencente a Mariana-MG, rompeu-se resultando na liberação de, aproximadamente, 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos de minério na Bacia do rio Doce (Cordeiro et al., 2019; IBAMA, 2015). A mineradora responsável denominada Samarco era subsidiária da Vale AS e BHP Billiton Brasil Ltda. Esse foi considerado o maior desastre ambiental mundial desde 1960, visto que afetou atividades de subsistência e ocasionou impactos que se estenderam por 650 km de rios, comprometendo o abastecimento de água e as atividades de subsistência de milhões de habitantes de cidades dependentes da bacia do rio Doce, além da destruição de povoados próximos à mineradora e da morte de 19 pessoas (Lacaz et al., 2017; Zhouri et al., 2017; Freitas et al., 2016; Milanez et al., 2016; ANA, 2015).

A onda de lama com rejeitos de minério destruiu grandes áreas de Mata Atlântica, estimadas em até 1199 ha, causando grandes danos às áreas ciliares. A sedimentação dos rejeitos da mineração dificulta a infiltração de água no solo e a deposição de matéria orgânica, que são quesitos necessários para os processos que envolvem o desenvolvimento das plantas, até mesmo a nível de germinação de sementes (SOS Mata Atlântica et al., 2017; Embrapa, 2015). O rejeito de minério de ferro da barragem do Fundão apresenta altos teores de silte, de ferro, areia muito fina e alta capacidade de retenção de metais pesados, fatores que dificultam o crescimento das plantas (Cordeiro et al., 2019). Então, como solução para esta limitação do crescimento, Silva Cruz et al. (2020), demonstraram que a fertilização mineral, utilizando o fertilizante “Osmocote”, foi capaz de reverter o efeito limitante dos rejeitos e pode ser

considerada alternativa visando ao melhor crescimento inicial das plantas e posterior desenvolvimento.

## **2. Microrganismos do solo**

Os microrganismos desempenham funções relevantes para o funcionamento dos ecossistemas e na manutenção dos ciclos biogeoquímicos, auxiliando na decomposição e mineralização da matéria orgânica presente no solo (Teixeira et al., 2019; Doran and Parkin, 1994). No entanto, atividades humanas como a mineração comprometem a estabilidade funcional e a diversidade microbiana do solo. Alguns estudos evidenciaram que a comunidade microbiana tende a ser mais ativa e abundante, pois ocorre aumento na diversidade de exsudatos das raízes, que se tornam substratos para diferentes microrganismos (Prado et al., 2019; Pihlap et al., 2019; Venson et al., 2017; Grayston et al., 2004; Butler et al., 2003). Além disso, atributos microbiológicos podem ser utilizados como bioindicadores sensíveis que respondem a mudanças na cobertura do solo e podem auxiliar no monitoramento dos impactos socioambientais decorrentes da mineração (Silva et al., 2018).

Alguns microrganismos nativos desses ambientes, por desempenharem funções biológicas importantes como a ciclagem de nutrientes e o aumento da disponibilidade de nutrientes, podem ser utilizados como bioinoculantes para a produção de mudas florestais a serem destinadas aos processos de recuperação ambiental. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (*Plant growth promoting rhizobacterias* – PGPR) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA), podem ser selecionados para auxiliarem no processo de revegetação, podendo ser utilizados como inoculantes para a promoção de crescimento das espécies utilizadas na recuperação das áreas degradadas (Castro et al., 2017).

### **2.1. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR)**

A rizosfera é a área do solo ao redor do sistema radicular da planta e constitui-se como um ambiente rico em nutrientes provenientes dos exsudatos das plantas, o que resulta em atividade microbiana mais alta (Ahemad et al., 2014). As bactérias que habitam a rizosfera e que mantêm simbioses com as plantas e são capazes de promover o crescimento das mesmas, são coletivamente nomeadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR - *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) (Castro et al., 2017). Ao mesmo tempo em que as bactérias promovem o crescimento das plantas, elas obtêm dessas os nutrientes necessários para sua

atividade, a exemplo de ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos e outras moléculas importantes (Panizzon et al., 2016). A promoção de crescimento ocorre por meio de mecanismos que relacionam a disponibilização de nutrientes como fosfato e nitrogênio, bem como podem realizar a produção de fitormônios, a exemplo de auxinas e giberelinas, produção de sideróforos e agentes antimicrobianos contra fitopatógenos (Vessey, 2003).

O nitrogênio é um dos mais importantes elementos para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Apesar de representar 78 % dos gases atmosféricos, sob a forma de  $N_2$ , esta forma não é biodisponível para utilização direta pelas plantas (Ahemad & Kibret, 2014). Portanto, o  $N_2$  atmosférico necessita ser convertido em formas utilizáveis, seja por processos industriais levando à produção de fertilizantes químicos, ou alternativamente, por bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) (Singh et al., 2019). Na síntese química, a amônia é produzida pelo processo Haber-Bosch a partir de dinitrogênio e hidrogênio gasosos que, na presença de um catalisador de ferro e sob alta temperatura e pressão, são convertidos em amônia que será a base de fertilizantes químicos, porém, este processo é bastante oneroso (Rubio & Ludden, 2008). Alternativamente, no processo de fixação biológica de nitrogênio, as bactérias convertem o  $N_2$  a  $NH_3$  pelo complexo enzimático conhecido como nitrogenase (Kim e Rees, 1994). Assim algumas bactérias são capazes de fixar nitrogênio em raízes de plantas leguminosas (Fabaceae), quando formam nódulos radiculares, tais bactérias são genericamente chamadas de rizóbio (Zahir et al., 2019; Holguin et al., 1999; Burris & Wilson, 1945). Os processos de mineralização e ciclagem de nutrientes dos resíduos vegetais ricos em nitrogênio provenientes das plantas associadas aos rizóbios são favorecidos, aumentando os teores de matéria orgânica do solo e auxiliando na recuperação de solos degradados. Assim, as bactérias fixadoras de N podem favorecer programas de revegetação (Giannini et al., 2017; Ferreira et al., 2012; Siqueira et al., 2007).

O fósforo (P) é o segundo elemento mais importante para o crescimento das plantas. No solo, o fósforo está presente em formas orgânicas, como fosfato de inositol, fosfonésteres e fosfotriésteres, ou em formas inorgânicas, formando fosfatos de Fe, Al e Ca (Etesami & Maheshwari, 2018; Khan et al., 2007). Mesmo que esteja presente em abundância nos solos, em solos intemperizados e ricos em argila, a maior parte do P é encontrado em formas indisponíveis para as plantas e, para suprir a demanda vegetal, a aplicação de fertilizantes fosfáticos é a prática mais comum, sendo que parte do fósforo aplicado é perdido em formas insolúveis (Gouda et al., 2018; Bhattacharyya e Jha, 2012; McKenzie e Roberts, 1990). Alternativamente, algumas bactérias representam biofertilizantes promissores por serem

capazes de produzir ácidos orgânicos, de baixo peso molecular, que realizam a solubilização do fosfato inorgânico ou por atuarem na mineralização do fósforo inorgânico por meio da síntese de enzimas fosfatases, que catalisam a hidrólise dos ésteres fosfóricos, deixando o fósforo biodisponível. Além disso, as bactérias solubilizadoras de fosfato também potencializam o crescimento das plantas por estímulos na eficiência da fixação biológica de nitrogênio e síntese de moléculas importantes, como auxinas e giberelinas, na promoção do crescimento das plantas (Glick, 2012; Zaidi et al., 2009; Ahmad et al., 2008).

O ferro é o quarto elemento mais abundante na Terra, sendo vital para quase todas as formas de vida. Esse elemento existe predominantemente sob a forma de íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que é moderadamente solúvel no ambiente aeróbico devido à formação de hidróxidos e oxihidróxidos insolúveis. Para suprir a demanda de ferro, as plantas e bactérias sintetizam moléculas de baixa massa molecular, conhecidas como sideróforos, que são capazes de se ligar ao ferro, facilitando a sua absorção (Olanrewaju et al., 2017; Raikumar et al., 2010; Hider e Kong, 2010). Em um contexto de estresse ambiental, a captação de ferro pelos sideróforos bacterianos é ainda mais importante para as plantas, por serem capazes de aliviar as tensões geradas pela presença de altos níveis de metais no solo, sendo capazes de se complexar, de forma estável ao Al e metais pesados como Cd, Pb, Cu, entre outros (Kong & Glick, 2017; Neubauer et al., 2000; Burd et al., 2000).

Em resposta às condições ambientais, as plantas apresentam desenvolvimento mediados por hormônios vegetais de ocorrência natural, tais como o ácido indol-acético (AIA) e giberelinas. As giberelinas são ácidos tetracíclicos diterpenóicos frequentemente sintetizados por bactérias da rizosfera. Este hormônio influencia a germinação de sementes, desenvolvimento de frutos, flores, mudas, crescimento de caules, folhas e emergência de brotos (Herrera-Quiterio, 2020; Bilal et al., 2018). O AIA afeta vários fatores relacionados à diferenciação celular da planta, tais como o aumento das dimensões da superfície radicular, facilitando o acesso da planta aos nutrientes do solo, estimula a germinação de sementes, impulsiona o desenvolvimento da raiz e do xilema, medeia respostas em relação à incidência de luz, gravidade, florescência, influencia o processo de fotossíntese e produção de pigmentos e induz a produção de metabólitos e respostas a estresses ambientais (Spaepen & Vanderleyden, 2011; Tsavkelova et al., 2006; Kamnev, 1998). Este hormônio é sintetizado por diversas cepas de PGPR, sendo liberado como metabólito secundário na rizosfera (Nieto-Jacobo et al., 2017). Além desses processos relacionados ao melhoramento do crescimento das raízes, o AIA apresenta-se como precursor

metabólico do ácido antranílico, que é capaz de solubilizar redutivamente o  $\text{Fe}^{3+}$ , aumentando a absorção de ferro pela planta (Mishra et al., 2020; Glick, 2012).

## 2.2. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são organismos cosmopolitas do solo e das raízes das plantas, formando com elas a associação simbiótica mais comum entre microrganismos e plantas, a micorriza arbuscular (AM) (Powell et. al, 2018). Nesta associação, os fungos auxiliam no crescimento das plantas disponibilizando nutrientes, enquanto as plantas fornecem aos fungos fontes de carbono a partir de carboidratos e ácidos graxos. Além de atuarem na disponibilização de nutrientes, os FMA estimulam a resistência e tolerância das plantas ao estresse, e afetam a estrutura e fertilidade do solo (Tang et. al, 2016). Atualmente, estão inseridos no filo Glomeromycota, distribuídos entre as classes: Archaeosporomycetes, Glomeromycetes and Paraglomeromycetes, entre as ordens: Archaeosporales, Diversisporales, Gigasporales, Glomerales e Paraglomerales, apresentando 16 famílias, 40 gêneros e mais de 300 espécies (Andrade et al. 2017; Błaszowski et al. 2017; Goto & Jobim 2017).

A formação da associação micorrízica requer amplas vias de sinalização, incluindo a liberação de exsudatos vegetais na rizosfera para a estimulação da atividade microbiana dos FMA (Kretschmar et al., 2012). A partir do estabelecimento da associação micorrízica, evidências microscópicas demonstram que esta associação ocorre por meio de simbiossomas, como arbúsculos que atuam como interface nutricional entre os FMA e a planta hospedeira, e estruturas de armazenamento, como vesículas (Paszowski et al., 2013). As células com arbúsculos expressam diversos transportadores de nutrientes específicos e exclusivos da simbiose, tais como os transportadores de fosfato, mediando na solubilização deste nutriente pela planta (Maclean et al., 2017). Outros transportadores de nutrientes também são induzidos nas raízes micorrízicas, sugerindo que elementos como nitrogênio, enxofre e micronutrientes, a exemplo de cobre e zinco, também podem ser transferidos a partir dos arbúsculos (Wang et al., 2017).

Além das características relacionadas à disponibilização de nutrientes, os FMA afetam a defesa das plantas e a resistência a doenças. Ainda que os mecanismos de defesa da planta estejam atenuados para permitir o estabelecimento fúngico pelos FMA pela colonização das raízes, a resistência geral das plantas em associação micorrízica é aumentada, e este efeito é sistêmico, agindo toda planta (Cameron, 2013). Esta melhoria pode ser explicada pelo beneficiamento da saúde da planta devido às melhores condições nutricionais, devido à indução

sistêmica do estado de defesa, pelo mecanismo de resistência sistêmica adquirida, ou pela liberação de compostos antimicrobianos ou competição direta por espaço e recursos (Solaiman et al., 2014). Portanto, a depender das condições ambientais, as plantas podem se beneficiar de forma relevante pela presença dos fungos micorrízicos arbusculares, possibilitando sobreviverem em condições de deficiência de nutrientes minerais e sob condições de estresse abiótico e biótico (Jakobsen & Hammer, 2015).

Os inóculos de FMA podem ser produzidos por diversos métodos, mas o método *on farm* se destaca por evitar investimentos relacionados a etapas de processamento envolvendo o isolamento do FMA, mistura com substrato de transporte, bem como o transporte e o manuseio, sendo vantajoso o enriquecimento com FMA indígenas, já adaptados aquele local (Moreira et al., 2019; Schlemper & Sturmer; 2014; Gaur et al., 2000). A produção *on farm* de FMA é realizada através de uma coleta de amostra de solo contendo FMA indígenas daquele local, que serão os potenciais inóculos fúngicos, que serão propagados em uma mistura de substrato contendo vermiculita e bagaço de cana, ou resíduos vegetais disponíveis. Após essa distribuição, as sementes das plantas hospedeiras são semeadas e cobertas com uma fina camada de substrato, com constante irrigação. Dada a germinação das sementes, as plantas são submetidas a irrigação de acordo com a necessidade ou por ação da chuva. Por fim, as plantas devem passar por um período de 30 a 90 dias de escassez de água (estresse hídrico), para estimular a multiplicação dos esporos fúngicos (Prates Júnior et al., 2021; Chen et al., 2018; Lee et al., 2008; Douds Jr et al., 2006).

Dados os vários benefícios da presença de FMA, estes agentes podem ser utilizados a fim de se desenvolver fórmulas inoculantes para sua aplicação comercial. A aplicação de inóculos de FMA beneficia a saúde e o rendimento das plantas, assim como auxiliam na melhoria da saúde do solo (Hijiri, 2016).

### **3. Espécies florestais nativas de Mata Atlântica**

O plantio de mudas de espécies nativas é extremamente importante por reduzir o impacto ambiental causado pela devastação da vegetação e por auxiliar na recuperação e conservação da biodiversidade (Giannini et al., 2017). Espécies florestais como *Caesalpinia peltophoroides* Benth., *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, são nativas da Mata Atlântica e são bastante visadas nos processos de

reflorestamento, por serem uma das primeiras espécies a surgirem em áreas degradadas (Cunha et al., 2013).

*Caesalpinia peltophoroides* (Fabaceae, Caesalpinioideae), conhecida popularmente como sibipiruna é amplamente encontrada em todas as regiões do Brasil. Essa espécie é considerada como secundária inicial ou pioneira, capaz de alcançar alturas de até 16 m, cujas folhas são compostas bipinadas e florescem no final de agosto a meados de novembro produzindo muitas flores amarelas (Cunha et al., 2005). É uma espécie que apresenta propriedades medicinais, relacionadas à presença de compostos fenólicos, antioxidantes, produção de substâncias analgésicas, antiinflamatórias e adstringentes. Além disso, a sua madeira pode ser utilizada para a construção civil e pode ser cultivada em parques e jardins, devido a sua copa aberta com muitos ramos, gerando sombreamento, o que favorece o seu uso no reflorestamento (Pusztahelyi et al., 2015; Lorenzi, 2009).

A espécie *Schizolobium parahyba* (Fabaceae, Caesalpinioideae) é nativa das regiões Sul e Sudeste do Brasil que apresenta rápido crescimento e potencial para plantios florestais nesta região. Sua espécie também é conhecida como bacuru, bageiro, pau-de-canoa, paricá, pataqueira, pau-de-tambor e pau-vintém. Essa árvore geralmente atinge de 10 a 25 m de altura, mas pode chegar até 40 m (Caron et al., 2010). Devido às suas poucas exigências em relação a condições edáficas, encontra boas condições de sobrevivência na região da Mata Atlântica e da floresta amazônica (Lorenzi, 2003; Reitz et al., 1978). Sua madeira também pode ser utilizada na fabricação de móveis, formas de concreto, caixotaria, caixas, pranchetas, palitos e canoas (Gomes et al., 2021; Leonard, 2016).

A espécie *Albizia niopoides* (Fabaceae, Caesalpinioideae) é relatada como pioneira, secundária inicial, ou secundária tardia (Carvalho, 2009). A sua ocorrência é ampla para a maioria dos estados brasileiros, com distribuição no interior de florestas primárias densas e em formações abertas, podendo atingir de 8 a 20 m de altura (Ruschel et al., 2003; Lorenzi, 1994). Além de sua utilidade como espécie madeireira e para produção de papel, é uma espécie muito visada em programas de reflorestamento heterogêneo destinado a recuperação e preservação de áreas degradadas, por ser uma espécie nativa de Mata Atlântica (Afonso et al., 2017).

Dada a codependência entre plantas e microrganismos, a sucessão microbiana durante o processo de revegetação é capaz de promover a restauração de solos afetados por rejeito de mineração, dado que os microrganismos do solo contribuem para a manutenção da diversidade, de seus serviços ecossistêmicos e da produtividade em ecossistemas terrestres (Prado et al., 2019; Jordão et al., 2021). Produtos microbiológicos podem ser utilizados na otimização da

germinação de sementes e melhoria do crescimento de espécies nativas, a fim de se obter melhorias na qualidade das mudas e a redução dos custos de produção (Cunha et al., 2013). Tendo em vista os diversos mecanismos de promoção de crescimento desempenhados pelas PGPR, a formulação de um consórcio destes microrganismos e a inoculação em espécies vegetais de crescimento rápido, representa potencial alternativa para a melhoria da qualidade de mudas destas espécies nativas de Mata Atlântica a serem aplicadas na recuperação de solos degradados (Moura et al., 2016).

#### 4. Referências Bibliográficas

AFONSO, M. V. et al. Parâmetros fisiológicos de mudas de *Albizia niopoides* produzidas em diferentes composições de substrato. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 4, p. 1395-1402, 2017.

AHMAD, M. et al. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2992, 2018.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.

ANA, 2015. Encarte especial sobre a bacia do rio Doce: rompimento da barragem em Mariana / MG.

ANDRADE, Z. et al. *Scutellospora tepuiensis* sp. nov. from the highland tepuis of Venezuela. **Mycotaxon**, v. 132, n. 1, p. 9-18, 2017.

BHATTACHARYYA, P. N; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BILAL, L. et al. Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 117-127, 2018.

BŁASZKOWSKI, J. et al. A new family, Pervetustaceae with a new genus, Pervetustus, and *P. simplex* sp. nov. (Paraglomerales), and a new genus, Innospora with *I. majewskii* comb. nov. (Paraglomeraceae) in the Glomeromycotina. **Nova Hedwigia**, v. 105, n. 3-4, p. 397-410, 2017.

BRASIL, C. dos D. Ministério Público Federal. **Ação Civil Pública com Pedido de Liminar Inaudita Altera Pars**. Disponível em: < <http://www.mpf.mp.br/mg/sala-de-imprensa/docs/acpsamarco>>. Acesso em, v. 4, 2016.

BUTLER, J. L. et al. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 11, p. 6793-6800, 2003.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 237-245, 2000.

BURRIS, R. H.; WILSON, P. W. Biological nitrogen fixation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 14, n. 1, p. 685-708, 1945.

CAMERON, D. D. et al. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts?. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 10, p. 539-545, 2013.

CARVALHO, P. E. R. Farinha Seca - *Albizia niopoides*. **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

CARON, B. O. et al. Crescimento em viveiro de mudas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) SF Blake. submetidas a níveis de sombreamento. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 4, p. 683-689, 2010.

CASTRO, J. L. de et al. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017.

CHEN, M. et al. Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi—from ecology to application. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1270, 2018.

CORDEIRO, M. C. et al. Insights on the freshwater microbiomes metabolic changes associated with the world's largest mining disaster. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 1209-1217, 2019.

CUNHA, J. de F. et al. Epotential of rhizobacterias for the growth of seedlings of sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). **Revista Árvore**, v. 37, n. 2, p. 211-218, 2013.

CUNHA, J. de F. et al. Rizobacterização no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). 2005.

DOUDS JR, D. D. et al. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 809-818, 2006.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**, v. 35, p. 1-21, 1994.

Embrapa, Avaliação dos impactos causados ao solo pelo rompimento de barragem de rejeito de mineração em Mariana, MG: Apoio ao plano de recuperação agropecuária (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2015).

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 156, p. 225-246, 2018.

FERREIRA, P. A. A. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 85-95, 2012.

FREITAS, C. M. de; SILVA, M. A. da; MENEZES, F. C. de. O desastre na barragem de mineração da Samarco: fratura exposta dos limites do Brasil na redução de risco de desastres. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 3, p. 25-30, 2016.

GAUR, A. et al. On-farm production of VAM inoculum and vegetable crops in marginal soil amended with organic matter. **Tropical Agriculture**, v. 77, n. 1, p. 21-26, 2000.

GIANNINI, T. C. et al. Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. **Austral Ecology**, v. 42, n. 5, p. 510-521, 2017.

GOMES, M. L. F. et al. Suitable environmental areas for commercial timber in the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Environment, Development and Sustainability*, p. 1-17, 2021.

GOTO, B. T.; JOBIM, K. Laboratório de Biologia de Micorrizas. **Available in: [www.glomeromycota.wix.com/lbmicorrizas](http://www.glomeromycota.wix.com/lbmicorrizas)**, 2017.

GOUDA, S. et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131-140, 2018.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

- GRAHAM, S. W.; LAM, V. KY; MERCKX, V. SFT. Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes. **New Phytologist**, v. 214, n. 1, p. 48-55, 2017.
- GRAYSTON, S. J. et al. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. **Applied Soil Ecology**, v. 25, n. 1, p. 63-84, 2004.
- HERRERA-QUITERIO, A. et al. Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. **Revista Argentina de Microbiología**, 2020.
- HIDER, R. C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 5, p. 637-657, 2010.
- HIJRI, M. Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. **Mycorrhiza**, v. 26, n. 3, p. 209-214, 2016.
- HOLGUIN, G. et al. **Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria**. World Scientific, 1999.
- IBGE, Taxa acumulada em quatro trimestres [em relação ao mesmo período do ano anterior (%)]. Elaboração IBRAM Maio/2019. Disponível em: <http://portaldamineracao.com.br/ibram/wp-content/uploads/2019/07/relatorio-anaul-2018-2019.pdf>
- IBAMA, 2015. Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais.
- IBAMA, 2016. **Relatório Fase Argos. Operação Águas** at: [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias\\_ambientais/relatorio\\_fase\\_argos\\_operacao\\_augias.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias_ambientais/relatorio_fase_argos_operacao_augias.pdf)
- JAKOBSEN, I.; HAMMER, E. C. Nutrient dynamics in arbuscular mycorrhizal networks. In: **Mycorrhizal Networks**. Springer, Dordrecht, 2015. p. 91-131.
- KAMNEV, A. A. Reductive solubilization of Fe (III) by certain products of plant and microbial metabolism as a possible alternative to siderophore secretion. In: **Doklady Biophysics**. New York: Consultants Bureau, c1965-c2000., 1998. p. 48-51.
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n. 1, p. 29-43, 2007.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389-397, 1994.

KONG, Z.; GLICK, B. R. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. In: **Advances in Microbial Physiology**. Academic Press, 2017. p. 97-132.

KRETZSCHMAR, T. et al. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 341-344, 2012.

LACAZ, F. A. de C.; PORTO, M. F. de S.; PINHEIRO, T. M. M. Tragédias brasileiras contemporâneas: o caso do rompimento da barragem de rejeitos de Fundão/Samarco. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

LEE, S. et al. Effects of Organic Farming on Communities of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Mycobiology**, v. 36, n. 1, p. 19-23, 2008.

LEONARD, C. S. Espécies alternativas usadas em florestas plantadas. (MBA's Thesis) Universidade Federal do Paraná, Brazil. <https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/54021/R%20-%20E%20-%20CLAUDIA%20SALGADO%20LEONARD.pdf?sequence=1>, 2016.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v.3. 286p.

LORENZI, H. **Árvores Exóticas no Brasil: Madeireiras, Ornamentais e Aromáticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003.

MACLEAN, A. M.; BRAVO, A.; HARRISON, M. J. Plant signaling and metabolic pathways enabling arbuscular mycorrhizal symbiosis. **The Plant Cell**, v. 29, n. 10, p. 2319-2335, 2017.

MAM, 2018. Movimento pela Soberania Popular na Mineração. Disponível em: <<https://mamnacional.org.br/2018/02/24/barcarena-e-fundao-a-necessidade-urgente-de-regulacao-das-mineradoras/>>, acessado em 22 de abril de 2020.

MAM, 2020. Movimento pela Soberania Popular na Mineração. Disponível em: <<https://mamnacional.org.br/2020/01/24/crime-da-vale-em-brumadinho-completa-um-ano-com-272-mortes-e-11-pessoas-nao-localizadas/>>, acessado em 22 de abril de 2020.

MCKENZIE, R. H.; ROBERTS, T. L. Soil and fertilizers phosphorus update. In: Proceedings of Alberta soil science workshop proceedings, Feb. 1990. p. 20-22.

MILANEZ, B. et al. Antes fosse mais leve a carga: reflexões sobre o desastre da Samarco/Vale/BHP Billiton. **Editorial Iguana, Marabá, Brazil**, 2016.

MILANEZ, B. et al. Antes fosse mais leve a carga: avaliação dos aspectos econômicos, políticos e sociais do desastre da Samarco/Vale/BHP em Mariana (MG). **Belo Horizonte: Poemas**, 2015.

MISHRA, A. et al. Plant-Microbe Interactions for Bioremediation and Phytoremediation of Environmental Pollutants and Agro-ecosystem Development. In: **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**. Springer, Singapore, 2020. p. 415-436.

MOREIRA, B. C. et al. Effect of inoculation of pineapple plantlets with arbuscular mycorrhizal fungi obtained from different inoculum sources multiplied by the on-farm method. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, 2019.

MOURA, G. G. D. de et al. Rhizobia isolated from coal mining areas in the nodulation and growth of leguminous trees. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, 2016.

NEUBAUER, U. et al. Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. **International Journal of Phytoremediation**, v. 2, n. 4, p. 353-368, 2000.

NIETO-JACOBO, M. F. et al. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 102, 2017.

OLANREWaju, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 197, 2017.

OLIVEIRA PRADO, I. G. de et al. Revegetation process increases the diversity of total and arbuscular mycorrhizal fungi in areas affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 141, p. 84-95, 2019.

PANIZZON, J. P. et al. Bacteria-soil-plant interaction: this relationship to generate can inputs and new products for the food industry. **Rice Research: Open Access**, 2016.

PASZKOWSKI, U.; GUTJAHR, C. Multiple control levels of root system remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 204, 2013.

- PIHLAP, E. et al. Initial soil formation in an agriculturally reclaimed open-cast mining area- the role of management and loess parent material. **Soil and Tillage Research**, v. 191, p. 224-237, 2019.
- POWELL, J. R.; RILLIG, M. C. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1059-1075, 2018.
- PRATES JÚNIOR, P. (Coord). Micorrizas arbusculares: conceitos, metodologias e aplicações. 1. ed. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Núcleo Regional Leste, Minas Gerais, 2021.
- PUSZTAHELYI, Tünde; HOLB, Imre J.; PÓCSI, István. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 573, 2015.
- RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142-149, 2010.
- REITZ, R. et al. **Projeto Madeira de Santa Catarina**. Itajaí, 1978.
- RUBIO, Luis M.; LUDDEN, Paul W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, 2008.
- SANTOS, J. V. dos et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6735-6748, 2016.
- SCHLEMPER, T. R.; STÜRMER, S. L. On farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 8, p. 571-580, 2014.
- SILVA, A. O. et al. Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 142-151, 2018.
- SILVA CRUZ, F. V. da et al. Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 110021, 2020.
- SIQUEIRA, J. O. et al. Micorrizas e degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 5, p. 219-305, 2007.
- SINGH, D. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Functions and Benefits. In: **Microbial Interventions in Agriculture and Environment**. Springer, Singapore, 2019. p. 205-227.
- SOLAIMAN, Z. M. et al. (Ed.). **Mycorrhizal Fungi: Use in Sustainable Agriculture and Land Restoration**. Heidelberg: Springer, 2014.

SOS Mata Atlântica, INPE, Arcplan, 2017. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2015–2016, Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto de Pesquisas Espaciais.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011.

TANG, N. et al. A survey of the gene repertoire of *Gigaspora rosea* unravels conserved features among Glomeromycota for obligate biotrophy. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 233, 2016.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117-126, 2006.

TEIXEIRA, A. FS et al. Microbiological Indicators of Soil Quality Under Native Forests are Influenced by Topographic Factors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.

VENEGAS-GONZÁLEZ, A. et al. Drought and climate change incidence on hotspot Cedrela forests from the Mata Atlântica biome in southeastern Brazil. **Global Ecology and Conservation**, v. 15, p. e00408, 2018.

VENSON, G. R. et al. Restoration of areas degraded by alluvial sand mining: use of soil microbiological activity and plant biomass growth to assess evolution of restored riparian vegetation. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 3, p. 120, 2017.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

WANG, W. et al. Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Molecular Plant**, v. 10, n. 9, p. 1147-1158, 2017.

ZAHIR, Z. A. et al. Role of halotolerant microbes in plant growth promotion under salt stress conditions. In: **Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms**. Springer, Singapore, 2019. p. 209-253.

ZAIDI, A. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 56, n. 3, p. 263-284, 2009.

ZHOURI, A. et al. The Rio Doce mining disaster in Brazil: between policies of reparation and the politics of affectations. **Vibrant: Virtual Brazilian Anthropology**, v. 14, n. 2, 2017.

## CAPÍTULO 2

### **Identificação taxonômica e triagem de cepas de PGPR (*Plant growth-promoting rhizobacterias*) isoladas de solo atingido por rejeito de minério de ferro proveniente do rompimento da Barragem de Fundão-MG**

#### **1. Introdução**

A rizosfera é a área que circunda o sistema radicular da planta, sendo um ambiente rico em nutrientes, devido aos exsudatos liberados pelas raízes das plantas, que promove alta atividade microbiana (Khan et al., 2009). As bactérias que se estabelecem na rizosfera e são capazes de estimular o crescimento de plantas são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (Kloepper & Schroth, 1978).

Os principais mecanismos de promoção de crescimento de plantas realizados pelas PGPR envolvem a fixação biológica de nitrogênio, a produção de sideróforos (moléculas quelantes de ferro), solubilização de fosfato e produção de fitohormônios e compostos que auxiliam no desenvolvimento das plantas, sendo estes mecanismos diretos (Glick, 2005). Além disso, existem mecanismos indiretos em que ocorre a estimulação do crescimento das plantas devido à proteção contra fitopatógenos, dada a competição por espaço e nutrientes (Gobelak et al., 2015). A produção de sideróforos por PGPR é favorável ao crescimento de plantas porque esses apresentam maior afinidade pelo ferro quando comparado aos sideróforos produzidos por fitopatógenos, ficando o ferro pouco disponível para o estabelecimento dos patógenos e desenvolvimento de doenças nas plantas (Zaidi et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação de cepas de PGPR isoladas de solo atingido por rejeito de mineração de ferro devido ao rompimento da Barragem do Fundão, Minas Gerais. Além disto, triá-las quanto aos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e fitohormônios como auxinas e giberelinas, a fim de caracterizá-las para serem aplicadas futuramente em formulações de inoculantes para o melhor desempenho da produção de mudas florestais nativas.

#### **2. Material e Métodos**

## 2.1. Identificação taxonômica e análise filogenética dos isolados bacterianos

As bactérias testadas foram isoladas previamente por Pazetto (2018) e foram provenientes de amostras de solo afetado diretamente pela lama da barragem do Fundão, coletadas no distrito de Paracatu de Baixo, localizado no município de Mariana, na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Esses isolados foram preservados em glicerol 25 % e estocados a temperatura de -80 °C.

Após armazenamento, 47 isolados foram reativados em meio líquido DYGS (2,0 g de glicose; 1,5 g de peptona bacteriológica; 2,0 g de ácido málico; 2,0 g de extrato de levedura; 0,5 g de  $K_2HPO_4$ ; 0,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1,5 g de ácido glutâmico por litro de meio de cultura e pH 6,8 ajustado com solução de KOH a 10 %) (Rodríguez Neto et al., 1986). Para caracterização morfológica, eles foram inoculados em meio sólido DYGS com acréscimo de 1,5 % (m/v) de ágar-ágar. Em meio líquido DYGS, parte da biomassa bacteriana obtida foi utilizada para extração de DNA como descrito por Pospiech & Neumann (1995). Após extração do DNA, sua integridade foi verificada em gel de agarose a 1 % em tampão TBE 1X (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL de EDTA- $Na_2$  0,5 mol  $L^{-1}$ , pH 8,0 em 1 L de água destilada), corado com gel red para observação em transluminador (Applied Biosystems, USA). O DNA bacteriano foi quantificado e analisado quanto à sua pureza por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). Após extração, o DNA foi submetido à reação de PCR utilizando os *primers* 10f e 1100r (Lane et al., 1991), homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S do Domínio Bacteria. Os fragmentos de DNAr 16S amplificados foram purificados utilizando o kit Nucleospin Soil (Macherey-Nagel Laboratories, Germany) e sequenciados (*SeqStudio – Thermo Fisher Scientific*).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de RNAr 16S de organismos representados nas bases de dados *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e *RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, http://www.rdp.cme.msu.edu/), usando as rotinas *BLASTn* e *SequenceMatch*, respectivamente. Foram realizados múltiplos alinhamentos das sequências dos isolados (contendo em média 830 nucleotídeos) com sequências mais estritamente relacionadas utilizando o *Clustal* e a filogenia foi inferida pela abordagem de Máxima Verossimilhança com base no parâmetro 2 do modelo de *Kimura*, método *Neighbor-Joining Tree*, utilizando o programa *Mega 7* (versão 7.0.21) (<http://www.megasoftware.net/>) (Saitou & Masatoshi, 1987). Foi realizada a reamostragem de 1000 vezes do conjunto de dados por análise de *bootstrap*. Para melhor compreensão e visualização da diversidade funcional*

entre os isolados escolhidos para a formulação dos consórcios, foi utilizada a ferramenta *Interactive Tree of Life* (<http://itol.embl.de>) para a montagem das árvores filogenéticas (Letunic & Bork, 2016).

## 2.2. Fixação biológica de nitrogênio

A fixação de nitrogênio foi avaliada a partir da inoculação das bactérias em meio semi-sólido NFb, livre de nitrogênio, como descrito por Döbereiner et al (1995). A cada tubo de ensaio foram adicionados 20 mL de meio NFb. Os isolados foram cultivados em meio sólido DYGS e foi realizada a raspagem da cultura crescida em placa de Petri, para a inoculação por picada no meio NFb, que foi incubado a 28 °C por 3 a 8 dias e avaliado quanto à formação de um halo de crescimento bacteriano de cor clara indicando a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio. O teste foi conduzido em triplicata para cada isolado.

## 2.3. Solubilização de fosfato

Os isolados foram testados quanto à solubilização de fosfato de cálcio como descrito por Nautiyal (1999). Os isolados foram inoculados a 20 mL de meio sólido NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate*) contendo L<sup>-1</sup>: 10 g de glicose; 5 g de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; 5 g de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O; 0,25 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,2 g de KCl e 0,1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O pH do meio foi ajustado para 7,0 antes do meio ser esterilizado. As placas foram incubadas a 28 °C por 3 a 5 dias e a formação de um halo de solubilização claro em torno da colônia foi o indicativo da solubilização de fosfato. A eficiência de solubilização foi calculada a partir da divisão matemática da medida do halo de solubilização sob o halo de crescimento da bactéria.

## 2.4. Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi verificada por solução CAS (Schwyn & Neilands, 1987). Os isolados foram inoculados a partir de 20 µL de biomassa, em placas de Petri, em meio de cultura ágar KingB diluído, com pH ajustado para 6,8 adicionado do corante CAS (CAS – Chrome e azurol S). As culturas foram incubadas a 28 °C por 2 a 3 dias, e o aparecimento de um halo de cor laranja em torno da colônia bactéria foi o indicativo da produção de sideróforos.

## 2.5. Quantificação de ácido-indol-3-acético (AIA)

A quantificação de AIA foi realizada pelo método do reagente de *Salkowski* (Glickmann & Dessaux, 1995), com modificações. Os isolados foram reativados e inoculados em meio líquido KingB modificado (quantidades por L<sup>-1</sup>: 15,0 g de glicerol; 20,0 g de peptona; 1,15 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,50 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g de triptofano), com pH ajustado para 6,8. Eles foram incubados por 72 h a 28 °C. Após a incubação, 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugado a 12.000 rpm por 3 min. Foram transferidos 150,0 µL do sobrenadante coletado e 100,0 µL do reagente de *Salkowski* (1,0 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 M em 50 mL de HClO<sub>4</sub> a 35 %) para placa de 96 poços. A reação foi incubada por 30 min no escuro e foi realizada a leitura a 540 nm em espectrofotômetro (Hach, modelo DR3900). Os valores de AIA foram estimados a partir de uma leitura prévia em curva padrão contendo AIA em concentrações variadas de 1 a 50 µg mL<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.6. Quantificação de giberelina

A quantificação de giberelina foi realizada nos isolados cultivados em caldo de soja tripticase suplementado com glicose, como descrito por Graham (1961). Os isolados foram inoculados e incubados a 30 °C por 96 h. Foram transferidos 75 µL da cultura e 150 µL do reagente de Folling-Wu para uma placa de 96 poços. A quantificação foi realizada observando o aparecimento de uma coloração verde-azulada, em decorrência da redução do ácido molíbdico pelos ácidos giberélicos, que foi lido em espectrofotômetro (Hach, modelo DR3900) a 780 nm e comparada com uma curva padrão de ácido giberélico com concentrações variando de 0,2 a 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.7. Formulação dos consórcios de PGPR

A partir dos resultados relacionados aos mecanismos de promoção de crescimento desempenhados pelos isolados BRPB, foram selecionadas cepas PGPR com resultados potenciais para pelo menos três dos testes realizados *in vitro* (fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos, produção de giberelinas e de auxinas).

## 2.8. Análises estatísticas

A partir da aplicação do teste estatístico Kolmogorov-Sminorv (Massey & Frank, 1951), foi observado que os dados apresentaram distribuição normal. Portanto, todos os grupos foram

comparados por análise de variância (ANOVA). As médias obtidas foram agrupadas pelo teste de Scott-knott (Scott & Knott, 1974). Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software SISVAR* (Ferreira, 2011). Valores com  $P \leq 0,05$  foram considerados para indicar diferença estatística a 95 % de confiança.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Identificação taxonômica dos isolados

Dentre os 47 isolados identificados, a maioria foi pertencente ao filo *Firmicutes*, seguido dos fillos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (Figura 1). Estes fillos são os mais encontrados em solos rizosféricos, sendo que várias bactérias pertencentes a estes clados são conhecidas pelo potencial na promoção de crescimento de plantas (Zuluaga et al., 2020). Esses fillos são encontrados também em solos contaminados com Pb, Zn e As, sendo abundantes em áreas sujeitas a atividades de mineração, o que pode ser explicado pela tolerância das bactérias destes fillos ao Zn e Pb, e adaptação a solos ácidos (Jiang et al., 2019; Xu et al., 2017). Farjado et al (2019) relataram em seu estudo sobre o estresse de bactérias expostas a metais pesados, que o filo *Firmicutes* é o filo mais resistente a este tipo de estresse ambiental. Esta maior adaptabilidade pode ser explicada pela capacidade de algumas bactérias deste gênero de formar endósporos, que são estruturas de resistência em resposta a estresses como falta de nutrientes ou a presença de poluentes (Pires et al., 2017). A predominância de bactérias do filo *Firmicutes* somada à presença de *Proteobacteria*, que é um filo metabolicamente bastante diverso, é relevante por representar o potencial de reequilíbrio destas bactérias dentro deste ecossistema (Farjoado et al., 2019). O filo *Proteobacteria* é relatado como um filo cujos microrganismos apresentam taxas de crescimento rápido, sendo predominantemente representado por bactérias Gram-negativas, muitas responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio (Johnston-Monje et al., 2016). O filo *Actinobacteria*, por ser capaz de produzir uma ampla variedade de moléculas químicas e metabólitos secundários envolvidos no ciclo do carbono, contribui para fornecer nutrientes a outras populações bacterianas e por desempenhar a degradação e desintoxicação de compostos tóxicos, inclusive no processo de formação de húmus (Liu et al., 2021; Takahashi, 2017; Buee et al., 2009).

Neste trabalho, foram encontradas 14 bactérias pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e 2 pertencentes a *Kitasatospora*, família *Streptomytaceae*. Foram encontradas pelo menos 15 bactérias do gênero *Bacillus* pertencente à família *Bacillaceae*, seguidas de 5 isolados do gênero

*Enterobacteria*, pertencente à *Enterobacteriaceae*. Em menor abundância, foram encontradas bactérias dos gêneros *Luteibacter* e *Dyella* (família *Rhodanobacteriaceae*), *Staphylococcus* (família *Staphylococcaceae*), *Lysinibacillus* (família *Planococcaceae*), *Sulfitobacter* (família *Rhodobacteraceae*), *Ponticoccus* (família *Rhodobacteraceae*), e, por fim, *Leifsonia* pertencente à família *Microbacteriaceae* (Figura 1).

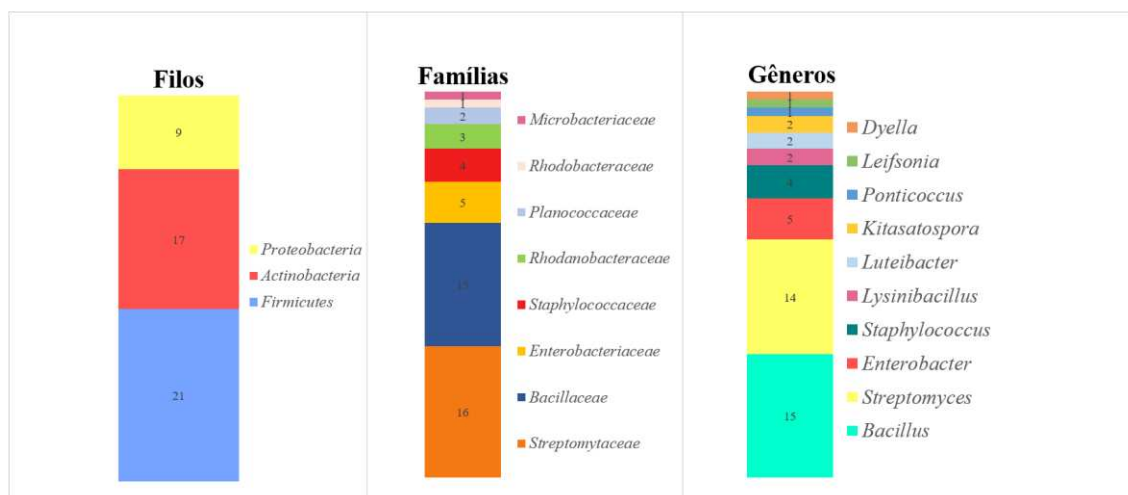


Figura 1 - Abundância relativa de filios, famílias e gêneros de bactérias isoladas de áreas contaminadas com rejeito de mineração, a partir de afiliações taxonômicas com base nas análises parciais do sequenciamento parcial do rRNA 16S dos isolados.

Visto que os isolados utilizados neste trabalho foram coletados de solo atingido por rejeito de mineração (Tecnosolo), estes resultados relacionados a predominância dos filios encontrados podem ser inferidos como a busca da recuperação da qualidade do solo, indicando que as comunidades microbianas são capazes de se adaptar através da modificação de sua composição e funções relacionadas ao metabolismo.

### 3.2. Triagem *in vivo* dos isolados quanto aos mecanismos de PGPR

As cepas bacterianas identificadas foram submetidas a uma triagem *in vitro* quanto à capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, solubilizar fosfato tricálcico, produzir sideróforos, AIA e giberelinas. O mecanismo de promoção de crescimento de plantas mais comum encontrado dentre os isolados foi quanto à produção de giberelinas,

seguido da fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos e solubilização de fosfato, e, produção de AIA (Figura 2).

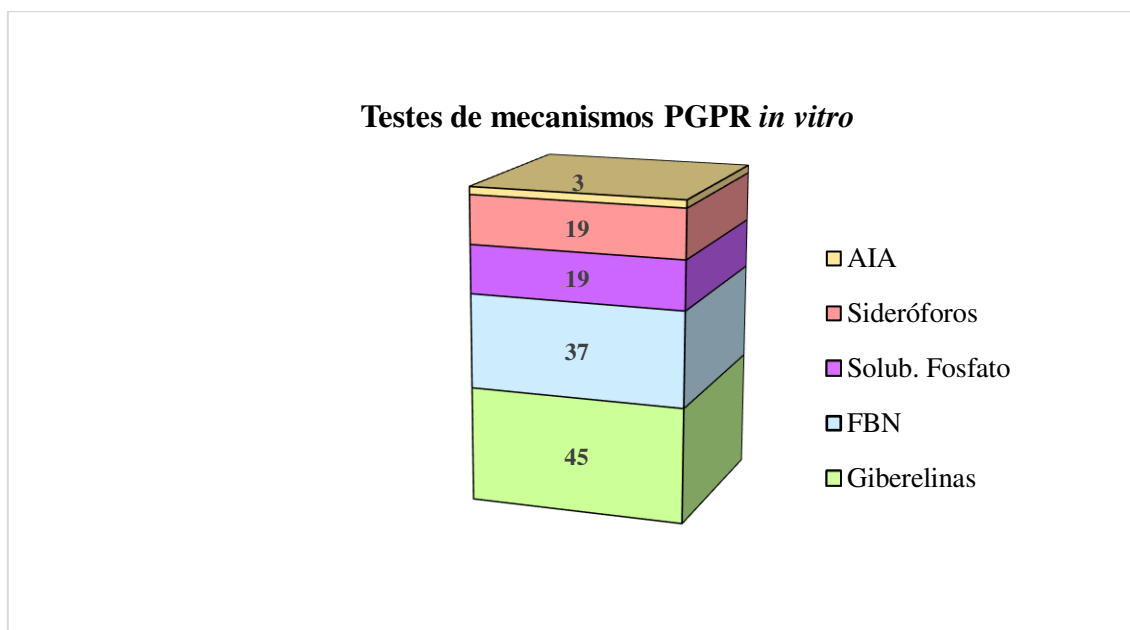


Figura 2 - Características funcionais mais abundantes encontradas entre os isolados testados: produção de giberelinas (45 isolados), fixação biológica de nitrogênio (37 isolados), produção de sideróforos e solubilização de fosfato (19 isolados) e produção de AIA.

O teste de fixação biológica de nitrogênio mostrou que 78 % dos isolados (37/47) se mostraram capazes de realizar a fixação do nitrogênio atmosférico (Figura 2). Dado que as bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas *a priori* por Pazetto (2018) utilizando meios de cultivo enriquecidos para bactérias diazotróficas e actinomicetos o resultado observado era esperado. As bactérias fixadoras de nitrogênio, dessa pesquisa foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Luteibacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Ponticoccus*, *Sulfitobacter* e *Kitasatospora*.

Alternativamente à síntese industrial de nitrogênio pelo processo Haber-Bosch, a fixação biológica de nitrogênio é responsável por cerca de dois terços do nitrogênio fixado no mundo, ocorrendo em temperaturas amenas por microrganismos fixadores distribuídos por toda natureza (Rubio e Ludden, 2008). Parte dessas bactérias podem realizar fixação de nitrogênio em vida livre, sem viverem uma simbiose, como é o caso, por exemplo, das espécies *Azospirillum*, *Azobacter*, *Azocarus* (Dar et al., 2021). Porém, as bactérias fixadoras de nitrogênio podem ocorrer em simbiose com plantas leguminosas, como as da família *Rhizobiaceae*, e com plantas não leguminosas, como no caso de membros do gênero *Frankia* (Ahemad et al., 2014).

As plantas leguminosas estabelecem simbiose com as rizobactérias fixadoras de nitrogênio pela formação de simbiossomos, nódulos radiculares, que são estruturas que permitem o fornecimento do nitrogênio fixado pelas bactérias às plantas hospedeiras (Ahmad et al., 2018). Em plantas não leguminosas, as rizobactérias fixadoras de nitrogênio, também denominadas de diazotróficas, se estabelecem sem que seja necessária uma interação obrigatória com as plantas hospedeiras (Ahemad et al., 2014).

A fixação biológica de nitrogênio ocorre por meio de um complexo nitrogenase, estruturalmente formado por uma metaloenzima constituída de dois componentes, sendo eles a dinitrogenase redutase, que é uma proteína de ferro, e a dinitrogenase que possui um cofator metálico (Dean e Jacobson, 1992). Então, a partir do fornecimento de elétrons com alto poder de redução por parte da dinitrogenase redutase, a dinitrogenase utiliza esta energia para catalisar a redução de  $N_2$  a  $NH_3$  (Bishop e Jorerger, 1990). E, com base no cofator de metal, o complexo enzimático pode variar estruturalmente entre os diferentes gêneros bacterianos, diferenciando-se em três sistemas de fixação de nitrogênio: Mo-nitrogenase, V-nitrogenase e Fe-nitrogenase (Ahemad et al., 2014). Mas, sabe-se que a maior parte da fixação biológica de nitrogênio ocorre pela atividade da Mo-nitrogenase, que está presente em todas as diazotróficas (Bishop e Jorerger, 1990).

No teste de solubilização de fosfato, 40 % (19/47) dos isolados foram capazes de solubilizar o fosfato tricálcio (Figura 2). Foi possível realizar a quantificação da solubilização de fosfato pela medida da eficiência de solubilização (ES), e, aqueles que apresentam um halo de 1,43 a 1,83 mm representam os isolados com maiores taxas de ES (Tabela S1). As bactérias solubilizadores de fosfato foram pertencentes aos gêneros *Luteibacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Sulfitobacter* e *Kitasatospora*. A maioria das bactérias capazes de realizar a solubilização de fosfato pertencem aos gêneros: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* e *Acinetobacter* (Bhattacharyya et al., 2012). Herrera-Quiterio et al., (2020), relataram que isolados que exibiam maior índice de solubilização incluem gêneros *Stenotrophomas* e *Acinetobacter*.

Ainda que o fosfato presente no solo seja abundante, a maior parte deste fósforo é insolúvel, e então, encontra-se indisponível para o crescimento das plantas. Portanto, em muitos casos, visando solucionar este problema, são aplicados fertilizantes químicos, constituídos de

fósforo inorgânico solúvel. Porém, este fósforo sofre imobilização logo após o procedimento de aplicação, por adsorção aniônica, tornando-se inutilizável e se perde no solo (Glick, 2012). Assim, dada a biodisponibilidade de fósforo no solo, aponta-se a importância das bactérias solubilizadoras de fosfato como agentes estimulantes do crescimento vegetal (Feng et al., 2004). Neste processo, a solubilização de fosfato pode ocorrer como consequência da ação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, que são sintetizados pelas diversas bactérias PGPR ou pela síntese de fosfatases que catalisam a hidrólise dos ésteres fosfóricos (Glick, 2012).

Dentre os isolados testados 40 % (19/47) foram capazes de produzir sideróforos (Figura 2), e estes incluem os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Kitasatospora* e *Luteibacter* (Tabela 1, material suplementar). Os principais gêneros de bactérias produtoras de sideróforos segundo Herrera-Quiterio et al (2020) são *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Serratia*, *Curtobacterium* e *Staphylococcus*. No entanto, outros artigos já relataram a produção de sideróforos por *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Kitasatospora* e *Luteibacter* (Herrera et al., 2020; Van Der Meij et al., 2020; Lasa, 2019; Maglangit et al., 2019; Singh et al., 2019; Maleki et al., 2018; Vyas et al., 2018; Saleh et al., 2001). No geral, existem sideróforos sintetizados por bactérias, sejam elas, rizobactérias PGPR ou fitopatogênicas, mas também existem sideróforos sintetizados pelas plantas (fitossideróforos) (Vinayarani, 2018). Sendo assim, o mecanismo de promoção de crescimento de plantas por PGPR referente a produção de sideróforos, está intimamente relacionado à disponibilização de ferro para as plantas, e relacionado à competição entre PGPR e fitopatógenos na captação destas moléculas, a fim de se propiciar o estabelecimento das PGPR em detrimento dos fitopatógenos, e, com isso, auxiliar no crescimento dessas plantas (Bashan, 2005). Então, algumas PGPR auxiliam na promoção de crescimento de plantas por impedirem que os fitopatógenos obtenham ferro e, assim, se tornem incapazes de infectar as plantas hospedeiras e causar doenças.

No meio de cultivo TS, os isolados produtores de AIA foram pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Sulfitobacter* e *Streptomyces*, produzindo, respectivamente, 0,40, 0,51 e 0,05 mM mL<sup>-1</sup> de AIA (Tabela 1, material suplementar). Alguns gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Staphylococcus* e *Mycobacterium*, são comumente relatados como produtores de AIA e parte das espécies destes gêneros se encontram na rizosfera produzindo de 5,7 a 43,2 µg mL<sup>-1</sup> de hormônio (Kumar et al., 2015). Diferentes espécies de *Bacillus* produzem AIA variando de 2,2 a 83,05 µg mL<sup>-1</sup>, e outros gêneros isolados da rizosfera, como *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium* e *Mycobacterium* são produtores de maiores taxas de AIA, produzindo cerca

de 16,5 a 43,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Yu et al., 2014). Observa-se que os níveis de produção de AIA variam de acordo com as diferentes espécies de bactérias, e que esta variação, está relacionada às diversas condições de crescimento, fases de crescimento e disponibilização de nutrientes presentes no solo (Meena et al., 2017; Khalid et al., 2005).

Dentre as várias auxinas de ocorrência natural descritas na literatura, o ácido indol-3-acético (AIA) é o fitohormônio mais frequentemente estudado, devido aos seus efeitos em relação a divisão, extensão e diferenciação celular da planta, e estímulos na germinação de sementes e tubérculos, assim como o desenvolvimento de raiz e de xilema (Khatoon et al., 2020). No entanto, estes efeitos são dependentes da quantidade produzida e da sensibilidade da planta à presença do AIA (Zerrouk et al., 2019). Além dos estímulos ao crescimento vegetal, o AIA sob regulação negativa está relacionado à sinalização associada a mecanismos de defesa das plantas contra bactérias fitopatogênicas (Spaepen & Vanderleyden, 2011).

Noventa e cinco por cento (45/47) dos isolados foram capazes de produzir giberelinas (Figura 2). Os isolados que se destacaram na quantificação de ácido giberélico pertencem aos gêneros *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Luteibacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Dyella*, *Kitasatospora*, *Leifsonia*, *Ponticoccus* e *Sulfitobacter*, com níveis variando de 0,37 a 3,70  $\text{mg mL}^{-1}$  de ácido giberélico (Tabela 1, material suplementar). A literatura relata isolados de *Pseudomonas monteilii* e os gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus* como bons produtores de giberelinas (Pandya et al., 2014). A produção de giberelinas está relacionada à germinação de sementes, de estimulação floral, de brotos e de desenvolvimento de frutos (Herrera-Quiterio et al., 2020).

### **3.3. Formulação dos consórcios microbianos de PGPR**

A partir da triagem *in vitro* dos isolados quanto aos mecanismos PGPR, foram escolhidas sete cepas PGPR potenciais a serem utilizadas na formulação dos consórcios bacterianos (Figura 3).



*Colletotrichum capsici*, importantes fitopatógenos (Wang et al., 2021; Przemieniecki et al., 2019; Zhou et al., 2015; Kumar et al., 2011). As bactérias do gênero *Enterobacter* são comumente conhecidas por mecanismos de promoção de crescimento de plantas relacionados à produção de sideróforos, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio, e em algumas espécies de plantas, as enterobactérias podem estar associadas a bactérias endofíticas (Ribeiro et al., 2021; Souza et al., 2015; Farina et al., 2012). Cepas do gênero *Luteibacter* são descritas como PGPR pela produção de sideróforos e fitohormônios em parceria com alguns fungos endofíticos (Han et al., 2021; Ismail et al., 2021; Jebara et al., 2021; Mitra et al., 2021; Baltrus, 2017).

#### 4. Conclusões

Neste capítulo, a partir da identificação e da triagem de PGPR oriundos do solo afetado por rejeito de mineração da região de Paracatu de Baixo-MG, foi possível caracterizar os seguintes gêneros bacterianos: *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Luteibacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Dyella*, *Kitasatospora*, *Leifsonia*, *Ponticoccus* e *Sulfitobacter*. E, acerca das espécies observadas quanto à promoção de crescimento, *Bacillus*, *Luteibacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Ponticoccus*, *Sulfitobacter* e *Kitasatospora* destacaram-se quanto aos mecanismos de fixação biológica de nitrogênio; *Luteibacter*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Sulfitobacter* e *Kitasatospora* como solubilizadores de fosfato; *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Leifsonia*, *Kitasatospora* e *Luteibacter* como produtoras de sideróforos; *Staphylococcus*, *Sulfitobacter* e *Streptomyces* como produtoras de AIA; e *Lysinibacillus*, *Streptomyces*, *Luteibacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Dyella*, *Kitasatospora*, *Leifsonia*, *Ponticoccus* e *Sulfitobacter* como produtoras de giberelinas. Assim, a partir da caracterização destes isolados, foi possível formular quatro consórcios bacterianos, com base na triagem *in vitro*, combinando as potencialidades de cada cepa PGPR: C1 (BRBP 6, BRBP 11, BRBP 23, BRBP 38, BRBP 47, BRBP 28 e BRBP 26), C2 (BRBP 6, BRBP 11, BRBP 23), C3 (BRBP 38 e BRBP 47) e C4 (BRBP 28 e BRBP 26) a fim de se obter inoculantes mais completos a serem aplicados em programas de revegetação para recuperação de áreas degradadas.

## 5. Referências bibliográficas

- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University-science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- BALTRUS, David A. Unusual Sulfur Requirements During Laboratory Growth of *Luteibacter*. **Biorxiv**, p. 149401, 2017.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Plant growth-promoting. **Encyclopedia of Soils in the Environment**, v. 1, p. 103-115, 2005.
- BISHOP, P. E.; JOERGER, R. D. Genetics and molecular biology of alternative nitrogen fixation systems. **Annual Review of Plant Biology**, v. 41, n. 1, p. 109-125, 1990.
- BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. Spectrophotometric determination of phosphorus in soil and plant extracts. **Revista Ceres**, v. 21, p. 73-85, 1974.
- BUEE, M. et al. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, v. 184, n. 2, p. 449-456, 2009.
- CARMO, CAF de S. et al. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. **Embrapa Solos-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2000.
- CARMO, F. F. do et al. Fundão tailings dam failures: the environment tragedy of the largest technological disaster of Brazilian mining in global context. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 15, n. 3, p. 145-151, 2017.
- CLARK, J. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.23, p.458-460, 1975
- DAR, S. A. et al. Azotobacter as Biofertilizer for Sustainable Soil and Plant Health Under Saline Environmental Conditions. In: **Microbiota and Biofertilizers**. Springer, Cham, 2021. p. 231-254.
- DEAN, D. R. Biochemical genetics of nitrogenase. **Biological Nitrogen Fixation**, p. 763-834, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como Isolar e Identificar Bactérias Diazotróficas de Plantas Não-Leguminosas**. Embrapa SPI, 1995.

ETESAMI, H.; ADL, S. M. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Their Action Mechanisms in Availability of Nutrients to Plants. In: **Phyto-Microbiome in Stress Regulation**. Springer, Singapore, 2020. p. 147-203.

FAJARDO, C. et al. Pb, Cd, and Zn soil contamination: monitoring functional and structural impacts on the microbiome. **Applied Soil Ecology**, v. 135, p. 56-64, 2019.

FENG, K. et al. Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils. **Pedosphere**, v. 14, n. 1, p. 85-92, 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GIONGO, A. et al. Adaption of microbial communities to the hostile environment in the Doce River after the collapse of two iron ore tailing dams. **Heliyon**, v. 6, n. 8, p. e04778, 2020.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1-7, 2005.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 2, p. 793-796, 1995.

GROBELAK, A.; NAPORA, A.; KACPRZAK, M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. **Ecological Engineering**, v. 84, p. 22-28, 2015.

GRAHAM, H. D.; HENDERSON, J. H. M. Reaction of gibberellic acid & gibberellins with Folin-Wu phosphomolybdic acid reagent & its use for quantitative assay. **Plant Physiology**, v. 36, n. 4, p. 405, 1961.

HAN, G. et al. Response of Pine Rhizosphere Microbiota to Foliar Treatment with Resistance-Inducing Bacteria against Pine Wilt Disease. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 688, 2021.

HERRERA-QUITERIO, A. et al. Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. **Revista Argentina de Microbiología**, 2020.

HERRERA, H. et al. Isolation and identification of endophytic bacteria from mycorrhizal tissues of terrestrial orchids from southern Chile. **Diversity**, v. 12, n. 2, p. 55, 2020.

ISMAIL, M. A. et al. Comparative Study between Exogenously Applied Plant Growth Hormones versus Metabolites of Microbial Endophytes as Plant Growth-Promoting for *Phaseolus vulgaris* L. **Cells**, v. 10, n. 5, p. 1059, 2021.

JEBARA, S. H. et al. Potential use of efficient resistant plant growth promoting rhizobacteria in biofertilization and phytoremediation of heavy metal contaminated soil. In: **Handbook of Bioremediation**. Academic Press, 2021. p. 285-293.

JIANG, B. et al. Impacts of heavy metals and soil properties at a Nigerian e-waste site on soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 362, p. 187-195, 2019.

JOHNSTON-MONJE, D. et al. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1, p. 337-355, 2016.

KHALID, A. et al. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Soil Research*, v. 42, n. 8, p. 921-926, 2005.

KHAN, M. S. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. **Environmental Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2009.

KHATOON, Z. et al. Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. **Journal of Environmental Management**, v. 273, p. 111118, 2020.

KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: **Proc. of the 4th Internet**. France, p. 879-882, 1978.

KOHLER, J. et al. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2-3, p. 245-252, 2009.

KUMAR, V. et al. Potential of plant growth promoting traits by bacteria isolated from heavy metal contaminated soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, n. 6, p. 807-814, 2015.

LASA, A. V. **Estudio de la diversidad procariótica y caracterización taxonómica y funcional de las bacterias asociadas a la raíz de roble melojo (*Quercus Pyrenaica* Willd.) y de leguminosas forrajeras del espacio natural de Sierra Nevada**. 2019. Tese de Doutorado. Universidad de Granada.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, p. 115-147, 1991.

LIU, J. et al. Microbial communities in rare earth mining soil after in-situ leaching mining. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 142521, 2021.

MAGLANGIT, F. et al. Legonoxamines AB, two new hydroxamate siderophores from the soil bacterium, *Streptomyces* sp. MA37. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 1, p. 75-79, 2019.

MALEKI, M. et al. Novel strains of *Bacillus cereus* Wah1 and *Enterobacter cloacae* Wkh with high potential for production of siderophores. **Biological Journal of Microorganism**, v. 6, n. 24, 2018.

MASSEY JR, F. J. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. **Journal of the American Statistical Association**, v. 46, n. 253, p. 68-78, 1951.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 565-572, 2004.

MEENA, V. S. et al. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review. **Ecological Engineering**, v. 107, p. 8-32, 2017.

MEYER, J. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 3, p. 135-142, 2000.

MITRA, D. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis: plant growth improvement and induction of resistance under stressful conditions. **Journal of Plant Nutrition**, p. 1-37, 2021.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

OLIVEIRA MENDES, G. de et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239-249, 2014.

OLIVEIRA NEVES, A. C. de et al. Neglect of ecosystems services by mining, and the worst environmental disaster in Brazil. **Natureza & Conserva**, v. 1, n. 14, p. 24-27, 2016.

OMACHI, C. Y. et al. Atlantic Forest loss caused by the world's largest tailing dam collapse (Fundão Dam, Mariana, Brazil). **Remote Sensing Applications: Society and Environment**, v. 12, p. 30-34, 2018.

PANDYA, N. D. et al. Screening and characterization of GA3 producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. **Int J Curr Microbiol Appl Sci**, v. 3, n. 5, p. 110-115, 2014.

PANIZZON, J. P. et al. Bacteria-soil-plant interaction: this relationship to generate can inputs and new products for the food industry. **Rice Research: Open Access**, 2016.

PENROSE, D. M.; MOFFATT, B. A.; GLICK, B. R. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 77-80, 2001.

PIHLAP, E. et al. Initial soil formation in an agriculturally reclaimed open-cast mining area—the role of management and loess parent material. **Soil and Tillage Research**, v. 191, p. 224-237, 2019.

PIRES, C. et al. Metal (loid)-contaminated soils as a source of culturable heterotrophic aerobic bacteria for remediation applications. **Geomicrobiology Journal**, v. 34, n. 9, p. 760-768, 2017.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics (Regular ed.)**, v. 11, n. 6, p. 217-218, 1995.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142-149, 2010.

RENNIE, R. J. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 8-14, 1981.

RODRIGUES NETO, J. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathol**, v. 12, p. 16, 1986.

RUBIO, Luis M.; LUDDEN, Paul W. Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, 2008.

SALEH, S. S.; GLICK, Bernard R. Involvement of gacS and rpoS in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 698-705, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, J. V. dos et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6735-6748, 2016.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, p. 507-512, 1974.

SEGURA, F. R. et al. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813-825, 2016.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SILVA, A. O. et al. Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. **Ecological Indicators**, v. 93, p. 142-151, 2018.

SILVA CRUZ, F. V. da et al. Does Samarco's spilled mud impair the growth of native trees of the Atlantic Rainforest? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 110021, 2020.

SINGH, D. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Functions and Benefits. In: **Microbial Interventions in Agriculture and Environment**. Springer, Singapore, 2019. p. 205-227.

SINGH, L. S. et al. Actinomycetes from soil of Lachung, a pristine high altitude region of Sikkim Himalaya, their antimicrobial potentiality and production of industrially important enzymes. **Advances in Microbiology**, v. 9, n. 08, p. 750, 2019.

SIQUEIRA, J. O. et al. Micorrizas e degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 5, p. 219-305, 2007.

SOS Mata Atlântica, INPE, Arcplan, 2017. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 2015–2016, Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto de Pesquisas Espaciais.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 2011.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TAKAHASHI, Y. Genus *Kitasatospora*, taxonomic features and diversity of secondary metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 506-513, 2017.

TEIXEIRA, A. FS et al. Microbiological Indicators of Soil Quality Under Native Forests are Influenced by Topographic Factors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117-126, 2006.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, D. P.; SAIKIA, R. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. **Current Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 489-496, 2009.

VAN DER MEIJ, A. et al. Differential effects of plant hormones on growth of Streptomycetaceae and other plant-associated bacteria, 2020.

VENSON, G. R. et al. Restoration of areas degraded by alluvial sand mining: use of soil microbiological activity and plant biomass growth to assess evolution of restored riparian vegetation. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 3, p. 120, 2017.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VINAYARANI, G.; PRAKASH, H. Growth promoting rhizospheric and endophytic bacteria from *Curcuma longa* L. as biocontrol agents against rhizome rot and leaf blight diseases. **The Plant Pathology Journal**, v. 34, n. 3, p. 218, 2018.

VYAS, P. Endophytic microorganisms as bio-inoculants for sustainable agriculture. In: **Microbial Bioprospecting for Sustainable Development**. Springer, Singapore, 2018. p. 41-60.

XU, X. et al. Response of soil bacterial communities to lead and zinc pollution revealed by Illumina MiSeq sequencing investigation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 666-675, 2017.

YEO, A. R. et al. Short-and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 7, p. 881-889, 1991.

YU, X. et al. Culturable heavy metal-resistant and plant growth promoting bacteria in V-Ti magnetite mine tailing soil from Panzhihua, China. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106618, 2014.

ZAIDI, A. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 56, n. 3, p. 263-284, 2009.

ZAIDI, A. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 231-239, 2015.

ZAHIR, Z. A. et al. Role of halotolerant microbes in plant growth promotion under salt stress conditions. In: **Saline Soil-based Agriculture by Halotolerant Microorganisms**. Springer, Singapore, 2019. p. 209-253.

ZERROUK, I. Z. et al. Algerian Sahara PGPR confers maize root tolerance to salt and aluminum toxicity via ACC deaminase and IAA. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, n. 6, p. 91, 2019.

ZHOURI, A. et al. The Rio Doce mining disaster in Brazil: between policies of reparation and the politics of affectations. **Vibrant: Virtual Brazilian Anthropology**, v. 14, n. 2, 2017.

ZULUAGA, M. Y. A. et al. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic/N-scavenging bacteria isolated from the soils and rhizospheres of two species of *Solanum*. **PLoS one**, v. 15, n. 1, p. e0227422, 2020.

## 6. Material Suplementar

Tabela 1S - Identificação e triagem in vitro de bactérias isoladas de áreas contaminadas (Isolados BRBP – Bento Rodrigues Paracatu de Baixo) com rejeito de mineração quanto aos mecanismos de promoção de crescimento vegetal desempenhados por PGPR.

Isolado	Identificação	FBN	Ef. Sol. (mm)	Sideróforos	AIA (mM mL <sup>-1</sup> )	Ácido giberélico (mg mL <sup>-1</sup> )
BRBP 1	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	-
BRBP 2	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	-	-	-	0,78 f
BRBP 3	<i>Luteibacter</i> sp.	+	1,30 b	-	-	0,99 e
BRBP 4	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	0,91 e
BRBP 5	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	-	1,38 e
BRBP 6	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	1,20 b	-	0,41 a	1,79 d
BRBP 7	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	1,60 d
BRBP 8	<i>Enterobacter hormaechei</i>	+	1,50 a	-	-	3,06 b
BRBP 9	<i>Bacillus subtilis</i>	+	1,43 a	+	-	1,29 e
BRBP 10	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	1,50 a	-	-	1,41 d
BRBP 11	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	1,20 b	+	-	3,73 a
BRBP 12	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	1,27 b	-	-	1,29 e
BRBP 13	<i>Streptomyces neyagawaensis</i>	-	-	-	-	1,36 d
BRBP 14	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	1,30 b	-	-	1,34 e
BRBP 15	<i>Streptomyces</i> sp.	+	1,33 b	+	-	1,45 d
BRBP 16	<i>Streptomyces celluloflavus</i>	-	-	-	-	1,21 e
BRBP 17	<i>Bacillus tequilensis</i>	-	-	-	-	1,58 d

BRBP 18	<i>Streptomyces camponoticapitis</i>	-	-	-	-	2,86 b
BRBP 19	<i>Leifsonia</i> sp.	+	-	+	-	1,22 e
BRBP 20	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	1,03 b	-	-	1,36 e
BRBP 21	<i>Streptomyces coerulescens</i>	+	1,20 b	+	-	1,32 e
BRBP 22	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	-	-	-	-	0,99 e
BRBP 23	<i>Enterobacter hormaechei</i>	+	-	+	-	1,97 d
BRBP 24	<i>Streptomyces</i> sp.	+	-	-	-	1,53 d
BRBP 25	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	+	1,40 b	-	-	1,37 e
BRBP 26	<i>Enterobacter hormaechei</i>	+	1,57 a	+	-	1,46 d
BRBP 27	<i>Ponticoccus gilvus</i>	+	-	-	-	1,12 e
BRBP 28	<i>Enterobacter hormaechei</i>	+	1,63 a	+	-	1,19 e
BRBP 29	<i>Streptomyces levis</i>	-	-	-	-	0,37 f
BRBP 30	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	0,06 g
BRBP 31	N.ID.	-	-	-	-	0,02 g
BRBP 32	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	-	0,07 g
BRBP 33	<i>Bacillus subtilis</i>	-	1,30 b	+	-	1,23 e
BRBP 34	N.ID.	-	-	-	-	-
BRBP 35	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	1,83 a	+	-	1,53 f
BRBP 36	<i>Streptomyces cavourensis</i>	+	-	+	-	0,58 e
BRBP 37	<i>Bacillus tequilensis</i>	+	-	-	-	1,21 e
BRBP 38	<i>Sulfitobacter donghicola</i>	+	1,50 a	-	0,50 a	1,00 e
BRBP 39	<i>Kitasatospora sp.</i>	+	1,27 b	+	-	1,65 d
BRBP 40	N.ID.	-	-	-	-	2,46 c
BRBP 41	<i>Streptomyces roseovorticillatus</i>	-	-	-	-	2,76 b

BRBP 42	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	-	-	1,29 e
BRBP 43	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	+	-	+	-	1,51 d
BRBP 44	<i>Streptomyces levis</i>	+	-	-	0,05 b	1,44 d
BRBP 45	<i>Staphylococcus warneri</i>	-	-	-	-	1,37 e
BRBP 46	<i>Streptomyces glomeratus</i>	+	-	-	-	2,46 c
BRBP 47	<i>Luteibacter</i> sp.	+	1,53 a	+	-	2,59 c

### CAPÍTULO 3

## Inoculação de consórcios de PGPR (*Plant growth promoting rhizobacteria*) e FMA (fungos micorrízicos arbusculares) para a promoção de crescimento de espécies florestais nativas de Mata Atlântica

### 1. Introdução

Originalmente, a Mata Atlântica se estendia por cerca de 1.300.000 km<sup>2</sup> do território brasileiro, mas devido à exploração histórica e expansão de terras urbanas e agrícolas, cerca de 90 % deste bioma foi perdido, destacando-o como importante *hotspot* de biodiversidade (Rezende et al., 2018; Almeida, 2016; Freitas et al., 2010). Dentre as atividades humanas causadoras de impacto neste ecossistema, a mineração de ferro vem impactando negativamente a diversidade e a densidade de microrganismos do solo, levando a danos nos processos bioquímicos essenciais e comprometendo a qualidade do solo (Silva et al., 2018). Sendo assim, os solos de regiões altamente impactadas pela mineração, a exemplo do Quadrilátero Ferrífero localizado na região central do estado de Minas Gerais, apresentam baixa fertilidade, são ácidos, rasos e constituídos de altas concentrações de ferro (Carvalho Filho et al., 2015).

No âmbito do restabelecimento da vegetação de áreas degradadas, a aplicação de microrganismos promotores de crescimento de plantas para o melhor desempenho de mudas de espécies florestais nativas, representa uma alternativa ecológica e sustentável. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) se destacam por serem capazes de se associar às plantas e as beneficiam com a disponibilização de nutrientes e remediação de solos pobres ou degradados, contribuindo para a sua recuperação e saúde (Pan et al., 2020).

*Caesalpinia peltophoroides* Benth., *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart são espécies florestais nativas de Mata Atlântica, pertencentes à família Mimosoideae (Pusztahelyi et al., 2015; Lorenzi, 2003). Todas elas apresentam crescimento rápido e são umas das primeiras espécies que se estabelecem em áreas impactadas, sendo, portanto, constantemente visadas nos processos de revegetação (Giannini et al., 2017; Pontes et al., 2006).

Durante o processo de recuperação do solo, a sucessão microbiana sustentada pela revegetação é uma das ferramentas mais importantes para a contribuição da restauração da qualidade do solo (Prado et al., 2019; Jordão et al., 2021). Assim, produtos microbiológicos na forma de inoculantes para a promoção de crescimento de plantas, representam uma solução relevante e sustentável acerca da melhoria das qualidades das mudas e da recuperação da biodiversidade do solo (Moura et al., 2016; Cunha et al., 2013).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e PGPR, isoladamente ou combinados, em mudas de espécies florestais nativas de Mata Atlântica: *Caesalpinia peltophoroides* Benth, *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart a fim de se obter formulações inoculantes a serem aplicadas na recuperação de áreas degradadas, a exemplo de áreas atingidas por rejeito de mineração.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Preparo das sementes e manutenção do experimento *in vivo***

Sementes de arbóreas nativas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth, *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart foram desinfestadas (álcool 70 % e hipoclorito de sódio 2 %) e foram germinadas em areia autoclavada e, as plântulas foram transplantadas para tubetes contendo substrato a base de moinha de carvão, bagaço de cana e cama de frango, acrescido de 20 % de solo horizonte B textural, adicionados ou não de 10 % de inóculo de FMA. Após 14 dias do transplante das plantas, foi realizada a inoculação dos consórcios e dos isolados utilizados na formulação dos consórcios, contendo  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> de cada tratamento delineado, aplicando-se diretamente no substrato dos tubetes. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por: 85 dias - *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, 130 dias - *Caesalpinia peltophoroides* Benth e 280 dias - *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart e foram irrigadas diariamente a fim de se manter o teor de umidade do substrato a cerca de 60 % da capacidade de campo. Foram realizadas fertilizações com solução nutritiva de Clarck, 1/2 da força, sem adição de fósforo (Clarck, 1975) a cada 7 dias. Os experimentos foram conduzidos em delineamento fatorial, combinando os efeitos de FMA e PGPR, com dez repetições e um tratamento controle, sem inoculante de microrganismos, contendo apenas meio de cultura DYGS.

## **2.2. Preparo do substrato com e sem inóculo de FMA**

Os inóculos de FMA foram obtidos junto ao Laboratório de Associações Micorrízicas da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais, Brasil), por meio da microempresa Cogumê Biotecnologia pelo método *on farm*, onde os esporos presentes no solo de uma região de mata nativa foram multiplicados em vasos utilizando plantas de *Sorghum bicolor* (Prates Júnior et al., 2020). Neste preparo, o substrato foi constituído de solo de mata nativa, bagaço de cana de açúcar e vermicula na proporção de 1:1:1. adicionado de 1 % de composto orgânico. Após 3 meses de cultivo, as plantas de sorgo passaram por um período de estresse pela ausência de água (1 mês), ocorrendo a multiplicação dos esporos. Em seguida, o solo foi peneirado para homogeneização do substrato e utilizado como inóculo.

## **2.3. Preparo dos inoculantes PGPR**

Cada isolado escolhido para a formulação dos consórcios foi reativado em 20 mL de meio DYGS (2,0 g de glicose; 1,5 g de peptona bacteriológica; 2,0 g de ácido málico; 2,0 g de extrato de levedura; 0,5 g de  $K_2HP0_4$ ; 0,5 g de  $MgSO_4.7H_2O$ ; 1,5 g de ácido glutâmico por litro de meio de cultura e pH 6,8 ajustado com solução de KOH A 10 %) (Rodriguez Neto et al., 1986) a 28 °C (Capítulo 2). Os consórcios foram formulados a partir da adição de aproximadamente  $10^8$  células de cada isolado a um tubo *Falcon*, ajustados a partir da correção de densidade ótica e confirmados por contagem pela técnica de plaqueamento em microgota.

## **2.4. Delineamento do experimento em casa de vegetação**

De acordo com o mínimo de plantas disponíveis a serem transferidas para os tubetes contendo substrato com FMA ou sem FMA, foi distribuído o número de fatores relacionados às bactérias PGPR, a partir da escolha dos consórcios e isolados a serem aplicados em cada espécie florestal (Figura 4).

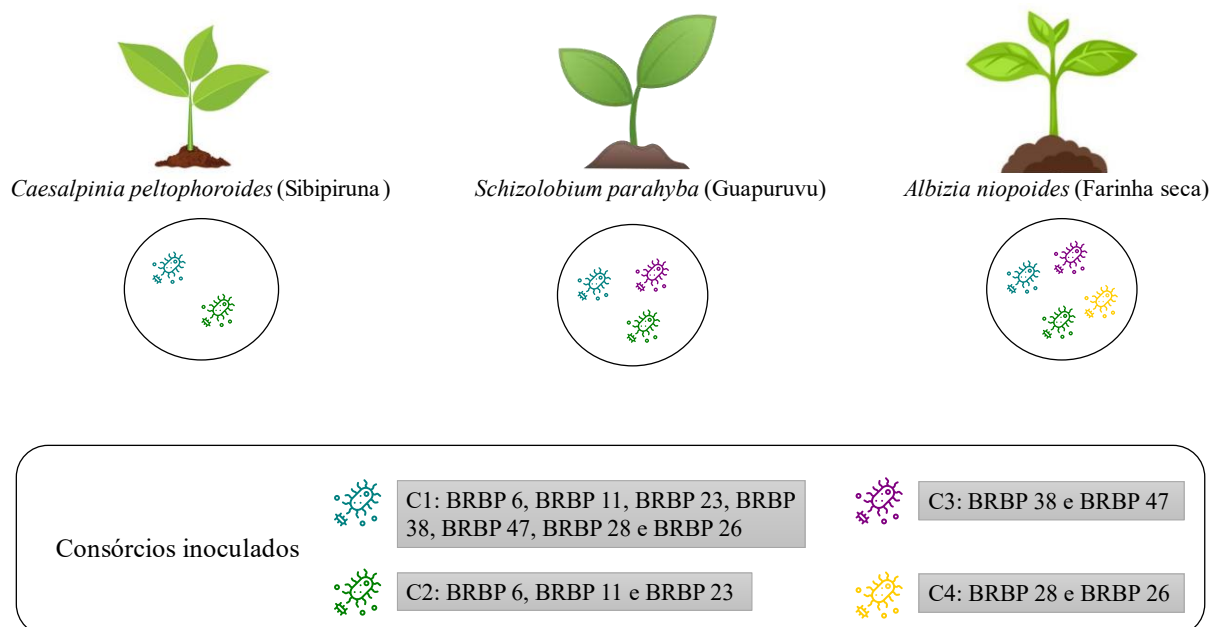


Figura 4 - Esquema para ilustração dos tratamentos condicionados a cada espécie vegetal, de acordo com os consórcios inoculados e suas cepas PGPR constituintes.

*Caesalpinia peltophoroides* Benth foi conduzida em esquema fatorial 2 x 6 (Substrato com inóculo de FMA, substrato sem inóculo de FMA x C1, C2, BRBP 6, BRBP11 e BRBP 23); *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake em esquema fatorial 2 x 9 (Substrato com inóculo de FMA, substrato sem inóculo de FMA x C1, C2, BRBP 6, BRBP11, BRBP 23, BRBP 38 e BRBP 47); *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart em esquema fatorial 2 x 11 (Substrato com inóculo de FMA, substrato sem inóculo de FMA x C1, C2, BRBP 6, BRBP11, BRBP 23, BRBP 38, BRBP 47, BRBP 28 e BRBP 26). Para todos os tratamentos, foram utilizadas 10 repetições, totalizando: 120 plantas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth, 180 plantas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e 240 plantas de *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart.

## 2.5. Determinação dos parâmetros de crescimento

Ao final do experimento em casa de vegetação, foram determinadas a altura e diâmetro do caule, assim como as massas frescas e secas da parte aérea das plantas. A massa seca da parte aérea foi determinada após secagem em estufa a 70 °C, por 5 dias, até peso constante. Os dados obtidos sobre a altura, diâmetro e massa seca das plantas foram analisados utilizando-se o programa *Minitab* v. 19 (Minitab, 2013), objetivando-se compreender qual foi o efeito das

variáveis: presença e ausência de inoculação com bactéria, e presença e ausência de inoculação com FMA, além da interação entre estes dois fatores.

## 2.6. Análise de colonização micorrízica

As raízes das plantas foram coletadas, lavadas em água corrente e armazenadas à temperatura ambiente em tubos Falcon de 50 mL, contendo 20 mL de solução de formaldeído, ácido acético, álcool etílico (FAA) na proporção 5:9:5 (v:v:v) até o momento das análises.

As raízes foram submetidas ao processo de descoloração como descrito por Prates Júnior, (2021). Na primeira etapa de descoloração, as raízes foram emergidas em solução de peróxido de hidrogênio, em banho-maria a 100 °C por 10 min e foram lavadas em água corrente. Na segunda etapa, as raízes foram colocadas em solução contendo peróxido de hidrogênio 10 % e hidróxido de potássio 10 % (v:v) a 100 °C por 5 min, e depois lavadas em água corrente. Então, as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico 2 % (m:v), à temperatura ambiente por 10 min, que foram, então, drenadas e submetidas à coloração em azul de tripano em lactoglicerol 0,05 % (m:v) à temperatura ambiente, *overnight*. Por fim, a colonização micorrízica foi analisada utilizando o Microscópio EVOS M5000 (*Thermo Fischer Scientific*, pais), aumento final de 200X. Estruturas fúngicas como arbúsculos, hifas, vesículas e esporos foram consideradas como positivas na análise de colonização micorrízica.

## 2.7. Análises estatísticas

Foi aplicado o teste estatístico *Kolmogorov-Smirnov* (Massey, 1951), e uma vez que foi observado todos os conjuntos de dados seguiam distribuição normal, todos os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA). As médias obtidas foram comparadas pelo teste de *Tukey* a 5 % de significância (Abdi, 2010). As análises estatísticas foram realizadas no *software Minitab* v. 19 (Minitab, 2013).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Crescimento das plantas inoculadas com os consórcios (FMA e PGPR)

Os dados obtidos para altura, diâmetro e massa seca das plantas foram analisados objetivando-se compreender qual foi o efeito das variáveis: presença e ausência de inoculação com bactéria, presença e ausência de inoculação com FMA, além da interação entre estes dois fatores.

Em plantas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake foi possível observar que os fatores bactéria e a interação bactéria: FMA não foram significativos, mas a inoculação com FMA *on farm* foi significativa (Figura 5 e 6). Entretanto, no presente estudo, a inoculação das plantas com cepas de PGPR, não promoveu o crescimento das mudas em casa de vegetação.

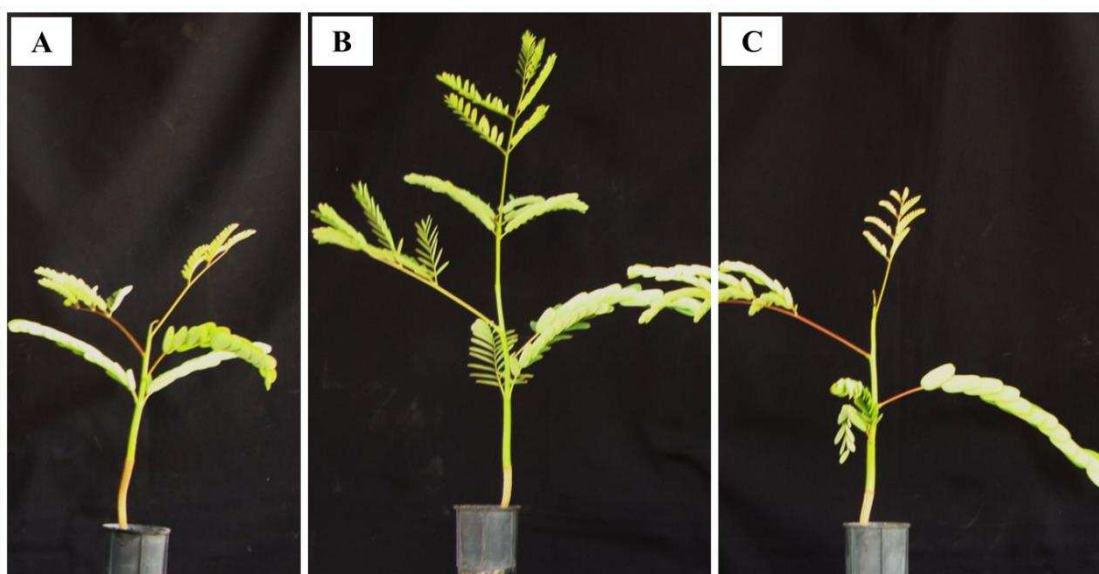


Figura 5 - *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake com 85 dias de idade sob diferentes tratamentos: A – planta controle, B – inoculada com FMA e C – planta inoculada com consórcio C1 de PGPR.

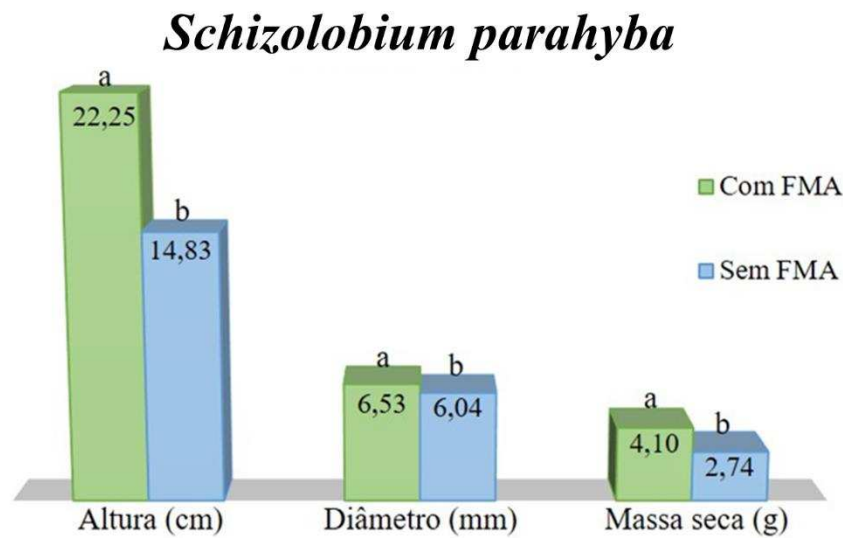


Figura 6 - Comparações pareadas de Tukey para o fator FMA e respostas altura, diâmetro e massa seca, em *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, a 95 % de confiança. As médias que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes.

Outros estudos já foram desenvolvidos acerca da inoculação de PGPR e FMA em uma variedade de *S. parahyba*. Em um experimento em campo, a espécie florestal *S. parahyba* var. *amazonicum* respondeu significativamente a promoção de crescimento diante da aplicação do fungo micorrízico *Acaulospora* sp. e da bactéria do gênero *Rhizobium* sp. em sementes e mudas das plantas (Cely et al., 2016). Alguns autores sugerem que a promoção de crescimento desta variedade florestal pode ter ocorrido tanto pela facilitação da absorção de nutrientes, por parte do fungo micorrízico, quanto por mecanismos de fixação de nitrogênio e liberação de fitohormônios na rizosfera pela PGPR inoculada (Mehboob et al., 2012; Matias et al., 2009). E, além disto, acredita-se que a presença da associação micorrízica possa estimular a eficácia da PGPR devido a um aumento geral das taxas de nutrientes da planta hospedeira (Siviero et al., 2008).

Para *Caesalpinia peltophoroides* Benth, os resultados foram semelhantes aos encontrados para *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake. Também foi possível observar que os fatores bactéria e a interação bactéria: FMA não foram significativos, mas a inoculação com FMA foi significativa. A inoculação das plantas de sibipiruna com FMA estimulou o crescimento em relação à altura, diâmetro e massa seca da parte aérea em mais de 50 % (Figura 7 e 8).

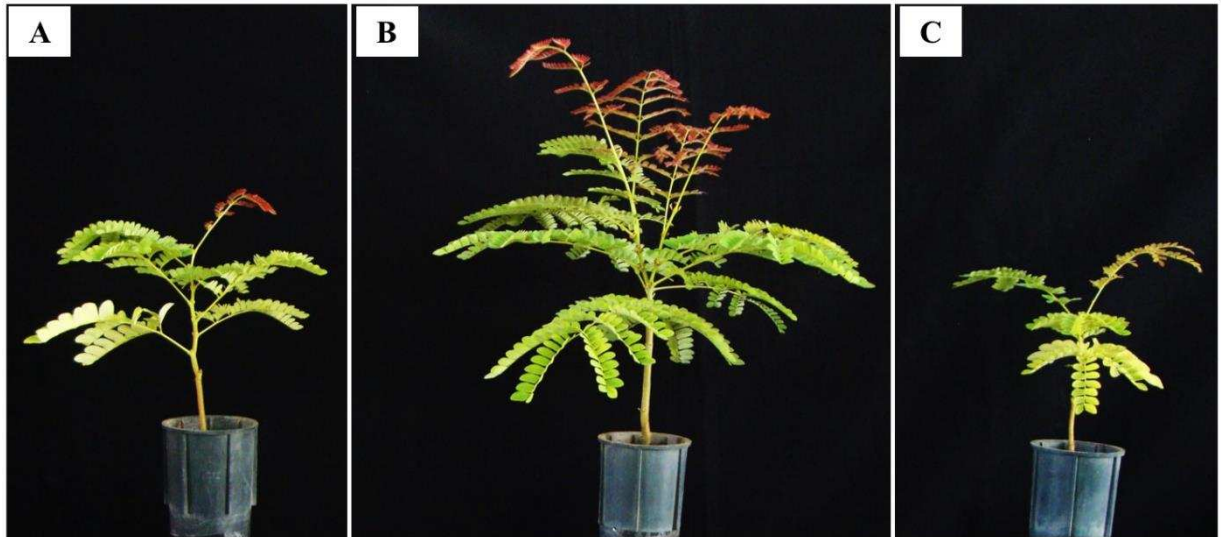


Figura 7 - *Caesalpinia peltophoroides* Benth com 130 dias de idade sob diferentes tratamentos: A – planta controle, B – planta inoculada com FMA, C – planta inoculada com C1.

## *Caesalpinia peltophoroides*

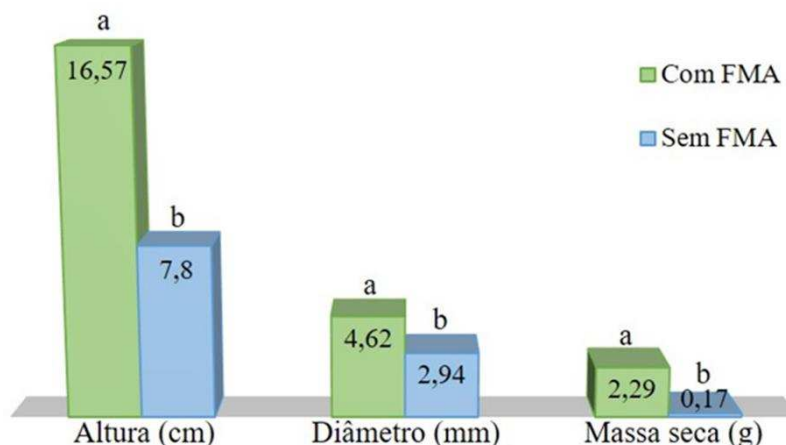


Figura 8 - Comparações pareadas de Tukey para o fator FMA e respostas altura, diâmetro e massa seca, em *Caesalpinia peltophoroides* Benth, a 95 % de confiança. As médias que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes.

Embora as bactérias PGPR testadas neste experimento não tenham surtido efeito significativo na promoção do crescimento de sibipiruna, Cunha et al. (2013) relataram o potencial da aplicação de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. no aumento da germinação de sementes, altura, massa seca e na melhoria do sistema radicular de mudas seminais de sibipiruna. A produção e preparo do inóculo foi realizado a partir da aferição da D.O. de 0,2, equivalente a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> das cepas PGPR e as suspensões bacterianas foram adicionados a 1 % de leite em pó, nutrindo inicialmente as rizobactérias, que foram aplicadas ao substrato numa proporção de 5 mL de suspensão por 50 cm<sup>3</sup> de substrato.

*Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart apresentou taxa de mortalidade de 39,16 %, sendo que as plantas submetidas ao tratamento BRPB 28 (com e sem FMA) sofreram o maior número de mortes, portanto, foram analisados os resultados referentes a 7 repetições de cada tratamento. As plantas removidas da análise foram escolhidas segundo o critério de serem a maior e a menor valor avaliadas da repetição dentro do tratamento. Na análise estatística do experimento *in vivo* com *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, a 95 % de nível de confiança, os fatores bactérias e a interação bactéria: FMA também não foram significativos, porém a inoculação com FMA promoveu significativamente um maior crescimento dessa espécie florestal (Figura 9 e 10). Além das análises relacionadas ao crescimento foi possível

observar a presença de nódulos radiculares em algumas mudas de farinha seca (Figura 11). Estes nódulos serão analisados em trabalho futuros.



Figura 9 - *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart com 280 dias de idade sob diferentes tratamentos: A – planta controle, B – planta inoculada com C1, C – planta inoculada com FMA.

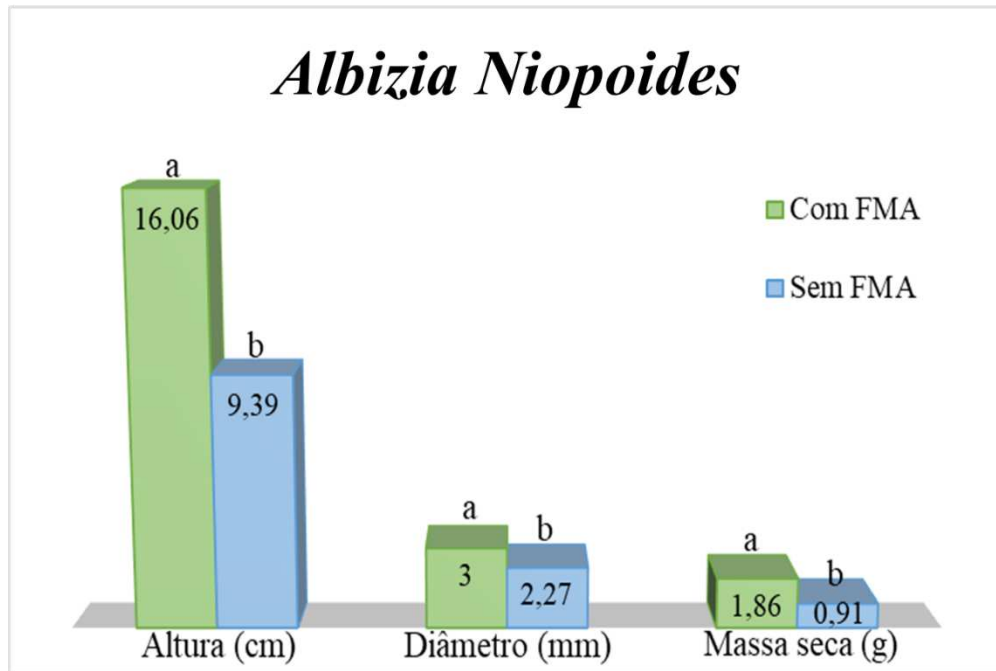


Figura 10 - Comparações pareadas de Tukey para o fator FMA e respostas altura, diâmetro e massa seca, em *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, a 95 % de confiança. As médias que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes.

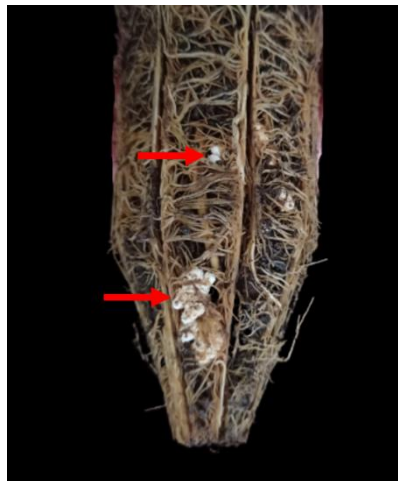


Figura 11 - Nódulos radiculares (setas vermelhas) encontrados em mudas de *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart.

Sabe-se que as plantas pertencentes a *Albizia niopoides* apresentam nódulos radiculares formados por bactérias fixadoras de nitrogênio, o que auxilia que esta espécie resista e se estabeleça em solos pobres em nitrogênio (Carvalho, 2009). Ainda que não tenhamos identificado estudos sobre a inoculação de PGPR e FMA em *Albizia niopoides*, em *Albizia lebbek* há relatos de que a inoculação com cepas PGPR de *Rhizobium* e *Pseudomonas* foram capazes de proporcionar melhores resultados relacionados ao crescimento de mudas condicionadas a estresse hídrico, e em condições normais, respectivamente (Hussain et al., 2017; Guleria et al., 2014). Em relação à inoculação com consórcios microbianos, Mohan et al. (2015) estabeleceram um inoculante constituído de três cepas PGPR (*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus coagulans* e *Trichoderma harzianum*) e o fungo micorrízico *Glomus macrocarpum*, quando aplicados na germinação de sementes de *Albizia lebbek*, obtiveram taxas de biomassa, absorção de nitrogênio e fósforo maiores que nas plantas não inoculadas, além de maior porcentagem de colonização micorrízica e números de esporos.

Em relação à ineficácia da promoção de crescimento das plantas inoculadas com os consórcios bacterianos, pode-se sugerir: o estabelecimento insatisfatório dos isolados como comunidade microbiana no substrato, o método de inoculação, uma possível lavagem das células microbianas durante a irrigação, e até mesmo as espécies escolhidas para o teste *in vivo*, que podem ter desempenhado uma interação neutra com as plantas. Bruto et al. (2014) sugerem que a promoção de crescimento de plantas resultante da inoculação com cepas de PGPR possa estar sob regulação de *crosstalk* molecular específico entre os isolados utilizados no consórcio associativo, e, portanto, esta interação nem sempre é bem-sucedida. Assim, fazem-se necessários estudos de ajuste fino sobre este mecanismo de *crosstalk* a fim de ajustar a interação entre as cepas de PGPR utilizadas e a planta. Além disso, a inoculação com as cepas de PGPR podem ter surtido algum estresse biótico que tenha afetado negativamente o desenvolvimento da planta (Souza et al., 2020). Não foi avaliado o crescimento destas plantas em condições estressantes, como o plantio das mesmas em substrato constituído de tecnossolo resultante do derramamento do minério de ferro, o que poderia ter ressaltado o efeito da inoculação das bactérias PGPR, evidenciado pelo aumento da rusticidade das mesmas.

### 3.2. Avaliação da colonização micorrízica

Como observado, ainda que não tenham sido encontradas estruturas de associações micorrízicas nas mudas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (inoculadas ou não com FMA), a inoculação com FMA promoveu o maior desenvolvimento das plantas (Figura 12).

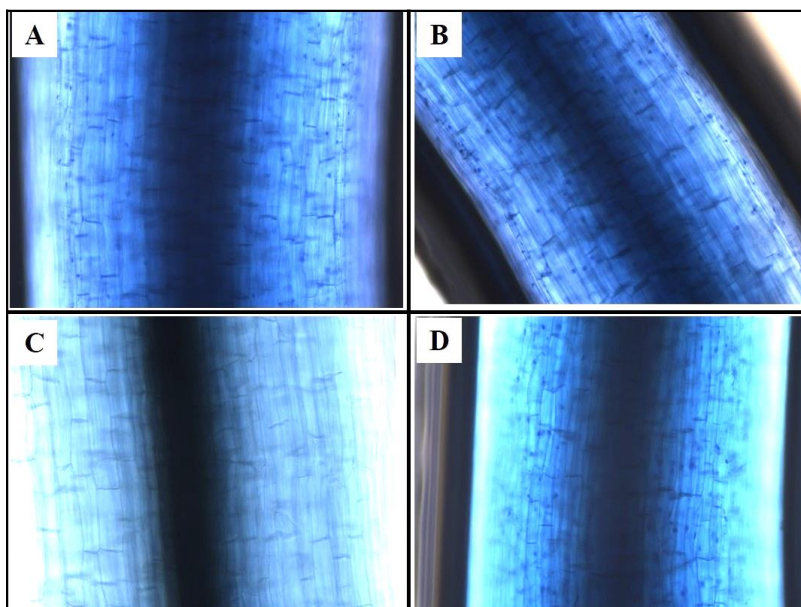


Figura 12 - Micrografias de raízes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake. A e B: raízes de mudas sem inóculo de FMA, C e D: raízes de mudas inoculadas com FMA. Aumento final de 200X.

Entretanto, em algumas amostras de raízes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth e de *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart inoculadas com FMA foram observadas a presença de estruturas similares a esporos fúngicos, hifas e vesículas (Figura 13 e 14).

Em *Caesalpinia peltophoroides* Benth, as amostras das raízes das plantas inoculadas com BRPB 11 + FMA apresentaram 27,78 % de colonização micorrízica pela presença de esporos. Em *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, o tratamento BRPB 38 + FMA apresentou 68,9 % de colonização micorrízica por esporos e o tratamento C3 + FMA apresentou 5,55 % de colonização micorrízica por hifas e vesículas fúngicas. Tais resultados podem evidenciar a presença de alguma interação ou prever a formação de possíveis interações micorrízicas, porém, não foi possível afirmar que estas estruturas são, de fato, resultantes da inoculação com FMA, pois podem ser resultantes de associações com outros fungos ou bactérias endofíticas.

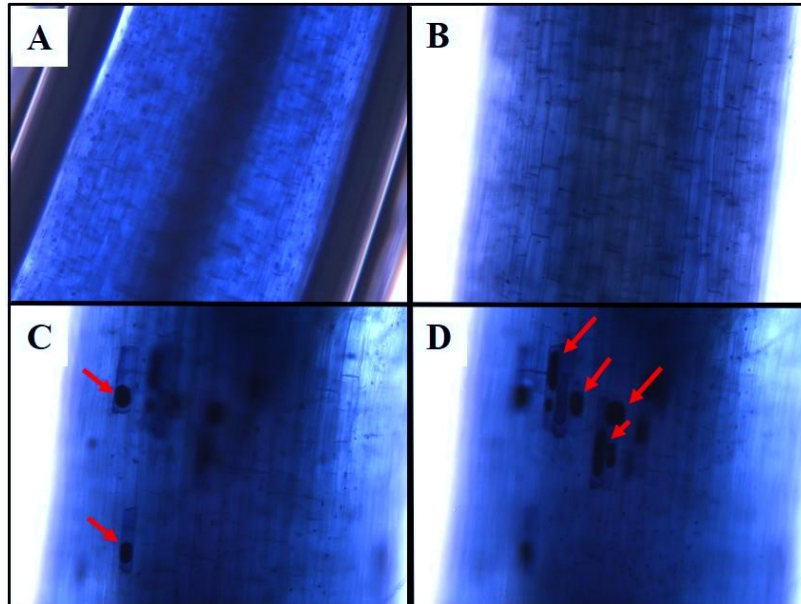


Figura 13 - Micrografias de raízes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. A e B: raízes de mudas sem inóculo de FMA, C e D: raízes de mudas inoculadas com FMA onde se pode observar a presença de possíveis esporos fúngicos (setas vermelhas). Aumento final de 200X.

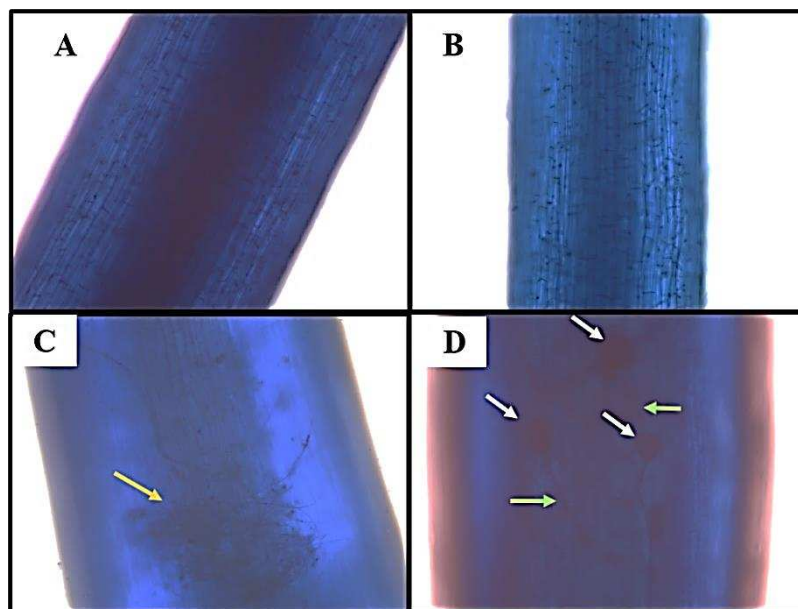


Figura 14 - Micrografias de raízes de *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart. A e B: plantas sem inóculo de FMA, C e D: plantas inoculadas com FMA, com emaranhado de hifas (seta laranja) e vesículas (setas brancas), conectadas por hifas (setas verdes).

A inoculação de FMA, seguida da colonização micorrízica, depende de muitos fatores como infectividade, estabelecimento e capacidade de manter a colonização na raiz (Oliveira et al., 2015). Alguns dos fatores importantes na colonização de FMA em raízes de plantas são a

disponibilidade de fósforo e de nitrogênio nos solos, que limitam a produção de esporos e o desenvolvimento de hifas (Smith e Read, 1997; Douds e Schenck, 1990). As plantas que vivem em solos com alta disponibilidade de P são capazes de adquirir este nutriente de forma suficiente e tendem a inibir o estabelecimento da colonização das raízes, limitando as fontes de carbono que seriam utilizadas pelo fungo para seu crescimento e reprodução (Hung e Sylvia, 1988).

O substrato utilizado nos tratamentos que receberam adição de inóculo de FMA produzido pelo método *on farm*, de fato, estimularam o maior crescimento das plantas. A utilização de solo não estéril como constituinte do inóculo *on farm* é também uma fonte de propágulos para outros FMA, contribuindo para um inóculo taxonomicamente mais diverso (Schlemper et al., 2014). Sabe-se que a composição do substrato *on farm* de FMA se constitui também pela presença de outros microrganismos, até mesmo PGPR, que venham a beneficiar a qualidade biológica do solo e suprimir as deficiências nutricionais das plantas (Douds et al., 2006; Hoitink e Fahy, 1986). Além disso, há relatos de que inóculos micorrízicos produzidos *on farm* com compostos variados apresentam valores de propágulos infecciosos maiores do que aqueles relatados para outros solos, representando uma boa alternativa para a inoculação de mudas de plantas destinadas a revegetação de áreas degradadas, lavouras, entre outros (Douds et al., 2006). Assim, a promoção do crescimento das espécies florestais testadas neste trabalho pode ter sido estimulada pela presença de outras PGPR vindas do inóculo de FMA *on farm*.

A falta ou pouca evidência de colonização radicular por FMA nas espécies vegetais analisadas pode ter sido subestimada pelas amostras de raízes utilizadas para as análises microscópicas sobre a colonização radicular, ou ainda, o tempo de cultivo das plantas pode não ter sido o suficiente para a formação de estruturas micorrízicas (Schlemper et al., 2014). No entanto, de acordo com o presente estudo, é evidente o alto potencial do substrato *on farm* de FMA na promoção do crescimento das mudas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth, *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart.

#### 4. Conclusões

O inóculo de FMA *on farm* foi capaz de contribuir para o crescimento das espécies florestais nativas: *Caesalpinia peltophoroides* Benth, *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart em condições de viveiro. As plantas inoculadas com as

espécies de PGPR não apresentaram maior crescimento. Sendo assim, dentre as perspectivas deste estudo, é necessário estudar e testar outras metodologias de inoculação de PGPR mais eficientes para estabelecimento dos microrganismos no espaço rizosférico das plantas inoculadas, novas formulações de consórcios para estas espécies de arbóreas, bem como o cultivo das mudas inoculadas em condições de crescimento estressantes, semelhantes às condições de campo.

## 5. Referências Bibliográficas

ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Newman-Keuls test and Tukey test. **Encyclopedia of Research Design**, p. 1-11, 2010.

ALMEIDA, D. S. de. **Recuperação Ambiental da Mata Atlântica**. Editus, 2016.

BHUSHAN, G. et al. Role of arbuscular mycorrhiza fungi on tolerance to salinity of the tree legume *Albizia lebbek* (L.) inoculated by *Rhizobium*. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 2, n. 01, p. 45-50, 2014.

BIANCHI, M. de O. et al. Macrofauna edáfica como indicadora em revegetação com leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.

BRUTO, M. et al. Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2014.

CARVALHO FILHO, A. et al. Iron oxides in soils of different lithological origins in Ferriferous Quadrilateral (Minas Gerais, Brazil). **Applied Clay Science**, v. 118, p. 1-7, 2015.

CARVALHO, P. E. R. Farinha-Seca-*Albizia niopoides*. **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

CELY, M. VT et al. Inoculation of *Schizolobium parahyba* with mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria increases wood yield under field conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1708, 2016.

CUNHA, J. de F. et al. Potencial de rizobactérias no crescimento de mudas de sibipiruna (*caesalpinia peltophoroides* BENTH). **Revista Árvore**, v. 37, n. 2, p. 211-218, 2013.

DOUDS JR, D. D. et al. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 809-818, 2006.

FARINA, R. et al. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, v. 55, p. 44-52, 2012.

FREITAS, S. R.; HAWBAKER, T. J.; METZGER, J. P. Effects of roads, topography, and land use on forest cover dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 259, n. 3, p. 410-417, 2010.

GIANNINI, T. C. et al. Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. **Austral Ecology**, v. 42, n. 5, p. 510-521, 2017.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, p. 489-500, 1980.

GULERIA, V. et al. Species specific *Rhizobium* inoculation on seedling growth of *Albizia lebbek* and *Acacia catechu* under water stress conditions. **Science International**, v. 2, n. 2, p. 51-56, 2014.

HOITINK, H. AJ; FAHY, P. C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 93-114, 1986.

HUNG, L. L.; SYLVIA, D. M. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 353-357, 1988.

HUSSAIN, S. K. et al. Characterization and evaluation of plant growth promoting *Pseudomonas* isolated from rhizosphere of *Acacia nilotica* and *Albizia lebbek*. **Indian Journal of Agricultural Research**, v. 51, n. 4, 2017.

KUMAR, K. et al. Isolation and characterization of rhizobacteria associated with coastal agricultural ecosystem of rhizosphere soils of cultivated vegetable crops. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27(7), 1625-1632, 2011.

JORDAO, T. C. et al. Shifts in Arbuscular Mycorrhizal fungal properties due to vegetative remediation of mine spoil contamination from a dam rupture in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 162, p. 103885, 2021.

JÚNIOR, P. P. et al. Extensão em Microbiologia: mudas inoculadas com microrganismos benéficos na bacia do rio Doce. **Revista Ciência em Extensão**, v. 16, p. 332-343, 2020.

LORENZI, H. **Árvores Exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003.

MASSEY JR, F. J. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. **Journal of the American Statistical Association**, v. 46, n. 253, p. 68-78, 1951.

MATIAS, S. R. et al. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 3, p. 259-266, 2009.

MEHBOOB, I. et al. Potential of rhizobia for sustainable production of non-legumes. In: **Crop Production for Agricultural Improvement**. Springer, Dordrecht, 2012. P. 659-704.

MINITAB, L. L. C. Minitab. 2013.

MOHAN, R. et al. Interaction between AM fungus and PGPR on growth of *Albizia lebbek*. 2015.

MOURA, G. G. D. de et al. Rhizobia isolated from coal mining areas in the nodulation and growth of leguminous trees. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, 2016.

OLIVEIRA, G. P. J. R. et al. Plant growth-promoting microbial inoculant for *Schizolobium parahyba* pv. *Parahyba*. **Revista Árvore**, v. 39, n. 4, p. 663-670, 2015.

OLIVEIRA PRADO, I. G. de et al. Revegetation process increases the diversity of total and arbuscular mycorrhizal fungi in areas affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 141, p. 84-95, 2019.

PAN, J. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting bacteria (PGPR) inoculations on *Elaeagnus angustifolia* L. in saline soil. **Applied Sciences**, v. 10, n. 3, p. 945, 2020.

PONTES, C. A. et al. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth.(sibipiruna). **Revista Árvore**, v. 30, p. 43-48, 2006.

PRZEMIENIECKI, S. W. et al. Bacteria isolated from treated wastewater for biofertilization and crop protection against *Fusarium* spp. Pathogens. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2019.

PUSZTAHELYI, Tünde; HOLB, Imre J.; PÓCSI, István. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 573, 2015.

RASANEN, L. et al. Effects of biotic and abiotic constraints on the symbiosis between rhizobia and the tropical leguminous trees *Acacia* and *Prosopis*. 2003.

REZENDE, C. L. et al. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 16, n. 4, p. 208-214, 2018.

RIBEIRO, I. D. A. et al. Antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities of *Bacillus* isolates from canola (*Brassica napus* L.) roots. **Microbiological Research**, v. 248, p. 126754, 2021.

RODRIGUES NETO, J. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathol**, v. 12, p. 16, 1986.

SCHLEMPER, T. R.; STÜRMER, S. L. On farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes. **Mycorrhiza**, v. 24, n. 8, p. 571-580, 2014.

SIVIERO, M. A. et al. Interaction among N-fixing bacteria and AM fungi in Amazonian legume tree (*Schizolobium amazonicum*) in field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n. 2, p. 144-152, 2008.

SHELAT, H. et al. Biofertilizers and PGPR for evergreen agriculture. **Microorganisms in Sustainable Agriculture, Food, and the Environment**, p. 283-312, 2017.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic press, 2010.

SOUZA, N. L. et al. Differential impacts of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on seeds of neotropical tree species with contrasting tolerance to shade. **Trees**, v. 34, n. 1, p. 121-132, 2020.

WANG, C. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria isolation from rhizosphere of submerged macrophytes and their growth-promoting effect on *Vallisneria natans* under high sediment organic matter load. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 726-736, 2021.

ZHOU, W. et al. Soil sterilization and plant growth-promoting rhizobacteria promote root respiration and growth of sweet cherry rootstocks. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61, n. 3, p. 361-370, 2015.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Isolados de PGPR oriundos do solo afetado por rejeito de mineração da região de Paracatu de Baixo-MG, foram identificados e caracterizados quanto a diversos mecanismos de promoção de crescimento de plantas. No presente estudo foram encontrados 10 gêneros bacterianos e dentre os isolados testados, 78 % se apresentaram como fixadores biológicos de nitrogênio, 40 % foram capazes de realizar solubilização de fosfato, 40 % são produtoras de sideróforos, três isolados produziram AIA, e, por fim, a maioria dos isolados foram capazes de sintetizar giberelinas a taxas de concentração variando de 0,37 a 3,70 mg mL<sup>-1</sup>. Com base nos melhores resultados para pelo menos 3 dos testes *in vitro* realizados, foi possível formular quatro consórcios, combinando PGPR potenciais, que foram constituídos por linhagens pertencentes a *Enterobacter cloacae*, *E. hormaechei*, *Luteibacter* sp., *Staphylococcus* sp. e *S. warneri*.

A formulação de consórcios PGPR, assim como a inoculação de substratos com FMA *on farm*, para a produção de mudas de espécies florestais nativas de Mata Atlântica, visando a recuperação de áreas degradadas é um importante método para a obtenção de mudas de melhor qualidade e para a conservação da biodiversidade do solo.

Neste trabalho, não foi observado efeito significativo na promoção de crescimento das plantas inoculadas com os consórcios PGPR, assim como a interação PGPR:FMA. Porém, foi possível observar notório estímulo na promoção de crescimento de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, *Caesalpinia peltophoroides* Benth e *Albizia niopoides* (Spruce ex Benth) Burkart, diante da inoculação com FMA *on farm* no cultivo em casa de vegetação. Assim, diante das perspectivas de formulação de consórcios microbianos para a produção de mudas de melhor qualidade para plantio em campo, o substrato constituído de FMA *on farm* mostrou-se promissor.

Por fim, fazem-se necessários estudos relacionados a metodologias de inoculação mais eficientes para o estabelecimento da comunidade microbiana do solo, assim como estudos relacionados à interação, funções ecológicas e rastreabilidade destes microrganismos, para um melhor entendimento dos resultados obtidos.