



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Edenilson Meyer

**Aplicação de Inoculantes Microbianos em Espécies Herbáceas  
Empregadas na Revegetação de Áreas de Mineração de Carvão em  
Recuperação**

Florianópolis

2022

Edenilson Meyer

**Aplicação de Inoculantes Microbianos em Espécies Herbáceas  
Empregadas na Revegetação de Áreas de Mineração de Carvão em  
Recuperação**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Ciência.

Orientador: Prof., Dr. Paulo Emílio Lovato

Coorientador: Prof., Dr. Cláudio Roberto F.S. Soares

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Meyer, Edenilson

Aplicação de Inoculantes Microbianos em Espécies Herbáceas Empregadas na Revegetação de Áreas de Mineração de Carvão em Recuperação / Edenilson Meyer ; orientador, Paulo Emilio Lovato, coorientador, Cláudio Roberto Fonseca Souza Soares, 2022.

125 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. microrganismos . 3. atividade enzimática. 4. absorção de nutrientes. 5. disponibilidade de nutrientes. I. Lovato, Paulo Emilio. II. Soares, Cláudio Roberto Fonseca Souza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Edenilson Meyer

**Aplicação de Inoculantes Microbianos em Espécies Herbáceas Empregadas na  
Revegetação de Áreas de Mineração de Carvão em Recuperação**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora  
composta pelos seguintes membros:

Prof. Sidney Luiz Sturmer, Dr.

Instituição: FURB - Depto. Ciências Naturais

Prof. Sergio Miana De Faria, Dr.

Instituição: Embrapa Agrobiologia/ Seropédica RJ

Pós Doutoranda Anabel Hernández, Dr.(a)

Instituição: UFSC - MIP/CCB

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado  
adequado para obtenção do título de Doutorado em Ciência.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Paulo Emílio Lovato, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela bolsa de estudos. Ao CNPq pelo auxílio financeiro que permitiu a realização da minha tese. Ao programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) e a UFSC pela oportunidade.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e ao Laboratório de Pesquisa e Extensão em Agroecologia (NEPEA-SC) da UFSC que disponibilizou equipamentos e suporte para realização de muitas das minhas análises.

A CPRM, em especial ao Nei, pela disponibilização da área e pelo suporte para implantação e condução do experimento a campo e a Edilane Rocha-Nicoleite que muito contribuiu para que fosse possível a implantação do experimento a campo.

A EMBRAPA Agrobiologia, em especial ao Sergio Miana de Faria e ao Jerri Zilli, pela disponibilização de microrganismos e demais contribuições para realização deste estudo.

Um agradecimento especial a toda minha família, por todos os ensinamentos e momentos vividos. Por sempre terem me apoiado e incentivado a continuar nesse caminho.

Ao meu orientador Dr. Paulo Emílio Lovato, por todos os ensinamentos e crescimento profissional que me proporcionou desde o Mestrado até a finalização do Doutorado. Ao meu coorientador e amigo de pescarias, Dr. Cláudio R.F.S. Soares, que me acompanhou desde o início da minha graduação até a conclusão do Doutorado, e muito me ensinou, trazendo muito crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Admir José Giachini, Prof. Marcio José Rossi e ao Marcio Roberto Schneider pela amizade e por todo o conhecimento e oportunidades ao longo da minha jornada dentro da UFSC.

A todos os professores do LAMPB e do NEPEA que de alguma forma me ajudaram e trouxeram ensinamentos durante esse período de realização do doutorado, em especial ao professor Rubens Duarte, Cledimar R. Lourenzi, Arcângelo Loss e Jucinei Comin.

A Anna Flávia Neri por todo o apoio e ajuda na realização dos experimentos e análises, sou muito grato por tudo, sem sua ajuda não conseguiria ter finalizado essa tese.

A Shantau C.G. Stoffel, pela amizade de longa data e toda a ajuda na realização dos estudos e revisões da tese.

Aos meus colegas e amigos do laboratório ecologia do solo que estiveram presentes em tantos momentos importantes, em especial a Barbara S. Ventura, Eliana, Juliana Scarsanella, Leonardo Giovanetti, Marcelo B. Agudelo e Fernanda Kokowics.

A todos meus colegas e amigos do laboratório de microbiologia e processos biotecnológicos, em especial ao André Steiner Vieira, Lander de Souza, Andressa Danielli Canei, Emanuella Pille, Anabel G. Hernández, Joana C. Lopes, João, Isabela M. Augustini, Sabrina Cavalcante, Renata Silveira e Willian Suguino.

A todos meus colegas e amigos do NEPEA, em especial ao Guilherme Wilbert Ferreira, Lucas Dupont Giumbelli, Thiago S. dos Santos, Talita Trapp. Monique Souza Teixeira, Samya Uchoa, Juliana Gress Bortolini e Marcos Hollas.

Aos amigos Valdeir Pereira de Lima, Mariana M. Niero, Andressa Hilha, Lenon Modesto, Juliana Santos, Anyela R. Molina, Cleiton Junior, Marcia Regina e Tais Morais Barbosa por todos os momentos, trilhas, cafês e conversas compartilhadas.

A todos os alunos de iniciação científica que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento dessa tese, em especial a Clarissa C. Facco, Thaynara Romão, Luciano S. Cardoso, Juliana M. Floothuis, Ana C. Farias, Juliano Machado, Maria G. Carniel, Lucas Mendes e Luiz F. de Souza.

Também agradeço aos membros da banca de qualificação e de tese, que muito contribuíram para a elaboração desse documento. Em especial ao Sergio Miana de Faria, Sidney L. Sturmer, Rafael Dutra de Armas, Ana Catarina Jakovac, Osmar Klauberg Filho e Anabel González Hernández.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

A todos, meu muito obrigado.

## RESUMO

O carvão mineral tem importância econômica mundial, mas sua extração causa danos ambientais, como acidificação de solos e águas e aumento na disponibilidade de elementos traço tóxicos nos ecossistemas. Uma das técnicas usadas para recuperação dessas áreas é a revegetação, por meio da implantação de espécies vegetais pioneiras. No processo inicial de recuperação implantam-se espécies herbáceas e posteriormente arbóreas. As espécies utilizadas na recuperação dessas áreas podem desenvolver associação com microrganismos promotores de crescimento vegetal, como fungos micorrízico arbusculares (FMA) e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), mas poucos são os trabalhos a campo utilizando inoculantes microbianos. Este trabalho visou avaliar, em casa de vegetação e a campo, como inoculantes comerciais a base de FMA e BPCP atuam sobre o crescimento de herbáceas pioneiras, a atividade enzimática do solo e a disponibilização de nutrientes. O experimento a campo foi formado de um consórcio de *Lablab purpureus*; *Paspalum notatum*, *Crotalaria juncea*, *Neonotonia wightii*, *Stylosanthes guianensis*, *Andropogon gayanus* e *Trifolium repens*, inoculadas separadamente ou coinoculadas com inoculante comercial de *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR<sup>TM</sup>) e *Azospirillum brasilense*. Aos 75 e 180 dias mediram-se massa seca das plantas e concentração e acúmulo de N e P. Foram coletadas amostras de solo para determinar glomalina, fosfatase ácida e atividade da diacetato de fluoresceína (DAF). Aos 180 dias, foi realizada uma caracterização fitossociológica das plantas espontâneas presentes na área. Os microrganismos promoveram maior atividade biológica do solo e maior produção de biomassa vegetal (62-89%) e acúmulo de P e N (34-75% e 70-85%) nas plantas em comparação com a testemunha não inoculada. *C. juncea* teve o maior acúmulo de biomassa aos 75 e 180 dias (67% e 76% do total), seguida pelo *L. purpureus* (3% e 0,5% do total), enquanto as outras espécies implantadas não se estabeleceram. Aos 180 dias, vinte espécies de plantas espontâneas foram encontradas crescendo na área, principalmente da família Poaceae (74%), sugerindo que as espécies pioneiras presentes na área não dificultam o processo de sucessão ecológica. A inoculação de *R. intraradices* e *A. brasilense*, isolados ou combinados, promoveu o aumento da atividade biológica do solo, o crescimento de espécies pioneiras chave e o acúmulo de nutrientes, mostrando a eficiência desta técnica para a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão. O experimento em casa de vegetação foi realizado com *C. juncea* com inoculação e coinoculação de três grupos de microrganismos: *Bradyrhizobium* sp. - BR 2001 (com e sem inoculação), *A. brasilense* - Abv5 (com e sem inoculação) e inoculação com fungos

micorrízicos arbusculares (FMA) (sem inoculação, com *R. intraradices* - Rootella BR ou *Rhizophagus clarus* - UFSC 14). Aos 90 dias após a semeadura o experimento foi coletado para determinação da massa seca da parte aérea e raízes das plantas, teor e acúmulo de N, P, K, Ca e Mg. Também foram coletadas amostras de solo para determinar a atividade enzimática (hidrólise de diacetato de fluoresceína – DAF e fosfatase ácida), teor de glomalina e disponibilidade de nutrientes (P, K, Ca e Mg) do solo. Todos os microrganismos promoveram incrementos de massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz e acúmulo de nutrientes na MSPA da *C. juncea*, quando em coinoculação. O aumento da produção de biomassa e acúmulo de nutrientes estão ligados ao aumento da atividade enzimática da DAF e fosfatase ácida no solo. O teor de Glomalina foi afetado somente pela inoculação dos FMA, sem diferenças entre eles. Ficou evidente que o aumento da complexidade do sistema com a adição de microrganismos com funções complementares promove o crescimento vegetal. Os dois FMA promoveram incrementos no crescimento das plantas, mas *R. clarus* (autóctone da área) teve desempenho superior na maioria das variáveis analisadas. Foram comprovados os benefícios da inoculação com produtos comerciais e com microrganismos obtidos na área em recuperação para promoção de crescimento vegetal de *C. juncea*, espécie pioneira para uso em processos de recuperação ambiental.

**Palavras-chave:** microrganismos, atividade enzimática, absorção de nutrientes, disponibilidade de nutrientes



## ABSTRACT

Coal mining is economically important worldwide, but mining causes environmental damage, such as soil and water acidification and increased availability of toxic trace elements. A technique used to recover degraded areas, revegetation involves the establishment of pioneer plant species. During the initial recovery process, herbaceous species are sown, followed by tree species. Plants used to recover these areas can develop associated with various microorganisms that promote their growth, such as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant-growth-promoting bacteria (PGPB). Few field studies have used microbial inoculants. This work aims to evaluate, in greenhouse and field conditions, how AMF and PGPB commercial inoculants affect the growth of pioneer herbaceous plants, soil enzyme activity, and soil nutrient availability. The field experiment consisted of a consortium of *Lablab purpureus*, *Paspalum notatum*, *Crotalaria juncea*, *Neonotonia wightii*, *Stylosanthes guianensis*, *Andropogon gayanus*, and *Trifolium repens*, inoculated with commercial inoculants of *Rhizophagus intraradices* (Rootella BRTM) and *Azospirillum brasilense*, applied separately or co-inoculated. At 75 and 180 days, plant dry mass and N and P tissue concentration and accumulation P were measured. Soil samples were collected to determine glomalin content and acid phosphatase and fluorescein diacetate (FDA) activities. At 180 days, spontaneous plants' phytosociological characterization was performed. The microorganisms increased soil biological activity and plant biomass (62-89%) and P and N accumulation (34-75% and 70-85%, respectively) compared to the non-inoculated control. *C. juncea* yielded the highest biomass at 75 and 180 days (67% and 76% of the total), followed by *L. purpureus* (3% and 0.5%), while the other species did not grow. At 180 days, 20 spontaneous plant species were found in the area, mainly from the Poaceae family (74%), suggesting that the pioneer species do not hinder the ecological succession process. Inoculation of *R. intraradices* and *A. brasilense*, alone or combined, increased soil biological activity, growth of key pioneer species, and tissue nutrient accumulation, showing that the technique is efficient in recovering areas degraded by coal mining. The greenhouse experiment had *C. juncea* with inoculation and co-inoculation of three groups of microorganisms: *Bradyrhizobium* sp. - BR 2001, *A. brasilense* - Abv5, and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (*R. intraradices* - Rootella BR or *Rhizophagus clarus* - UFSC 14). At 90 days after sowing, all microorganisms increased shoot and dry root mass (RDM) and shoot tissue nutrient accumulation with co-inoculation. The increase in biomass production and nutrient accumulation is linked to increased soil FDA and

acid phosphatase activity, associated with higher nutrient availability in the soil. Glomalin content was affected only by AMF inoculation, with no differences among them. It was shown that increasing the system's complexity by adding microorganisms with complementary functions promotes plant growth. Both AMF species increased plant growth, but *R. clarus* (native to the area) had better performance in most of the variables. In summary, the study proved the benefits of inoculation with commercial products and with microorganisms obtained from the area under reclamation to promote the growth of *C. juncea*, a pioneer plants species for use in environmental reclamation processes.

**Keywords:** microorganisms, enzymatic activity, nutrient uptake, nutrient availability

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figure 1. Dry biomass of *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus*, and spontaneous plants, 75 days (a) and 180 days (a) after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. Error bars with confidence interval (CI) of 95% separating the different treatments. Different letters indicate significant difference by CI at 5 % error probability level..... 58

Figure 2. Mycorrhizal colonization of a pool of roots of *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus* and spontaneous species, 75 days (a) and 180 days (b) after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO) or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. Error bars with confidence interval (CI) of 95% separating the different treatments. Different letters indicate significant differences at a 5% error probability level by CI. .... 58

Figure 3. Phosphorus and nitrogen accumulation of *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus*, and spontaneous plants, 75 days (A) and 180 days (B) after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. Error bars with confidence interval (CI) of 95% separating the different treatments. Different letters indicate significant difference by CI at 5% error probability level..... 60

Figure 4. Principal component analysis (PCA) of variables of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in two samplings (75 days and 180 days after sowing) in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. PA = P accumulation; NA = N accumulation; FDA = hydrolysis of fluorescein diacetate; EEG = easily extractable glomalin; TG = total glomalin. .... 62

### CAPÍTULO 2

Figura 1. Matéria seca da parte aérea (MSPA) (A), matéria seca da raiz (MSR) (B) e matéria seca total (MST) (C) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos

arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp..... 84

Figura 2. Nitrogênio (A) e fósforo (B) acumulados na matéria seca da parte aérea (MSPA) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp..... 86

Figura 3. Potássio (A), Cálcio (B) e Magnésio (C) acumulados na matéria seca da parte aérea (MSPA) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp..... 87

Figura 4. Atividade enzimática avaliada pela análise de diacetato de Fluoresceína (DAF) (A) e Fosfatase ácida (B) de solo cultivado com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp. F = Fluoresceína. .... 88

Figura 5. Análise dos fatores simples *Bradyrhizobium* (A), *A. brasilense* (B) e FMA (C) para glomalina facilmente extraível (GFE) de solo cultivado com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras

maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp. F = Fluoresceína..... 90

Figura 6. Desdobramento dos efeitos da interação dos tratamentos com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14) sobre a disponibilidade de Potássio (A), Cálcio (B) e Magnésio (C) no solo ao final do cultivo. Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo e letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* sp para gráfico A e C. Para o gráfico B, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp. FMA = Fungos Micorrízicos Arbusculares. .... 92

Figura 7. Correlação das variáveis do solo com as variáveis associadas ao crescimento vegetal em experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Os dados da correlação de Pearson foram classificados de acordo com Mukaka (2012) como insignificante (0 a 0,30), baixo (0,30 a 0,50), moderado (0,50 a 0,70), alta (0,7 a 0,90) e muito alta (>0,9). .... 93

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Table 1. Phosphorus (P) and nitrogen (N) concentrations (mean±CI) in *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus*, and spontaneous plants, 75 and 180 days after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO) or not inoculated (NI), in a Coal-mining region undergoing environmental recovery process. .... 59

Table 2. Soil glomalin (easily extractable (GEE), difficult to extract (GDE) and total (GT)), hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) and acid phosphatase activity 75 days and 180 days after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process..... 61

### CAPÍTULO 1 – MATERIAL SUPLEMENTAR

Table S1. Families and species of spontaneous plants with the respective relative dry biomass (RDB) of each species and P and N concentrations, 180 days after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO) or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process.....73

### CAPÍTULO 2 – MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de Matéria seca da parte aérea (MSPA), Matéria seca da raiz (MSR) e Matéria seca total (MST) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14)..... 116

Tabela S2. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de teor de N, P, K, Ca e Mg na MSPA de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e fungos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *R. clarus* (UFSC 14))..... 116

Tabela S3. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de acúmulo de N, P, K, Ca e Mg na MSPA de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação

de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e fungos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *R. clarus* (UFSC 14))..... 117

Tabela S 4. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de Fosfatase ácida e Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (DAF) do solo de experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14)..... 117

Tabela S 5. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de Glomalina facilmente extraível (GFE), dificilmente extraível (GDE) e total (GT) do solo de experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *R. clarus* (UFSC 14)..... 118

Tabela S6. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de P (Mehlich I e Resina) e K disponível (Mehlich I) e Ca e Mg disponível em solo de experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14)..... 118

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
2.1	HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DO CARVÃO MINERAL.....	22
2.2	DEGRADAÇÃO AMBIENTAL CAUSADA PELA EXTRAÇÃO DE CARVÃO MINERAL 22	
2.3	RECUPERAÇÃO AMBIENTAL DE ÁREAS IMPACTADAS PELA MINERAÇÃO DE CARVÃO.....	24
2.4	ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS NO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO VEGETAL 25	
2.5	USO DE MICRORGANISMOS NA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS.....	26
2.6	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP) ..	28
2.7	FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA).....	29
2.8	CO-INOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS EM PLANTAS .	31
2.9	ATIVIDADES MICROBIOLÓGICAS E ENZIMÁTICAS NO SOLO COMO BIOINDICADORES .....	32
2.10	REFERÊNCIAS .....	35
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES E OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
3.1	HIPÓTESES .....	47
3.2	OBJETIVOS .....	47
<b>3.2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 1 – <i>Rhizophagus intraradices</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> promovem o aumento da atividade biológica do solo e crescimento de plantas herbáceas em área de mineração de carvão em recuperação.....</b>	<b>49</b>
4.1	Resumo expandido em português do capítulo .....	49
4.2	<i>Rhizophagus intraradices</i> and <i>Azospirillum brasilense</i> Inoculation Improves Soil Biological Activity and Growth of Herbaceous Plants in a Recovering Coal-Mining Area....	51
4.3	ABSTRACT .....	51
4.4	INTRODUCTION .....	53
4.5	MATERIAL AND METHODS.....	55
<b>4.5.1</b>	<b>General Description.....</b>	<b>55</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Plant Tissue Analysis.....</b>	<b>56</b>
<b>4.5.3</b>	<b>AMF Root Mycorrhizal Colonization and Soil Glomalin.....</b>	<b>56</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Fluorescein diacetate (FDA) and acid phosphatase analysis .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Statistical Analysis .....</b>	<b>57</b>
4.6	RESULTS .....	57
4.7	Discussion.....	62



4.8	Conclusion .....	66
4.9	References .....	66
4.10	Supplementary Material .....	74
<b>5</b>	<b>-CAPÍTULO 2 - <i>Bradyrhizobium</i>, <i>Azospirillum brasilense</i> E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PROMOVEM O CRESCIMENTO VEGETAL DE <i>Crotalaria juncea</i> EM SOLO DE ÁREA DE MINERAÇÃO DE CARVÃO.....</b>	<b>75</b>
5.1	Introdução .....	77
5.2	Material e Métodos .....	80
<b>5.2.1</b>	<b>Descrição Geral.....</b>	<b>80</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Análise de tecido vegetal .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Análise de P, K, Ca e Mg disponível no solo .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Teor de Glomalina no solo .....</b>	<b>82</b>
<b>5.2.5</b>	<b>Análise de Diacetato de Fluoresceína (DAF) e Fosfatase ácida.....</b>	<b>82</b>
<b>5.2.6</b>	<b>Análise Estatística .....</b>	<b>82</b>
5.3	Resultados.....	83
<b>5.3.1</b>	<b>Biomassa Vegetal .....</b>	<b>83</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Teor e Acúmulo de N, P, K, Ca e Mg na biomassa seca da parte aérea .....</b>	<b>85</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Hidrólise de diacetato de fluoresceína (DAF) e atividade da fosfatase ácida.</b>	<b>88</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Teores de glomalina do solo .....</b>	<b>89</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Disponibilidade de nutrientes no solo .....</b>	<b>90</b>
<b>5.3.6</b>	<b>Correlação entre variáveis do solo e atributos de crescimento das plantas ...</b>	<b>93</b>
5.4	Discussão .....	94
5.5	Conclusões.....	100
5.6	Referências .....	101
5.7	MATERIAL SUPLEMENTAR .....	116
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS .....</b>	<b>120</b>
<b>7.1</b>	<b>Determinação do teor de fósforo (p) em extratos (solo e planta) .....</b>	<b>120</b>
<b>7.2</b>	<b>Determinação da hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF).....</b>	<b>121</b>
<b>7.3</b>	<b>Determinação atividade da fosfatase ácida no solo .....</b>	<b>123</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O carvão mineral é uma importante fonte de energia (HARDIN, 2013), no entanto, sua extração causa considerável poluição ambiental desde a extração até a combustão. A produção carbonífera no Brasil situa-se principalmente na região Sul; Santa Catarina contribui com cerca de 40% do carvão nacional, e tem, conseqüentemente, muitas áreas degradadas pela atividade (DNPM, 2016). Os rejeitos derivados e a poeira gerada são importantes fontes de poluição da atmosfera, água e solo (CHEN et al., 2005; SOUZA et al., 2015). Um dos problemas mais graves nas áreas degradadas é a chamada “drenagem ácida de mina” (DAM), formada a partir da oxidação dos rejeitos de carvão mineral, quando expostos ao oxigênio e a umidade. Além da acidez que decorre da oxidação do enxofre, também se aumenta a disponibilidade de diversos elementos, como o Al, Mn, Zn, Fe, Cu e Pb. Esses elementos podem prejudicar a regeneração vegetal, sendo poucas as espécies capazes de se estabelecer em tais ambientes. Esses metais também são suscetíveis à lixiviação, com alto risco de contaminação do solo, rios e lençol freático, gerando grave problema social e ambiental nas regiões carboníferas (SILVA et al., 2013; BRANDELERO et al., 2016).

Uma das técnicas mais utilizada e considerada adequada para a recuperação destas áreas degradadas é a revegetação com o uso de espécies vegetais pioneiras associadas a microrganismos, introduzidas sobre um solo previamente construído com argila e condicionadores de solo, restabelecendo as funcionalidades do ecossistema. Para os processos de revegetação buscam-se plantas tolerantes às condições do solo contaminado, rápido crescimento, sistema radicular denso, e ainda que sejam de fácil implantação (SANTIBÁÑEZ et al., 2008).

As espécies introduzidas nessas áreas no início do processo de recuperação são herbáceas de rápido crescimento e com capacidade de elevada produção de biomassa, e que tem como papel principal evitar a erosão e incrementar matéria orgânica no solo (MOS). Comumente se utiliza um consórcio de espécies leguminosas e gramíneas por possuírem características distintas e complementares, gramíneas são muito eficientes na rápida cobertura e estabilização do solo (ARF et al., 2018) e as leguminosas no incremento de nitrogênio via fixação biológica (SOUCHIE et al., 2007). Após esse passo são iniciados os processos de recuperação ambiental, com a introdução de espécies arbóreas. As espécies usadas nos processos de recuperação, gramíneas e leguminosas, são

capazes de se associar a diversos grupos de microrganismos, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP).

Os FMA são simbiontes obrigatórios, com associação do tipo mutualística, na qual a planta supre o fungo com fotossintatos e o fungo provê à planta nutrientes e água (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Os benefícios dos FMA às plantas decorrem do aumento da absorção de nutrientes (principalmente P), amenização de estresse hídrico, auxílio no controle de patógenos, dentre outros (HWANG et al., 1992; NEWSHAM et al., 1995). Os FMA também contribuem para a estruturação e estabilidade de agregados do solo em decorrência da grande quantidade de hifas e produção de glicoproteínas denominadas glomalina (JASTROW et al., 1998; BERBARA et al., 2006; BEDINI et al., 2009).

As BPCP podem realizar fixação biológica de nitrogênio, produzir substâncias, como hormônios, que auxiliam no crescimento vegetal, e promover solubilização de fosfatos, processo realizado por alguns isolados e muito importante para o desenvolvimento das plantas (SOUCHIE et al., 2007). Essas características fazem com que esses microrganismos tenham um alto potencial de uso para promoção de crescimento vegetal. No entanto, mesmo conhecendo o potencial do uso destes microrganismos para melhorar o desenvolvimento das plantas sob condições de estresse, os planos de recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão normalmente não empregam esta técnica em projetos de revegetação.

Os microrganismos são capazes de melhorar as condições físicas, químicas e biológicas do solo por meio da produção de enzimas que participam ativamente dos ciclos biogeoquímicos, melhoram a ciclagem dos nutrientes essenciais às plantas, principalmente nos processos de recuperação ambiental, no qual se deseja que o ambiente se torne autossustentável. Desta forma, nestes processos de recuperação é extremamente importante o uso de microrganismos associados às plantas.

Microrganismos isolados de áreas degradadas, por já estarem adaptados, na maioria das vezes são mais eficientes na promoção de crescimento vegetal no processo de recuperação. No entanto, há uma dificuldade em se produzir inoculantes específicos para cada área a ser recuperada. Desta maneira, inoculantes comerciais podem ser uma boa estratégia, desde que sejam capazes de promover o crescimento vegetal das plantas de interesse nesses ambientes degradados. Também é importante destacar o baixo número de estudos com inoculação de microrganismos na recuperação de áreas degradadas a campo, um dos motivos pelo qual a inoculação ainda não se tornou uma prática usual.

As informações acima destacam a importância da realização de estudos com plantas associadas a FMA e BPCP e para desvendar os efeitos destes sobre a atividade microbiana do solo, disponibilização de nutrientes e, conseqüentemente maior crescimento e tolerância das plantas aos estresses abióticos. Estes estudos trazem informações fundamentais para o processo de recuperação de áreas degradadas, como as de mineração de carvão.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DO CARVÃO MINERAL

Grande parte da energia mundial é fornecida por combustíveis fósseis como o carvão mineral (HARDIN, 2013). Estima-se que, de todo o carvão mineral mundialmente extraído, 51 % sejam destinados à geração de energia para indústria, 39 % à geração de energia elétrica e 10 % a outros usos (IEA, 2016). Em 2016, foram extraídos 8.148 milhões de toneladas de carvão, sendo a maior quantidade retirada de reservas da Ásia e Oceania (IEA, 2016). Neste cenário, o Brasil contribui com cerca de 0,1 % de toda a produção mundial de carvão. No país, o carvão é destinado a geração de energia para os seguintes setores: elétrico (80,3 %), papel e celulose (4,8 %), cerâmicos (4,5 %), alimentos (3,6 %), cimento e petroquímica (2,4 %), siderurgia e metalurgia (1,7 %), e outros (0,3 %) (DNPM, 2015).

O Carvão mineral foi descoberto no Brasil em 1795, por técnicos ingleses que construíam ferrovias na região do baixo Jacuí, Rio Grande do Sul. No século XIX iniciaram as primeiras extrações de carvão mineral, inicialmente feita de maneira primitiva e, após a Segunda Guerra Mundial de maneira industrial (GOMES et al., 1998).

A produção carbonífera, no Brasil, situa-se principalmente na região Sul, com Rio Grande do Sul contribuindo com cerca de 58,5 %, Santa Catarina 40,0 % e Paraná com 1,5 % do carvão produzido em nível nacional (DNPM, 2016). A Bacia Carbonífera Catarinense abrange 17 municípios e uma área de aproximadamente 1.950 km<sup>2</sup> (BRASIL, 2013).

### 2.2 DEGRADAÇÃO AMBIENTAL CAUSADA PELA EXTRAÇÃO DE CARVÃO MINERAL

O carvão mineral é uma importante fonte de energia (HARDIN, 2013), mas sua extração causa considerável poluição ambiental desde a extração até a combustão. Os rejeitos derivados e a poeira gerada são importantes fontes de poluição da atmosfera, água e solo (CHEN et al., 2005; SOUZA et al., 2015).

Um dos problemas mais graves nas áreas degradadas pela mineração é a chamada “drenagem ácida de mina” (DAM), formada a partir da oxidação dos rejeitos de carvão mineral, quando expostos ao oxigênio e a umidade. Além do ácido sulfúrico formado pela

oxidação do enxofre, também são encontrados diversos elementos traços, como o Al, Mn, Zn, Fe, Cu, Pb, Se, entre outros (SILVA et al., 2013).

Os elementos traços presentes nestas áreas prejudicam a regeneração vegetal, sendo poucas as espécies capazes de se estabelecer em tais ambientes. Esses elementos também são suscetíveis à lixiviação, com alto risco de contaminação do solo, rios e lençol freático, o que pode gerar problemas ambientais e sociais nas regiões afetadas (BRANDELERO et al., 2016; HOELZEL et al., 2018). Esses contaminantes provocam uma série de consequências negativas em toda a cadeia alimentar, podendo inclusive atingir o homem (RODRIGUES; DUARTE, 2003; SANTOS et al., 2019). Em estudo realizado por Santos et al. (2018), analisando amostras de urina de crianças de áreas próximas a usinas de mineração de carvão, detectaram-se teores de Se e Zn acima dos de referência, além de outros possíveis riscos não desvendados, gerados às comunidades à jusante das carboníferas, pelo consumo de água contaminada com elementos traço.

Os maiores problemas de poluição ambiental pela mineração de carvão em Santa Catarina ocorreram no passado, quando as empresas não tinham a obrigação de seguir certas condutas durante a extração do carvão e de recuperar as áreas impactadas. Essas extrações sem nenhum cuidado deixaram sérios impactos ambientais no solo, nos recursos hídricos e no meio biótico em mais de cinco mil hectares distribuídos nas bacias hidrográficas dos rios Araranguá, Urussanga e Tubarão.

As extrações de carvão mineral realizadas no passado eram feitas predominantemente pelo método de lavra a céu aberto, utilizado para extração do carvão próximo à superfície do solo. Na lavra a céu aberto, processo altamente degradador, ocorre a eliminação da vegetação, do banco de sementes e da camada fértil do solo, impossibilitando a regeneração natural do ecossistema. Somando-se a isso, as concentrações tóxicas de elementos traços nas áreas de mineração não permitem ao ambiente reestabelecer naturalmente um ecossistema com suas funções ecológicas, sendo necessária a interferência antrópica para iniciar os processos de recuperação (ALVES e SOUZA, 2011; SHRESTHA e LAL, 2011; ADELI et al., 2013).

Tendo em vista a urgência em se realizar a recuperação dessas áreas degradadas, em 05 de janeiro de 2000, o Juiz Federal da 1ª Vara da Circunscrição Judiciária de Criciúma/SC condenou as empresas a apresentarem projetos de recuperação ambiental da região que compõe a Bacia Carbonífera do Sul do Estado (Processo nº 2000.72.04.002543-9). Em 2007 a União foi condenada como co-responsável pela

recuperação dos passivos ambientais, em razão da sua omissão no dever de fiscalização. A União também foi condenada a realizar a recuperação ambiental das empresas falidas e inadimplentes. A emissão e ajustes dos Termos de Ajustamento de Conduta - TAC do carvão em Santa Catarina ocorreram no período de 2004 a 2010 (RAVAZZOLI, 2013).

No entanto, em 2016, segundo o relatório de monitoramento dos indicadores ambientais, somente em 57 % das áreas com passivos ambientais havia ocorrido o processo inicial de recuperação ambiental, com deposição de argila e introdução vegetal (BRASIL, 2016), restando ainda muitas áreas a serem recuperadas.

### 2.3 RECUPERAÇÃO AMBIENTAL DE ÁREAS IMPACTADAS PELA MINERAÇÃO DE CARVÃO

Em ação civil pública 93.8000533-4 de Autoria do Ministério Público Federal, as empresas carboníferas de Santa Catarina e a União foram obrigadas a recuperarem a degradação ambiental gerada pela exploração de carvão mineral no Sul de Santa Catarina. A União ficou responsável pelo processo de reabilitação das áreas degradadas pela CBCA (Companhia Brasileira Carbonífera de Araranguá) e da Carbonífera Ex-Treviso, devido à insolvência das empresas, e o processo de reabilitação das áreas de responsabilidade da União foi assumido pela CPRM (Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais).

Dessas áreas impactadas, 94% devem ser recuperadas até 2029. Todo o processo de recuperação dessas áreas deve ser realizado de acordo com o guia “Critérios para recuperação ou reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão”, elaborado pelo Grupo Técnico de Assessoramento (GTA) da Ação Civil Pública nº 93.8000533-4, do Ministério Público Federal (MPF) através da Procuradoria da República do Município de Criciúma.

O processo de recuperação é, de maneira geral, executado visando ao uso futuro do local, para áreas de preservação permanente (APP), reserva legal ou instalações urbanas. Para as APP determina-se a remoção total de rejeito proveniente do beneficiamento de carvão e estéril da mineração a céu aberto que se encontram no local. Após a retirada dos rejeitos da APP, efetua-se a construção de um solo com material argiloso e condicionadores. Nessas áreas deve-se preencher com argila todo o espaço de onde se retiraram os rejeitos (CPRM, 2011).

O rejeito retirado da APP geralmente é utilizado para remodelamento das demais áreas. Após o remodelamento, a área de reserva legal recebe uma camada de no mínimo



110 cm de material argiloso, e nas áreas destinadas a instalações urbanas coloca-se uma camada de 50 cm. Todas as áreas recebem a camada superficial com o solo construído composto de material argiloso, corrigido com calcário e fertilizantes (orgânicos e/ou formulados), visando facilitar o crescimento e estabelecimento de espécies vegetais.

Todas as áreas recebem inicialmente espécies vegetais herbáceas, geralmente um consórcio de gramíneas e leguminosas. Essas espécies têm como papel principal fornecer estabilidade e adicionar MO ao solo construído. Após o estabelecimento das espécies herbáceas, as áreas de APP e reserva legal, que receberam um preparo anterior com uma camada mais espessa de argila, recebem espécies arbóreas. Já nas áreas destinadas às instalações urbanas não são utilizadas espécies arbóreas, a fim de se evitar um possível rompimento da camada de argila, o que geraria riscos de exposição de rejeitos e infiltração de água, podendo colaborar com o processo de drenagem ácida.

Para um melhor reestabelecimento da composição faunística da própria região, também se recomenda a instalação de poleiros para descanso e abrigo de aves e morcegos dispersores de sementes (ALMEIDA, 2000). Além disso, as espécies arbóreas para implantação nas áreas de APP e reserva legal devem apresentar grande número de interações bióticas, proporcionando um aumento da diversidade biológica (CITADINI-ZANETTE, 1999).

A revegetação é necessária para recuperação ambiental de áreas degradadas pela mineração de carvão. O plantio de espécies vegetais acelera a recuperação das áreas pela ciclagem de nutrientes que resulta da queda e decomposição das folhas. O processo de recuperação é capaz de aumentar a biomassa microbiana, o carbono e nitrogênio totais, o carbono orgânico e a estabilidade de agregados (ADELI et al, 2013). Essa melhoria das características físicas do solo, proporcionada pelas espécies vegetais, favorece o desenvolvimento de uma série de microrganismos, insetos e animais benéficos, restabelecendo os processos naturais do ecossistema (BRANCALION et al., 2015).

#### 2.4 ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS NO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO VEGETAL

No processo de recuperação de áreas degradadas são utilizadas tanto espécies herbáceas quanto arbóreas para revegetação. As herbáceas têm o papel inicial de dar estabilidade e incrementar MO ao solo construído, facilitando a implantação das espécies

arbóreas, além de não causarem rompimento da camada de argila, evitando a exposição dos rejeitos nas áreas não destinadas a APP e a reserva legal, que possuem somente 50 cm de argila.

Dentre as espécies herbáceas usadas nessas áreas destacam-se algumas forrageiras como o estilosantes (*Stylosanthes guyanensis*), trevo branco (*Trifolium repens*), andropogon (*Andropogon gayanus*), crotalária (*Crotalária-juncea*) e labe-labe (*Dolichos lablab*).

O estilosantes é uma planta perene com baixa exigência de fósforo e demais nutrientes, tolerante a seca e a solos ácidos, além de ter uma significativa produção de biomassa seca. O trevo branco é uma planta que se adapta a ambientes impactados, tolerante à geada e que se desenvolve bem à sombra, sendo uma boa opção para ser utilizada em consórcio. O andropogon possui alta produção de matéria seca em solos com baixa fertilidade, boa tolerância a altos níveis de saturação de alumínio, baixa exigência de fósforo e nitrogênio, além de ser tolerante a seca. A crotalária possui rápido crescimento vegetal, e é rústica, se desenvolvendo bem em solos secos, arenosos e cascalhentos. O labe-labe possui crescimento rápido e tolerância a seca.

Todas as espécies citadas acima são capazes de se desenvolver em solos reconstruídos, além de potencialmente estabelecerem associação com fungos micorrízicos arbusculares (STUMPF, 2011) e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), proporcionando um maior enriquecimento de N e P nas camadas superficiais do solo (VILELA, 1998), muito importante nos processos de recuperação de áreas degradadas.

## 2.5 USO DE MICRORGANISMOS NA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS

Todas as plantas realizam algum tipo de associação com microrganismos. Elas liberam continuamente exsudatos radiculares, que podem ser cerca de 10 % do carbono fixado através da fotossíntese e 15 % do nitrogênio total da planta, visando atrair microrganismos benéficos e repelir os patogênicos (YADAV et al., 2015). Isso faz da fina camada de solo adjacente às raízes, a rizosfera, uma das zonas mais ativas do solo, povoada por grande número de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e protistas (VENTURI e KEEL, 2016).

Os microrganismos são os principais responsáveis pela ciclagem dos nutrientes, tornando os ambientes autossustentáveis (ADELI et al., 2013). Eles também são muito importantes na promoção de crescimento vegetal, atuando no fornecimento de nutrientes e água e na tolerância a estresse. Além desses benefícios, eles também podem favorecer o crescimento das plantas através da produção de hormônios reguladores de crescimento (AHMAD et al., 2008; KUMAR et al., 2018). Essas características tornam os microrganismos promissores para uso nos processos de recuperação de áreas degradadas, inclusive áreas de difícil recuperação como aquelas impactadas pela mineração de carvão (BECERRA-CASTRO et al., 2012; GHNAYA et al., 2015).

Os microrganismos são, de maneira geral, os primeiros a colonizar tais ambientes extremos, criando condições para o desenvolvimento de outros organismos, como algas, plantas e animais (NOVO et al., 2018). Microrganismos são úteis nos processos de recuperação ambiental por acelerarem o crescimento das plantas, e conseqüentemente o povoamento vegetal das áreas. Eles podem atuar na tolerância das plantas à elementos traços diminuindo problemas de fitotoxidez (MEIER et al., 2012; MIRANSARI, 2011).

Diversas bactérias e fungos podem ser utilizados nos processos de recuperação ambiental. Dentre os fungos, podemos citar os fungos endofíticos e os fungos micorrízicos, sendo este segundo grupo um dos mais estudados por promover bons resultados nos processos de recuperação de áreas degradadas pela mineração (GAUR e ADHOLEYA, 2004). Tanto a simbiose com fungos endofíticos quanto com os FMA, ajudam as plantas na redução de estresses causados por toxicidade de elementos traço, déficit hídrico, salinidade ou ataque de patógenos (CARRENHO et al., 2018; KUMAR et al., 2018).

Sob condições de estresse, os microrganismos são capazes de reduzir os efeitos prejudiciais de espécies reativas de oxigênio (ROS), protegendo assim a célula, membranas e biomoléculas, aumentando a produção de antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (AsA), glutathione (GSH), carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos (GOUDA et al., 2018; ARORA et al., 2020). Além disso, em situação de estresse, os inoculantes microbianos induzem a produção de osmorreguladores, como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios, prolina, glicina-betaína e trealose (OOSTEN et al., 2017; GOUDA et al., 2018; KHOSHROU et al., 2020).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal também podem ser muito importantes nos processos de recuperação de áreas impactadas pela mineração de carvão, tanto as fixadoras de nitrogênio quanto as associativas (MOREIRA et al., 2013). Essas bactérias em simbiose com espécies vegetais podem contribuir muito para o desenvolvimento das plantas e o enriquecimento de N ao solo. O incremento de resíduos vegetais ricos em N acelera o processo de estabelecimento das espécies secundárias e clímax, assim como permite o estabelecimento de diversos microrganismos benéficos, e consequentemente contribui para o restabelecimento das funções ecológicas do ecossistema.

Estudos vêm demonstrando o efeito benéfico de várias rizobactérias e FMA promotores de crescimento de plantas em processos de recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão (KHAN, 2005; ZIMMER et al., 2009; CANEI, 2021).

## 2.6 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

A rizosfera é a região onde são encontradas as maiores comunidades bacterianas, pela influência dos exsudatos radiculares (GOSWAMI et al., 2016). Essas bactérias associadas às plantas podem ser divididas em neutras, patogênicas e benéficas (HUANG et al., 2014). As bactérias benéficas (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas – BPCP) podem realizar a fixação de nitrogênio e solubilização de nutrientes, sintetizar compostos capazes de promover o enraizamento, realizar controle fitossanitário, dentre outros, promovendo o crescimento vegetal (AHEMAD e KIBRET, 2014).

Os benefícios mais descritos na literatura e amplamente utilizados são aqueles providos pelas bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), que transformam o N<sub>2</sub> em formas absorvíveis pelas plantas (AHEMAD e KIBRET, 2014). Esse processo de fixação é mediado pela enzima nitrogenase, presente nas BFN. Dentro desse grupo estão bactérias que são capazes de formar nódulos fornecendo a maior parte ou todo o nitrogênio necessário ao desenvolvimento da planta. Outro grupo de BPCP importante é o das bactérias associativas que habitam raízes, caules, colmos e folhas, como *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum* (MOREIRA et al., 2013). Inoculantes a base de *Azospirillum* são largamente comercializados, e alcançaram em 2014 mais de 3,5 milhões de hectares cultivados na América do Sul, com um aumento médio de 10 % no rendimento das culturas (CASSÁN e DIAZ-ZORITA, 2016). Além da fixação biológica de N, muitas dessas BPCP também têm a capacidade de produzir uma série de fitohormônios

(GOSWAMI et al., 2016). Um exemplo é o *A. brasilense*, capaz de produzir ácido indolacético, giberelinas e ácido abscísico (SAHOO et al., 2014). As BPCP também podem oferecer outros benefícios às plantas, como a produção de sideróforos associados à disponibilização de ferro (FERREIRA et al., 2019) e a produção de compostos bioativos capazes de suprimir fitopatógenos (SARAF et al., 2014).

As BPCP também são importantes para o fornecimento de fósforo (P) que é o segundo nutriente mais limitante para as plantas. O P, embora abundante nos solos, se encontra principalmente em formas insolúveis e indisponíveis para as plantas. Mesmo com a aplicação de fertilizantes químicos, o P é rapidamente imobilizado, tornando-se indisponível para as plantas (GLICK, 2012). Desta maneira, é imprescindível a presença de bactérias solubilizadoras e mineralizadoras de fosfato para disponibilizar P às plantas. Essas bactérias podem atuar na solubilização de P através da secreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (GOSWAMI et al., 2016), assim como pela produção de enzimas como fosfatase, fitase, fosfonoacetato hidrolase e outras (JHA e SARAF, 2015). Diversos gêneros de BPCP possuem cepas capazes de solubilizar P, como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e outras (RODRIGUEZ et al., 2004; NOVO et al., 2018).

São diversas as aplicações das BPCP, que incluem o uso na agricultura para a produção de alimentos, diminuindo assim o uso de agroquímicos, e na recuperação de áreas degradadas, em processos de revegetação. Essas bactérias, por promoverem o crescimento das plantas, são muito importantes em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes. Estudos tem demonstrado que o uso de BPCP em áreas de mineração em processo de recuperação proporcionam tolerância a elementos traço, assim como melhor crescimento das plantas (MA et al., 2011).

Estudos com BPCP para uso em processos de revegetação de ambientes severamente degradados, como áreas de mineração, tem aumentado nos últimos anos. No entanto, a grande maioria dos estudos foi realizada sob condições controladas e poucos foram feitos a campo (NOVO et al., 2018).

## 2.7 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)

Os FMA são simbioses obrigatórios, com associação do tipo mutualística, na qual a planta supre o fungo com fotossintatos e o fungo provê à planta nutrientes e água

(MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Os principais benefícios dos FMA às plantas decorrem do aumento da absorção de nutrientes, principalmente P, amenização de estresse hídrico, auxílio no controle de patógenos (HWANG et al., 1992; NEWSHAM et al., 1995). Os FMA também contribuem para a estruturação e estabilidade de agregados do solo em decorrência do crescimento e produção de hifas e de glomalina, uma glicoproteína que é componente estrutural dos FMA (JASTROW et al., 1998; BERBARA et al., 2006; BEDINI et al., 2009).

Os FMA são tolerantes a ambientes degradados e contaminados por elementos traço (STÜRMER e SIQUEIRA, 2008), sendo capazes de melhorar o estado nutricional das plantas, desencadeando mecanismos de tolerância a estresses impostos pelos elementos traço (FOLLI-PEREIRA et al., 2012). Dentre os mecanismos utilizados pelos FMA para tolerar ambientes degradados e melhorar a tolerância das espécies vegetais, estão a produção de hifas e das glomalinas, capazes de imobilizar os elementos tóxicos no solo, diminuindo a disponibilidade destes às plantas (CORNEJO et al., 2008; MALEKZADEH et al., 2016; CABRAL et al., 2010). A glomalina produzida pelos FMA possui a capacidade de se ligar ao Cu, Zn, Cd, Fe, Pb e Mn, diminuindo a disponibilidade desses elementos para as plantas (TURNAU et al., 2010). Além de poderem complexar os elementos traço nas hifas fúngicas, fungos possuem na composição de suas células grupos hidroxilo, amino, carbóxico, dentre outros, com alta afinidade por esses elementos traço (GADD, 1993). Desta maneira, os FMA podem afetar a absorção, translocação e acumulação de diversos elementos traço nos tecidos vegetais (ORŁOWSKA et al., 2013).

A inoculação de FMA também pode atuar melhorando os mecanismos de defesa das plantas contra estresse, como a produção de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), a peroxidase (POD), a superóxido dismutase (SOD) e a ascorbato peroxidase (APX) (BARBOSA et al., 2014) e a produção de fitoquelatinas (PCs) (MOHAMED et al., 2012; HAWRYLAK-NOWAK et al., 2014; SANTOS, 2018).

Além dos benefícios citados acima, os FMA também podem garantir às plantas proteção contra fungos fitopatogênicos por meio da melhoria no estado nutricional, estímulo da produção de exsudatos radiculares, alteração fisiológica das raízes, dentre outros (DANTAS et al., 2009). Por isso, os FMA são considerados cruciais para o estabelecimento de uma comunidade vegetal em solos degradados, incluindo áreas impactadas pela mineração de carvão (LI et al., 2015; QIU et al., 2019). Nesses solos degradados geralmente ocorrem perdas de propágulos de FMA, o que pode limitar o

desenvolvimento das espécies vegetais, e por isso se justifica a inoculação de FMA (REQUENA et al., 2001; VERESOGLOU et al., 2012).

Em estudo realizado no noroeste da China em áreas de recuperação ambiental com idades entre 1 e 7 anos, utilizando *Funneliformis mosseae*, houve maior crescimento das plantas inoculadas, assim como aumento na disponibilidade de nutrientes e aumento da atividade no solo, das enzimas invertase, catalase, urease e fosfatase alcalina (QIU et al., 2019). Foi observando que tais melhoras estavam correlacionadas com a porcentagem de colonização micorrízica dos FMA.

## 2.8 CO-INOCULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS EM PLANTAS

Atualmente, muitos estudos com coinoculação vêm sendo desenvolvidos, visto os bons resultados observados para as culturas agrícolas, como no uso conjunto de rizóbios e *Azospirillum* para a cultura da soja e feijão (MEENA et al., 2018). Em regiões tropicais e subtropicais, onde é comum a menor disponibilidade de N e P (HARDARSON e ATKINS, 2003), o uso da coinoculação de FMA e bactérias fixadoras de N (BFN) proporciona bons resultados, devido ao aumento da eficiência do uso desses nutrientes (OSSLER et al. 2015; CHANG et al. 2017). No uso conjunto dos microrganismos, há benefício tanto para a planta como para os próprios microrganismos. Um exemplo é a simbiose entre leguminosa - rizóbio, onde planta e bactérias são beneficiadas na presença de FMA. A associação micorrízica melhora a absorção de nutrientes, principalmente P, que podem estar limitando a formação de nódulos (XIAO et al., 2010; NAUTIYAL et al., 2010).

Outras associações entre plantas e microrganismos também podem ser benéficas. Um exemplo é verificado em estudo de Ważny et al. (2018) com *Lactuca serriola* coinoculada com FMA e *Mucor* sp. em substrato contaminado com elementos traço, o qual demonstrou efeito benéfico da associação. A inoculação do *Mucor* sp. em conjunto com FMA proporcionou um aumento da colonização micorrízica, além de aumentar a concentração de Zn nas folhas das plantas. Weżowicz et al (2017) verificaram que em ambiente degradado a dupla inoculação de FMA e fungos endófitos proporcionou melhor crescimento de plântulas de *Vernicus lychnitis* em comparação à inoculação somente de FMA ou fungos endofíticos. A inoculação só com os fungos endofíticos resultou numa

resposta neutra ou negativa sobre o crescimento das plantas, ao passo que com a interação o aumento do crescimento passou a ser superior ao tratamento com FMA isoladamente.

A associação entre FMA e BFN com as raízes das plantas aumenta a atividade de diversos outros microrganismos rizosféricos benéficos (CHANG et al. 2017), principalmente por alterações na fisiologia e exsudação radicular das plantas (MIKOLA e KYTÖVITTA, 2002), o que na maioria das vezes, proporciona aumento dos benefícios.

## 2.9 ATIVIDADES MICROBIOLÓGICAS E ENZIMÁTICAS NO SOLO COMO BIOINDICADORES

Análises atividades microbiológicas e enzimáticas são consideradas indicadores sensíveis para avaliar a qualidade do solo, pois se relacionam diretamente com a ciclagem de nutrientes (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007). Esses indicadores respondem rapidamente a alterações ambientais, sendo possível constatar alterações do ambiente em curto e médio prazo (ADETUNJI et al., 2017; PEZARICO et al., 2013) e, juntamente com os atributos físicos e químicos, podem ser usados estimar ou indicar a capacidade de auto sustentabilidade do sistema (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

Diversos indicadores podem ser utilizados para mensurar a atividade microbiológica. Dentre os atributos mais utilizados estão a respiração basal ou atividade metabólica do solo, determinado através da quantificação de  $\text{CO}_2$  liberado pelo solo ( $\text{C-CO}_2$ ), o carbono da biomassa microbiana do solo ( $\text{C-BMS}$ ), o quociente metabólico ou respiratório ( $\text{qCO}_2$ ) e a atividade enzimática do solo (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

Mudanças nos processos metabólicos de microrganismos do solo podem ser avaliados, de maneira global, através da técnica da respiração basal (PARKIN et al., 1996). A respiração basal é um indicador da atividade biológica amplamente utilizado, uma vez que reflete o processo de decomposição da matéria orgânica e, portanto, a disponibilização e imobilização dos nutrientes do solo. Fatores como temperatura, umidade ou disponibilidade de fontes energéticas e de nutrientes podem ocasionar alterações na respiração basal (SIHI et al., 2018).

O carbono da biomassa microbiana ( $\text{C-CO}_2$ ) permite estimar a população de microrganismos no solo, que estão diretamente associados aos processos de ciclagem de nutrientes e carbono. Usando as informações de  $\text{C-CO}_2$  e da respiração basal é possível calcular o quociente metabólico ou respiratório ( $\text{qCO}_2$ ), que fornece a informação da quantidade de  $\text{CO}_2$  produzido por unidade de biomassa microbiana, estando relacionado



à eficiência da utilização de carbono pela biomassa microbiana (SAVIOZZI et al., 2002). Pille da Silva et al. (2019) realizaram estudo em áreas de mineração de carvão em processo de recuperação ambiental. No estudo foi utilizado como bioindicadores o nitrogênio e o carbono da biomassa microbiana, além do quociente metabólico, e verificaram aumentos significativos nesses parâmetros durante o processo de recuperação ambiental.

As enzimas no solo também são bons indicadores, pois são produzidas por microrganismos, plantas ou animais. Elas aceleram diversas reações no solo, atuando em diversos processos, como decomposição de resíduos orgânicos e solubilização de nutrientes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). As principais enzimas presentes no solo, que podem ser usadas como medidas da qualidade do solo, são  $\beta$ -glucosidase (ciclo do carbono), uréase (ciclo do nitrogênio), fosfatase (ciclo do fósforo), arilsulfatase (ciclo do enxofre) e DAF (diacetato de fluoresceína), (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007; ADETUNJI et al., 2017; KERTESZ e FROSSARD, 2015).

A  $\beta$ -glucosidase tem importância por fazer parte de um complexo multienzimático que hidrolisa a celulose, estando associada à capacidade que o solo possui de degradar resíduos vegetais e estabilizar a matéria orgânica (ADETUNJI et al., 2017). A atividade da enzima se modifica de acordo com a microbiota, plantas e o manejo imposto ao solo.

A urease, responsável pela hidrólise da uréia, está diretamente ligada ao ciclo do nitrogênio (ADETUNJI et al., 2017). Estudos da atividade da urease no solo têm interesse, por ser um bom indicador de qualidade do solo e, devido ao papel da enzima na regulação do suprimento de N às plantas (PIOTROWSKA-DLUGOSZ e CHARZYNSKI, 2015). A atividade da urease depende de vários fatores ambientais, como, por exemplo, a temperatura do solo, que aumenta a sua atividade (MACHUCA et al., 2015).

As fosfatases atuam na mineralização do fósforo e, segundo o seu pH ótimo de ação, são classificadas em ácidas (pH 6,5) e alcalinas (pH 11), estando correlacionadas com a deficiência de P, ou seja, em solos com baixo teor de P há aumento da liberação de fosfatases (NAHAS, 2002). Muitos microrganismos podem excretar fosfatases, dentre eles estão os FMA, que por sua vez são responsáveis por aumentar o desenvolvimento de plantas em condições de deficiência de P (TARAFDAR, 1995).

A arilsulfatase catalisa a hidrólise de ésteres de sulfato e é facilmente mensurável nos solos, sendo um bom indicador de saúde e atividade microbiana do solo (TAYLOR et al., 2002). A atividade da arilsulfatase está correlacionada com a biomassa microbiana do

solo e a taxa de imobilização de S (VONG et al., 2003), e é influenciada por fatores que afetam a atividade microbiana, como pH e níveis de C orgânico (GOUX et al., 2012).

O diacetato de fluoresceína (DAF) pode ser hidrolisado por muitas enzimas (lipases, próteases e esterases) e organismos, desta maneira, pode ser utilizado como um indicador de amplo espectro da atividade biológica do solo. Essa substância é influenciada por diversos fatores que interferem na atividade das enzimas e dos organismos do solo. O teor de carbono orgânico do solo também é determinante para a produção da DAF (BANDICK e DICK, 1999).

Em estudo avaliando áreas de mineração de ferro, incluindo uma não revegetada, duas em processo de revegetação (dois e três anos) e uma área referência, as análises da atividade microbianas do solo se mostraram bons indicadores de recuperação ambiental (DE AGUIAR SANTIAGO et al., 2022). Houve aumentos de 45% aos dois anos e 48% aos três anos no C e 86% aos três anos no N da biomassa microbiana nas áreas em processo de recuperação, além de aumentos de 52% aos dois anos e 66% aos três anos na atividade da urease, 53% aos dois anos e 68% aos três anos na DAF e 90% na fosfatase ácida aos três anos (DE AGUIAR SANTIAGO et al., 2022). Li et al. (2019) observaram grupos bacterianos mais associados ao ciclo do P e do N e a diferentes atividades enzimáticas do solo encontrando correlações de seis filos bacterianos com a disponibilidade de N, de dois com a disponibilidade de P, de quatro com a atividade da catalase, de um filo com a urease e de um com a sacarose.

Diversos fatores podem modificar a comunidade microbiológica do solo e consequentemente a atividade enzimática. Condições abióticas, como temperatura, umidade e pH, têm amplos efeitos sobre o microbioma, assim como sobre o hospedeiro. Carboidratos, aminoácidos, fenóis e íons inorgânicos liberados pelas raízes das plantas são capazes de favorecer a atividade microbiológica do solo (SINGH et al., 2019). A inoculação de um microrganismo pode promover uma série de interações com outros microrganismos, modificando a comunidade e a atividade microbiológica (INGHAM et al., 2011; WARMINK et al., 2011). Estudos tem mostrado que a inoculação de microrganismos é capaz de aumentar a atividade de diversos outros microrganismos rizosféricos benéficos (CHANG et al. 2017; MIKOLA e KYTÖVITTA, 2002), proporcionando uma série de benefícios ao solo e as plantas. A coinoculação de rizóbio e FMA, na qual o fungo contribui para o aumento da nodulação da bactéria, aumenta a fixação de nitrogênio para as plantas (MEENA et al 2018). Também são conhecidos os

efeitos antagônicos dos controles biológicos utilizados na agricultura para controle de diversas doenças microbianas.

Levando em consideração as informações acima é possível perceber o potencial que os FMA e BPCP podem ter para uso em programas de recuperação ambiental, como as de mineração de carvão. Para isto, esses microrganismos devem ser avaliados quanto à promoção de crescimento vegetal, influência sobre a atividade enzimática do solo e consequente envolvimento no processo de disponibilização de nutrientes as plantas. Também é importante avaliar a aplicabilidade da técnica. Tais estudos devem ser realizados principalmente a campo, condições em que há maior deficiência de informações. A adoção de técnicas que utilizem produtos biológicos e orgânicos é importante para promover uma maior atividade biológica do solo e consequentemente acelerar o restabelecimento das funções do ecossistema.

## 2.10 REFERÊNCIAS

ADELI, A.; MCLAUGHLIN, M. R.; BROOKS, J. P.; READ, J. J.; WILLERS, J. L.; LANG, D. J.; MCGREW, R. Age Chronosequence Effects on Restoration Quality of Reclaimed Coal Mine Soils in Mississippi Agroecosystems. **Soil Science**, v. 178, n. 7, p. 335–343, jul. 2013.

ADETUNJI, A. T.; LEWU, F. B.; MULIDZI, R.; NCUBE, B. The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 17, n. 3, p. 794–807, set. 2017.

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, jan. 2014.

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, mar. 2008.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, 1995.

ALMEIDA, D. S. **Recuperação ambiental da Mata Atlântica**. Ilhéus: Editus, 2000. 130p.

ALVES, B.J.R.; SANTOS, J.D.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, p. 449-469, 1994.

ALVES, M.C.; SOUZA, Z.M. Subsoil reclamation in loan area used for hydroelectric construction. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 301-309, 2011.

AMBROSINI, A.; SOUZA, R.; PASSAGLIA, L.M.P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant and Soil**, v. 400, n. 1–2, p. 193–207, mar. 2016.

ANICETO, R.M. Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

ARF, O.; MEIRELLES, F. C.; PORTUGAL, J. R.; BUZETTI, S.; DE SÁ M. E.; RODRIGUES, R. A. F. Benefícios do milho consorciado com gramínea e leguminosas e seus efeitos na produtividade em sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 17, n. 3, p. 431-444, 2018.

ARORA, N. K.; FATIMA, T.; MISHRA, I.; VERMA, S. Microbe-based inoculants: role in next green Revolution. In - **Environmental Concerns and Sustainable Development** (SHUKLA, V. and KUMAR, N, eds), p 191–245. Singapore: Springer, (2020)

BANDICK, A. K.; DICK, R. P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 11, p. 1471–1479, out. 1999.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. DE A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, mar. 2014.

BASHAN, L. E. DE-; HERNANDEZ, J.-P.; NELSON, K. N.; BASHAN, Y.; MAIER, R. M. Growth of Quailbush in Acidic, Metalliferous Desert Mine Tailings: Effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on Biomass Production and Rhizosphere Community Structure. **Microbial Ecology**, v. 60, n. 4, p. 915–927, nov. 2010.

BEDINI, S.; PELLEGRINO, E.; AVIO, L.; PELLEGRINI, S.; BAZZOFFI, P.; ARGESE, E.; GIOVANNETTI, M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1491–1496, jul. 2009.

BERBARA, R.L.L.; DE SOUZA, F.A; FONSECA, H.M.A.C. Fungos Micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição. In —**Nutrição Mineral de Plantas** (M. S. Fernandes, ed.), pp. 53-88. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, Brazil. 2006.

BECERRA-CASTRO, C.; MONTERROSO, C.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ-LAMAS, L.; LOUREIRO-VIÑAS, M.; ACEA, M. J.; KIDD, P. S. Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant–

microorganism–rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217–218, p. 350–359, maio 2012.

BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C. DE; CORDILEONE, V. Related Growth Parameters in Soybean Plants Inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Crop Improvement**, v. 25, n. 5, p. 472–487, set. 2011.

BOUHAJJA, E.; AGATHOS, S. N.; GEORGE, I. F. Metagenomics: Probing pollutant fate in natural and engineered ecosystems. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1413–1426, dez. 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BRANCALION, P.H.S.; GANDOLFI, S.; RODRIGUES, R.R. **Restauração Florestal**. São Paulo: Oficina de Textos, 2015.

BRANDELERO, S. M.; MIQUELLUTI, D. J.; CAMPOS, M. L.; DORS, P. Monitoramento de água e sedimento no Rio Palmeiras, Bacia Hidrográfica do Tubarão (SC), Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 1, p. 203–212, 21 nov. 2016.

BRASIL. 7º Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais. Processo nº 2000.72.04.002543-9. Justiça Federal. 1ª Vara Federal de Criciúma, SC. Criciúma, 2013.

BRASIL. 10º Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais. Processo nº. 2000.72.04.002543-9. Justiça Federal. 1ª Vara Federal de Criciúma, SC. Criciúma, 2016. 218 p.

CABRAL, L.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; PINTO, J. E. B. P. Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 25–29, 2010.

CANEI, A.D. Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas em área de mineração de carvão em recuperação. Tese de Doutorado, UFSC - Florianópolis, 207p, 2021.

CARRENHO, R.; ALVES, L. DE J.; SILVA SANTOS, I. DA. Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Interactions With Heavy Metals and Rehabilitation of Abandoned Mine Lands. *In: Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. Elsevier, 2018. p. 261–279.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum sp.* in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, dez. 2016.

CHANG, C.; NASIR, F.; MA, L.; TIAN, C. Molecular Communication and Nutrient Transfer of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria, and Host Plant in Tripartite Symbiosis. *In: SULIEMAN, S.; TRAN, L.-S. P. (Eds.). Legume Nitrogen Fixation in Soils with Low Phosphorus Availability*. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 169–183.

CHEN, Y.; SHAH, N.; HUGGINS, F. E.; HUFFMAN, G. P.; DOZIER, A. Characterization of ultrafine coal fly ash particles by energy-filtered TEM. **Journal of Microscopy**, v. 217, n. 3, p. 225–234, mar. 2005.

CITADINI-ZANETTE, V. Diagnóstico ambiental da região carbonífera no sul de Santa Catarina: recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão. **Revista Tecnologia e Ambiente**, Criciúma, v.5, n.2, p.51-61, 1999.

CPRM-COMPANHIA DE PESQUISA DE RECURSOS MINERAIS. **Planos de recuperação de áreas degradadas pela mineração do carvão, no estado de Santa Catarina, correspondentes às áreas da ExTreviso S.A, de responsabilidade da União.** Projeto Executivo. 2011. 157p.

CORNEJO, P.; MEIER, S.; BORIE, G.; RILLIG, M. C.; BORIE, F. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. **Science of The Total Environment**, v. 406, n. 1–2, p. 154–160, nov. 2008.

CQFS-COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de calagem e adubação para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** 2016.

DANTAS, J.S.; SOUZA, A.P.D.; FARIAS, M.F.D.; NOGUEIRA, V.D.F.B. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, p.213-218, 2009.

DE AGUIAR SANTIAGO, F.L.; SILVA, A.O.; CARNEIRO, M.A.; GASTAUER, M.; RAMOS, S.J.; CALDEIRA, C.F.; SIQUEIRA, J.O. Revegetation of mined areas influences the physiological profile of bacterial communities and improves the biochemical functions of soil. **Pedobiologia**, v.1, n. 90, p. 150793, mar. 2022.

DNPM - DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. **Sumário Mineral.** v.35, Brasília, 2015.

DNPM - DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. **Sumário Mineral.** v.36, Brasília, 2016.

IEA - INTERNATIONAL ENERGY STATISTICS. 2016. Disponível em: <https://www.eia.gov>. Acesso em 20 de abril de 2019.

EPAGRI. Dados e informações biofísicas da unidade de planejamento regional litoral sul catarinense-UPR 8. Boletim técnico. 77p. Epagri/Ciram. Florianópolis, 2001.

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of The Total Environment**, v. 682, p. 779–799, set. 2019.

- FOLLI-PEREIRA, M. DA S.; MEIRA-HADDAD, L. S.; BAZZOLLI, D. M. S.; KASUYA, M. C. M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 6, p. 1663–1679, dez. 2012.
- GADD, G. M. Interactions of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, v. 124, n. 1, p. 25–60, maio 1993.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p. 113–118, abr. 1993.
- GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **Current Science**, v. 86, n. 4, p. 528–534, 2004.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 46, n. 2, p. 235–244, jun. 1963.
- GHNAYA, T.; MNASSRI, M.; GHABRICHE, R.; WALI, M.; POSCHENRIEDER, C.; LUTTS, S.; ABDELLY, C. Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 14 out. 2015.
- GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- GOMES, A. P.; FERREIRA, J. A. F.; ALBUQUERQUE, L. F. DE; SÜFFERT, T. Carvão fóssil. **Estudos Avançados**, v. 12, n. 33, p. 89–106, ago. 1998.
- GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1-19, jan. 2016.
- GOUDA, S.; KERRY, R. G.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H.; PATRA, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131–140, 2018.
- GOUX, X.; AMIAUD, B.; PIUTTI, S.; PHILIPPOT, L.; BENIZRI, E. Spatial distribution of the abundance and activity of the sulfate ester-hydrolyzing microbial community in a rape field. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, n. 9, p. 1360–1370, out. 2012.
- HARDARSON, G.; ATKINS, C. Optimising biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 41–54, maio 2003.
- HARDIN, G. Non-renewable energy sources. In: CHIRAS, D.D. (Ed.). **Environmental Science**. ninth ed. Burlington, 2013. p. 275–312.
- HAWRYLAK-NOWAK, B.; DRESLER, S.; WÓJCIK, M. Selenium affects physiological parameters and phytochelatin accumulation in cucumber (*Cucumis sativus*

L.) plants grown under cadmium exposure. **Scientia Horticulturae**, v. 172, p. 10–18, jun. 2014.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. 12, p. 1332–1334, 15 jun. 1979.

HOELZEL, M.C. Interconectividade de aquíferos e os efeitos da drenagem ácida de mina na qualidade das águas da Bacia carbonífera de Santa Catarina (SC). 2018. Dissertação de mestrado. 80p.

HUANG, X.-F.; CHAPARRO, J. M.; REARDON, K. F.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. **Botany**, v. 92, n. 4, p. 267–275, abr. 2014.

HWANG, S.F.; CHANG, K.F.; CHAKRAVARTY, P. Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the Development of *Verticillium* and *Fusarium* Wilts of Alfalfa. **Plant Disease**, v. 76, n. 3, p. 239, 1992.

INGHAM, C. J.; KALISMAN, O.; FINKELSHTEIN, A.; BEN-JACOB, E. Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium *Paenibacillus vortex*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 49, p. 19731–19736, 6 dez. 2011.

JASTROW, J.D.; MILLER, R.M.; LUSSENHOP, J. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 905–916, jul. 1998.

JHA, C. K., SARAF, M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, v.5, n.2, p.108-119, 2015.

KERTESZ, M.A.; FROSSARD, E. **Biological cycling of inorganic nutrients and metals in soils and their role in soil biogeochemistry**. Academic Press, 2015.

KHAN, A. G. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 4, p. 355–364, jun. 2005.

KHOSHROU, B.; MITRA, D.; KHOSHMANZAR, E.; MYO, E.M.; UNİYAL, N.; MAHAKUR, B.; MOHAPATRA, P.K.; PANNEERSELVAM, P.; BOUTAJ, H.; ALIZADEH, M.; CELY, M.V. Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: An economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, v. 43, p. 3062-3092, Jul 2020.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C.; HORN, M.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. e1–e1, 1 jan. 2013.



- KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v. 92, n. 4, p. 486–488, jun. 1989.
- KUMAR, A.; TRIPTI; PRASAD, M. N. V.; MAITI, S. K.; FAVAS, P. J. C. Mycoremediation for Mine Site Rehabilitation. *In: **Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation***. Elsevier, 2018. p. 233–260.
- LEGENDRE, P, LEGENDRE, L.F.J. **Numerical ecology**. Vol. 24. Elsevier, 2012.
- LENNON, J. T.; JONES, S. E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 119–130, fev. 2011.
- LI, S.; BI, Y.; KONG, W.; YU, H.; LANG, Q.; MIAO, Y. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on ecological restoration in coal mining areas. **Russian Journal of Ecology**, v. 46, n. 5, p. 431–437, set. 2015.
- LI, P.; ZHANG, X.; HAO, M.; CUI, Y.; ZHU, S.; ZHANG, Y. Effects of vegetation restoration on soil bacterial communities, enzyme activities, and nutrients of reconstructed soil in a mining area on the Loess Plateau, China. **Sustainability**, v.11, n. 8, p. 2295, jan. 2019.
- MA, Y.; PRASAD, M. N. V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 248–258, mar. 2011.
- MACHUCA, A., CUBA-DÍAZ, M., CÓRDOVA, C. Enzymes in the rhizosphere of plants growing in the vicinity of the Polish Arctowski Antarctic Station. **Journal of soil science and plant nutrition**. V.15, p. 833-838, 2015.
- MALEKZADEH, E.; ALIASGHARZAD, N.; MAJIDI, J.; ABDOLALIZADEH, J.; AGHEBATI-MALEKI, L. Contribution of glomalin to Pb sequestration by arbuscular mycorrhizal fungus in a sand culture system with clover plant. **European Journal of Soil Biology**, v. 74, p. 45–51, maio 2016.
- McGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H.; EVANS, D. G.; FAIRCHILD, G. L.; SWAN, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 115, n. 3, p. 495–501, jul. 1990.
- MEENA, R. S.; VIJAYAKUMAR, V.; YADAV, G. S.; MITRAN, T. Response and interaction of *Bradyrhizobium japonicum* and arbuscular mycorrhizal fungi in the soybean rhizosphere. **Plant Growth Regulation**, v. 84, n. 2, p. 207–223, mar. 2018.
- MEIER, S.; BORIE, F.; BOLAN, N.; CORNEJO, P. Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 741–775, abr. 2012.
- MIKOLA, J. Defoliation and the availability of currently assimilated carbon in the *Phleum pratense* rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 12, p. 1869–1874, dez. 2002.

MOHAMED, A. A.; CASTAGNA, A.; RANIERI, A.; SANITÀ DI TOPPI, L. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 15–22, ago. 2012.

MORALES, S. E.; HOLBEN, W. E. Empirical Testing of 16S rRNA Gene PCR Primer Pairs Reveals Variance in Target Specificity and Efficacy Not Suggested by In Silico Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2677–2683, 1 maio 2009.

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

MOREIRA, F. M. S., CARES, J. E., ZANETTI, R., STURMER, S. **O ecossistema solo: Componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. Lavras: UFL. 2013.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 267–275, dez. 2002.

NAUTIYAL, C. S.; CHAUHAN, P. S.; DASGUPTA, S. M.; SEEM, K.; VARMA, A.; STADDON, W. J. Tripartite interactions among *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, *Piriformospora indica* DSM 11827, and *Cicer arietinum* L. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1393–1399, ago. 2010.

NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 10, p. 407–411, out. 1995.

NOVO, L. A. B.; CASTRO, P. M. L.; ALVARENGA, P.; SILVA, E. F. DA. Plant Growth–Promoting Rhizobacteria-Assisted Phytoremediation of Mine Soils. *In: Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. Elsevier, 2018. p. 281–295.

OOSTEN, M. J. V.; PEPE, O.; PASCALE, S.; SILLETTI, S.; MAGGIO, A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 4, p. 1-12, 2017.

ORŁOWSKA, E.; PRZYBYŁOWICZ, W.; ORŁOWSKI, D.; MONGWAKETSI, N. P.; TURNAU, K.; MESJASZ-PRZYBYŁOWICZ, J. Mycorrhizal colonization affects the elemental distribution in roots of Ni-hyperaccumulator *Berkheya coddii* Roessler. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 100–109, abr. 2013.

OSSLER, J. N.; ZIELINSKI, C. A.; HEATH, K. D. Tripartite mutualism: Facilitation or trade-offs between rhizobial and mycorrhizal symbionts of legume hosts. **American Journal of Botany**, v. 102, n. 8, p. 1332–1341, ago. 2015.

OVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367–3373, set. 1997.

PARKIN, T.; DORAN, J.; FRANCO - VIZCAÍNO, E. Field and laboratory test of soil respiration. In: Doran, J., Jones A. (Eds.); **Methods for Assessing Soil Quality**. Soil Science Society of America, New York, 1996. p.231 – 246.

PEZARICO, C. R.; VITORINO, A. C. T.; MERCANTE, F. M.; DANIEL, O. Indicadores de qualidade do solo em sistemas agroflorestais. **Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, n. 1, p. 40–47, 2013.

PIOTROWSKA-DŁUGOSZ, A.; CHARZYŃSKI, P. The impact of the soil sealing degree on microbial biomass, enzymatic activity, and physicochemical properties in the Ekranic Technosols of Toruń (Poland). **Journal of Soils and Sediments**, v. 15, n. 1, p. 47–59, jan. 2015.

PILLE DA SILVA, E.; ARMAS, R.D.; FERREIRA, P.A.A., DANTAS M.K.L.; GIACHINI, A.J.; ROCHA-NICOLEITE, E.; GONZÁLEZ, A.H.; SOARES, C.R.F.S. Soil attributes in coal mining areas under recovery with bracinga (*Mimosa scabrella*). **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 6, p. 497-504, Jun. 2019.

QIU, L.; BI, Y.; JIANG, B.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; ZHAKYPBEK, Y. Arbuscular mycorrhizal fungi ameliorate the chemical properties and enzyme activities of rhizosphere soil in reclaimed mining subsidence in northwestern China. **Journal of Arid Land**, v. 11, n. 1, p. 135–147, fev. 2019.

RAVAZZOLI, C. A problemática ambiental do carvão em Santa Catarina: Sua evolução até os Termos de Ajustamento de Conduta vigente entre os anos de 2005 e 2010. **Geografia em Questão**, v. 6, n. 1. 2013.

REQUENA, N.; PEREZ-SOLIS, E.; AZCON-AGUILAR, C.; JEFFRIES, P.; BAREA, J.-M. Management of Indigenous Plant-Microbe Symbioses Aids Restoration of Desertified Ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 495–498, 1 fev. 2001.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, nov. 2004.

RODRIGUES, S.; DUARTE, A. C. Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. In: CASTRO, A.; DUARTE, A.; SANTOS, T. (Ed.). *O ambiente e a saúde*. Lisboa: Instituto Piaget, 2003. p. 136-176.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541–2547, 1 jun. 2000.

SAHOO, R. K.; ANSARI, M. W.; PRADHAN, M.; DANGAR, T. K.; MOHANTY, S.; TUTEJA, N. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. **Protoplasma**, v. 251, n. 4, p. 943–953, jul. 2014.

SANTIBÁÑEZ, C.; VERDUGO, C.; GINOCCHIO, R. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. **Science of The Total Environment**, v. 395, n. 1, p. 1–10, maio 2008.

SANTOS, M. D.; SILVA JÚNIOR, F. M. R. DA; ZURDO, D. V.; BAISCH, P. R. M.; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; MADRID, Y. Selenium and mercury concentration in drinking water and food samples from a coal mining area in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 15, p. 15510–15517, maio 2019.

SANTOS, M. DOS; FLORES SOARES, M. C.; MARTINS BAISCH, P. R.; MUCCILLO BAISCH, A. L.; RODRIGUES DA SILVA JÚNIOR, F. M. Biomonitoring of trace elements in urine samples of children from a coal-mining region. **Chemosphere**, v. 197, p. 622–626, abr. 2018.

SANTOS, M.L.D. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos de fitoproteção em espécies nativas associadas a fungos micorrízicos arbusculares em solos contaminados. 2018. Tese de Doutorado. 115p.

SARAF, M.; PANDYA, U.; THAKKAR, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 18–29, jan. 2014.

SAVIOZZI, A.; BUFALINO, P.; LEVI-MINZI, R.; RIFFALD, R. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 2, p. 96–101, 1 abr. 2002.

SHRESTHA, R. K.; LAL, R. Changes in physical and chemical properties of soil after surface mining and reclamation. **Geoderma**, v. 161, n. 3–4, p. 168–176, mar. 2011.

SIHI, D.; DAVIDSON, E. A.; CHEN, M.; SAVAGE, K. E.; RICHARDSON, A. D.; KEENAN, T. F.; HOLLINGER, D. Y. Merging a mechanistic enzymatic model of soil heterotrophic respiration into an ecosystem model in two AmeriFlux sites of northeastern USA. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 252, p. 155–166, abr. 2018.

SILVA, L.F.; DE VALLEJUELO, S.F.O.; MARTINEZ-ARKARAZO, I.; CASTRO, K.; OLIVEIRA, M.L.; SAMPAIO, C.H.; ... & MADARIAGA, J.M. Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage. **Science of The Total Environment**, v. 447, p. 169–178, mar. 2013.

SINGH, A. K.; SISODIA, A.; SISODIA, V.; PADHI, M. Role of Microbes in Restoration Ecology and Ecosystem Services. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2019. p. 57–68.

SOUCHIE, E.L.; ABOUD, A.C.S.; CAPRONI, A.L. Solubilização de fosfato in vitro por microorganismos rizosféricos de gandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, 2007.

SOUZA, M. R.; DA SILVA, F. R.; DE SOUZA, C. T.; NIEKRASZEWICZ, L.; DIAS, J. F.; PREMOLI, S.; DA SILVA, J. Evaluation of the genotoxic potential of soil contaminated with mineral coal tailings on snail *Helix aspersa*. **Chemosphere**, v.139, p. 512-517, 2015.

STEWART, E. J. Growing Unculturable Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151–4160, 15 ago. 2012.

STUMPF, L. Atributos físicos e mecânicos de um solo construído em área de mineração de carvão em Candiota-RS, cultivado com diferentes espécies vegetais. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversidade de fungos micorrizicos arbusculares em ecossistemas brasileiros. *In*: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSARD, L., eds. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2008. p.537-584.

TARAFDAR, J. C. Visual demonstration of in vivo acid phosphatase activity of VA mycorrhizal fungi. **Current Science**, v. 69, n. 6, p. 541–543, 1995.

TAYLOR, J. P.; WILSON, B.; MILLS, M. S.; BURNS, R. G. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 387–401, mar. 2002.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5).

TURNAU, K.; RYSZKA, P.; WOJTCZAK, G. Metal Tolerant Mycorrhizal Plants: A Review from the Perspective on Industrial Waste in Temperate Region. *In*: KOLTAI, H.; KAPULNIK, Y. (Eds.). **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 257–276.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 209, jun. 2013.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, jan. 1987.

VILELA, H. **Formação e adubação de Pastagens**. CPT. Viçosa. 98p. 1998.

VENTURI, V.; KEEL, C. Signaling in the Rhizosphere. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 187–198, mar. 2016.

VERESOGLOU, S. D.; CHEN, B.; RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, p. 53–62, mar. 2012.

VONG, P.-C.; DEDOURGE, O.; LASSERRE-JOULIN, F.; GUCKERT, A. Immobilized-S, microbial biomass-S and soil arylsulfatase activity in the rhizosphere soil of rape and barley as affected by labile substrate C and N additions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 12, p. 1651–1661, dez. 2003.

WARMINK, J.A., NAZIR, R., CORTEN, B., VAN ELSAS, J.D. Hitchhikers on the fungal highway: the helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, p.760–765, 2011.

WAŻNY, R.; ROZPADEK, P.; JĘDRZEJCZYK, R. J.; ŚLIWA, M.; STOJAKOWSKA, A.; ANIELSKA, T.; TURNAU, K. Does co-inoculation of *Lactuca serriola* with endophytic and arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth in a polluted environment? **Mycorrhiza**, v. 28, n. 3, p. 235–246, abr. 2018.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, set. 1994.

WEŹOWICZ, K.; ROZPADEK, P.; TURNAU, K. Interactions of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi improve seedling survival and growth in post-mining waste. **Mycorrhiza**, v. 27, n. 5, p. 499-511, 2017.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.), **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**, Academic Press, New York, 1990. p. 315-322.

WRIGHT, S.F., UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v. 198, n. 1, p. 97–107, 1998.

XIAO, T.; YANG, Q.; RAN, W.; XU, G.; SHEN, Q. Effect of Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungus on Nitrogen and Phosphorus Utilization in Upland Rice-Mungbean Intercropping System. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 4, p. 528–535, abr. 2010.

YADAV, B. K.; AKHTAR, MOHD. S.; PANWAR, J. Rhizospheric Plant-Microbe Interactions: Key Factors to Soil Fertility and Plant Nutrition. *In*: ARORA, N. K. (Ed.). **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 127–145.

ZIMMER, D.; BAUM, C.; LEINWEBER, P.; HRYNKIEWICZ, K.; MEISSNER, R. Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from a metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. **International Journal of Phytoremediation**, v. 11, n. 2, p. 200–213, fev. 2009.

### 3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESES

-O uso de *Bradyrhizobium*, fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e *Azospirillum brasiliensis*, inoculados sozinhos ou coinoculados, promovem maior absorção de nutrientes e conseqüente maior crescimento vegetal de espécies herbáceas usadas no processo de recuperação ambiental de área degradada pela mineração de carvão.

-A inoculação com FMA autóctone das áreas de mineração de carvão promove maior absorção de nutrientes e conseqüente maior crescimento vegetal de espécies herbáceas quando comparado a FMA não autóctone.

-A inoculação de FMA e bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Bradyrhizobium* e *A. brasilense*) separadamente e coinoculadas, promove aumento da atividade biológica do solo (glomalina, atividade da diacetato de fluoresceína e fosfatase ácida) e conseqüente disponibilização de nutrientes do solo para as plantas em áreas degradadas em processo de recuperação ambiental.

#### 3.2 OBJETIVOS

##### 3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da aplicação de inoculantes a base de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias promotoras do crescimento de plantas sobre a atividade biológica do solo e o crescimento de herbáceas pioneiras empregadas na revegetação de áreas de mineração de carvão em recuperação.

##### 3.2.2 Objetivos Específicos

#### Capítulo 1 – Experimento a campo

-Avaliar a campo o efeito de inoculante a base de *Rhizophagus intraradices* ou *A. brasilense* sobre a absorção de nutrientes e o crescimento de plantas herbáceas.

-Avaliar a campo o efeito de inoculante a base de *R. intraradices* ou *A. brasilense* sobre a atividade enzimática do solo.

## Capítulo 2 – Experimento em casa de vegetação

-Avaliar a eficiência de um isolado de FMA autóctone e de um inoculante contendo *R. intraradices* (não autóctone) na promoção de crescimento vegetal e absorção de nutrientes de *Crotalaria juncea* inoculadas com BPCP (*Bradyrhizobium* e *A. brasilense*).

-Avaliar a atividade enzimática de solo e disponibilização de nutrientes após inoculação de isolado de FMA autóctone e um inoculante contendo *R. intraradices* (não autóctone) em *Crotalaria juncea*, em associação com BPCP, para a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão.



#### **4 CAPÍTULO 1 – *Rhizophagus intraradices* E *Azospirillum brasilense* PROMOVEM O AUMENTO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO E CRESCIMENTO DE PLANTAS HERBÁCEAS EM ÁREA DE MINERAÇÃO DE CARVÃO EM RECUPERAÇÃO**

##### **4.1 RESUMO EXPANDIDO EM PORTUGUÊS DO CAPÍTULO**

A poluição ambiental é uma preocupação crescente em todo o mundo, visto que atividades industriais têm contribuído para a degradação do meio ambiente, trazendo riscos para a saúde dos seres vivos (Maszenan et al., 2011; Saxena e Bharagava, 2017; Antoniadis, et al., 2019). Dentre as atividades mais poluidoras em nível mundial está a mineração de carvão, fonte de severas degradação e poluição (Zhengfu et al., 2010, Feng et al., 2019). Durante o processo de mineração, ocorre a retirada da vegetação, modificação das formas de relevo e paisagens, altera-se o solo, e se perturbam os regimes hidrológicos (Ahirwal e Maiti, 2016; Kumar et al., 2015). Esses ambientes degradados precisam passar por um processo de recuperação que envolvem melhorias nas propriedades químicas e físicas do solo, permitindo o estabelecimento da fauna do solo e crescimento das plantas (Upadhyay et al., 2016; Feng et al., 2019). Os processos para recuperação desses ambientes incluem a reconstrução do solo e posterior plantio de espécies pioneiras associadas a microrganismos (Rocha-Nicoleite et al., 2013). Os microrganismos podem atuar na estruturação do solo, desintoxicação de contaminantes nocivos, modulação de respostas de defesa das plantas à fatores de stress, além do controle biológico de fitopatógenos (Elsgaard et al., 2001; Filip, 2002; Giller et al., 1998). Sob tais as condições, os microrganismos associados às plantas podem facilitar a absorção de nutrientes através do aumento da sua disponibilidade para raízes das plantas (Rajkumar et al., 2012). Este trabalho teve como objetivo avaliar a campo os efeitos da aplicação de inoculantes a base de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (*Rootella* BR – *Rhizophagus intraradices*) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Azospirillum brasilense*) sobre o aumento da atividade biológica do solo e crescimento de herbáceas pioneiras empregadas na revegetação de áreas de mineração de carvão em recuperação. Em um experimento em área de mineração de carvão em processo de recuperação ambiental no Sul do Brasil (Treviso – SC), foram aplicados quatro tratamentos de inoculação às espécies herbáceas pioneiras utilizadas no processo de recuperação: NI

(Controle – Não inoculado), AZO (*A. brasilense*), FMA (*R. intraradices*) e a coinoculação de AZO e FMA; todos com 9 repetições. O consórcio de espécies pioneiras utilizadas incluía *Lablab purpureus*; *Paspalum notatum*; *Crotalaria juncea*; *Neonotonia wightii*; *Stylosanthes guianensis*; *Andropogon gayanus* e *Trifolium repens*. Aos 75 e 180 dias foi coletado biomassa vegetal das espécies presentes na área e determinada a massa seca, o teor e o acúmulo de N e P. Também foi coletado um pool de raízes para determinação da colonização micorrízica e amostras de solo para determinação do teor de glomalina do solo e atividade da fosfatase ácida e da diacetato de fluoresceína (DAF). Aos 180 dias foi realizada a caracterização fitossociológica das plantas espontâneas. Os dados foram analisados com análise de variâncias e separação de médias por intervalo de confiança a 5% de probabilidade de erro. A inoculação com os microrganismos promoveu maior produção de biomassa vegetal (62-89%) e acúmulo de P e N (34-75% e 70-85 %) nas plantas aos 180 dias, comparativamente ao tratamento não inoculado. Estes resultados provavelmente decorrem do maior percentual de colonização micorrízica aos 75 dias promovido pela inoculação de Rootella BR e da associação com *A. brasilense*, o que garantiu uma maior atividade biológica do solo e consequente maior aporte de nutrientes e água às plantas desde o início da associação, além de amenização de estresse. Das espécies testadas, *Crotalaria juncea* teve a maior produção de biomassa aos 75 e 180 dias (67% e 76%), seguida pelo *Lablab purpureus* (3% e 0,5%), enquanto as outras espécies semeadas não conseguiram se estabelecer. Outros estudos têm indicado que crotalária é tolerante a solos degradados ou contaminados com elementos traço, e se beneficia da inoculação de FMA (Melo et al., 2014; Ferreira et al., 2018). Aos 180 dias, ocorreram 8 famílias e 20 espécies de plantas espontâneas na área, com predominância da família Poaceae (74%), seguida de Cyperaceae (9%), Onagraceae (8%) e Asteraceae (6%), sugerindo que as espécies pioneiras presentes na área não dificultam o processo de sucessão ecológica. As espécies espontâneas tiveram uma participação significativa no processo de revegetação das áreas em recuperação, contribuindo para o acúmulo de biomassa vegetal e a ciclagem de nutrientes. O teor de P e N nas espontâneas aos 180 dias variou entre as famílias e espécies vegetais, mas não entre tratamentos. Os teores de P variaram de 1,5 a 5,8 g kg<sup>-1</sup>, enquanto os teores de N variaram de 10,2 a 28 g kg<sup>-1</sup>). Em conclusão, a inoculação de *R. intraradices* e *A. brasilense*, isolados ou combinados, promoveu um aumento da atividade biológica do solo (Glomalina, DAF e fosfatase ácida), o crescimento de espécies pioneiras chave e o acúmulo de nutrientes, mostrando a eficiência desta técnica para a recuperação de áreas degradadas pela mineração de

carvão. *C. juncea* possui uma alta capacidade de colonizar áreas em recuperação e permitiu o surgimento de espécies espontâneas, contribuindo ainda mais para o processo de recuperação. Há predominância de espécies da família Poaceae no processo inicial de sucessão ecológica em uma área de mineração de carvão em recuperação no Sul do Brasil.

Os resultados e a discussão do estudo podem ser encontrados no artigo em anexo abaixo.

#### 4.2 *Rhizophagus intraradices* AND *Azospirillum brasilense* INOCULATION IMPROVES SOIL BIOLOGICAL ACTIVITY AND GROWTH OF HERBACEOUS PLANTS IN A RECOVERING COAL-MINING AREA

#### 4.3 ABSTRACT

We assessed, in a field experiment, the effects of arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus intraradices*) and growth-promoting bacteria (*Azospirillum brasilense*) on the soil biological activity and the growth of key pioneer species used in revegetation of coal-mining areas undergoing recovery. We applied four inoculation treatments to the pioneer plant species used in the recovery process: NI (Control – Non-inoculated), AZO (*A. brasilense*), AMF (*R. intraradices*), and co-inoculation of AZO and AMF. We collected plant biomass on the 75th and 180th days to measure plant dry mass, N and P concentration, and accumulation. We also collected soil to quantify glomalin content and soil enzyme activity. After 180 days, we did a phytosociological characterization of the remaining spontaneous plants. The microorganisms promoted increases in soil glomalin, acid phosphatase activity, and fluorescein diacetate activity. The inoculation was linked to higher plant biomass production (62.2-89.0%) and more P and N accumulation (34-75% and 70-85%) in plants at 180 days, compared to the non-inoculated treatment. *Crotalaria juncea* produced the highest biomass at 75<sup>th</sup> and 180<sup>th</sup> days (67% and 76%), followed by *Lablab purpureus* (3% and 0.5%), while the other species failed to establish. At 180 days, we observed twenty spontaneous plant species growing in the area, primarily from the Poaceae family (74%), suggesting that the pioneer species present in the area do not hinder the ecological succession process. Inoculation of *R. intraradices* and *A. brasilense*, isolated or combined, promoted increases in soil biological activity, growth

of key pioneer plant species, and nutrient accumulation, indicating its potential as a technique for recovery of degraded lands by coal mining.

**Keywords:** *Crotalaria juncea*, Arbuscular mycorrhizal fungi, Plant growth-promoting bacteria, Nutrient uptake.

#### 4.4 INTRODUCTION

Pollution is a growing concern worldwide, as several activities have contributed for environment degradation, raising risks to different forms of life (Maszenan et al. 2011; Saxena and Bharagava 2017; Antoniadis et al. 2019). The most polluting activities worldwide include discharge of industrial effluents, fossil fuel extraction, residential sewage and landfills without proper treatment, and pesticide use in agricultural areas (Ali et al. 2013; Mahar et al. 2016; Antoniadis et al. 2017; Matos 2020). Coal is vital for the global energy matrix (Hardin 2013), but its extraction is a potential source of environmental degradation and pollution (Zhengfu et al. 2010; Feng et al. 2019). Coal mining incurs vegetation removal, geomorphological and landscape changes, soil degradation, and disruption of hydrological regimes (Ahirwal and Maiti 2016; Kumar et al. 2015). It also results in "Acid Mine Drainage" (AMD), formed from the oxidation of coal tailings exposed to oxygen and moisture. AMD leaches into waterways, causes acidification due to sulfur oxidation, and affects the availability of trace elements, such as Al, Mn, Zn, Fe, Cu, Pb, and Se (Silva et al. 2013).

Coal mining has caused the degradation of more than 5,700 hectares in Southern Brazil (Brasil 2016). These areas' environmental recovery processes have been initiated, using herbaceous and tree species, but studies of these species associated with microorganisms to accelerate the recovery processes are still incipient. Those degraded environments require a recovery process that involves improvements in soil chemical and physical attributes, allowing plant growth and the establishment of soil fauna (Upadhyay et al. 2016; Feng et al. 2019). Soil reconstruction and subsequent planting of pioneer species associated with microorganisms aim to recover those environments (Rocha-Nicoleite et al. 2013). Soil is colonized by many genetically diverse microorganisms, which play crucial roles in nutrient cycling and soil formation processes (Ahemad and Khan 2013). Microorganisms contribute to soil structuring, detoxifying harmful contaminants, modulation of plant responses to stress factors, and biological control of phytopathogens (Elsgaard et al. 2001; Filip 2002; Giller et al. 1998). Plant-associated microorganisms can facilitate nutrient uptake by increasing their availability to plants (Rajkumar et al. 2012; Moura et al. 2016; Pellegrini et al. 2021).

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) enhance plant growth in soils with low nutrient availability and toxic metal contamination (Yuan et al. 2013; Ma et al. 2016),

such as coal-mining regions. PGPB produce growth-promoting hormones such as auxins (IAA, indole-3-acetic acid), cytokinins, gibberellins, and ethylene (Rajkumar et al. 2012; Ma et al. 2016). Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are also crucial for protecting host plants against heavy metal toxicity (Meier et al. 2012; Khan et al. 2014; Meyer et al. 2017). AMF benefits to plants include increased nutrient uptake, especially P, water stress mitigation, and pathogen control (Hwang et al. 1992; Newsham et al. 1995). AMF also contribute to soil aggregate stability due to the large number of hyphae and production of glycoproteins called glomalins (Jastrow et al. 1998; Berbara et al. 2006; Bedini et al. 2009).

Many works have suggested using microorganisms in reclamation of degraded areas. However, since few have evaluated the application of such techniques in the field, more studies are needed to evaluate the inoculation and co-inoculation of PGPB and AMF in multiple environmental degradation scenarios (Arora 2020). Microorganisms isolated from degraded areas are more adapted to such conditions and may be more efficient in promoting plant growth in the recovery process (Requena et al. 1997). However, there are hurdles to the application of inoculants to specific areas. Thus, the use of commercial inoculants may be a good strategy if they can promote plant growth in such conditions.

*Azospirillum brasilense* and *Rhizophagus intraradices* stand out among the PGPB and AMF species used commercially in Brazil. *A. brasilense* is a PGPB that associates with various plant species, promoting N fixation, phytohormone production, and increased root growth, enhancing water and nutrients uptake and, consequently, plant growth and yield (Barassi et al. 2008). *R. intraradices*, a generalist and fast-growing AMF species, is the main component of many commercial AMF inoculants, and its efficacy in agricultural species has been proven in Brazil (Stoffel et al. 2020a, b).

Inoculation of *A. brasilense* has been used for many years for plant growth promotion in several agricultural crops, with the most expressive effects occurring under stress conditions (Naoe et al. 2020; Leite et al. 2019). The addition of *A. brasilense* is beneficial for several crops, such as soybeans (Hungria et al. 2015; Moretti et al. 2020), common beans (Filipini et al. 2020), maize (Hungria et al. 2010; Zeffa et al. 2019), wheat (Hungria et al. 2010), rice (Guimarães et al. 2020), and *Panicum maximum* (Mishra et al. 2008). Studies on *A. brasilense* for recovery of areas degraded by mining are scarce, and searches on the Scopus platform and Web of Sciences with the terms "Coal mining" and "A. brasilense" returned only one article (Rios Montes et al. 2020). That work evaluated how the soil bacterial community responded to biochar applied with inoculations of *A.*

*brasilense*, AMF, and *Mortierella* sp on *Brachiaria decumbens*. The authors found no effect of *A. brasilense* on bacterial dynamics compared to the control treatment; however, plant growth promotion was not quantified.

This study aims to evaluate the effects of inoculants based on arbuscular mycorrhizal fungi (Rootella BR - *Rhizophagus intraradices*) and plant growth-promoting bacteria (*Azospirillum brasilense*) on the increase of soil biological activity and growth of pioneer herbaceous plants used in the revegetation for reclamation of coal mining areas in Brazil.

## 4.5 MATERIAL AND METHODS

### 4.5.1 General Description

The experiment was set up in an area degraded by coal mining (Rio Pio, Treviso, State of Santa Catarina - Southern Brazil; 28°31'51.07" S, 49°27'50.05 "W). The region's climate is Cfa, according to the Köppen classification, with an annual mean temperature of 19.3°C and 1409-mm rainfall (EPAGRI 2001). The soil in the experimental area was reconstituted by placing over the tailings a 50-cm layer of soil borrowed area. The soil received 29 Mg ha<sup>-1</sup> of limestone (PRNT 100%), 52 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of poultry litter, 150 Mg ha<sup>-1</sup> of peat (Turfa Fértil Agro S/A, Brasil, 29°1'22.41 "S 49°29'56.06 "O), besides 24 kg ha<sup>-1</sup> of N, 187 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and 133 kg ha<sup>-1</sup> of K<sub>2</sub>O as mineral fertilizers. The constructed physical-chemical attributes were: organic matter (MO) 87 g dm<sup>-3</sup>; pH in water 5.4; 105.0 mg P kg<sup>-1</sup> (Mehlich I); 209.9 mg K kg<sup>-1</sup>; 10.0 cmol<sub>c</sub> Ca dm<sup>-3</sup>; 5.0 cmol<sub>c</sub> Mg dm<sup>-3</sup>; 20.6 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> cation exchange capacity (CEC); 76% base saturation (V%).

The inoculation treatments were no inoculation (NI), inoculation with *A. brasilense* (Nitro 1000<sup>®</sup>; 200 mL ha<sup>-1</sup>) (AZO), inoculation with *R. intraradices* (Rootella BR<sup>™</sup>; 120 g ha<sup>-1</sup>) (AMF), and co-inoculation of *A. brasilense* and *R. intraradices* (AZO+AMF). The Nitro 1000<sup>®</sup> inoculant contains *Azospirillum brasilense* AbV5 and AbV6 strains at 2.0 x 10<sup>8</sup> viable cells mL<sup>-1</sup>. Rootella BR<sup>™</sup> inoculant contains 2.08 x 10<sup>4</sup> viable propagules of *R. intraradices* per gram of product. Nine replicates were used for each treatment, totaling 36 experimental plots of approximately 1100m<sup>2</sup> randomly distributed in a total area of 4.0 ha.

The plant consortium contained *Lablab purpureus* (25.0 kg seed ha<sup>-1</sup>), *Paspalum notatum* (5.0 kg ha<sup>-1</sup>), *Crotalaria juncea* (5.0 kg ha<sup>-1</sup>), *Neonotonia wightii* (5.0 kg ha<sup>-1</sup>),

*Stylosanthes guianensis* (4.0 kg ha<sup>-1</sup>), *Andropogon gayanus* (2.5 kg ha<sup>-1</sup>), and *Trifolium repens* (2.0 kg ha<sup>-1</sup>).

At 75 and 180 days after sowing, plant samples were collected with a 50 x 50 cm grid to evaluate dry shoot mass (SDM) and N and P tissue concentration. Root samples were collected to determine mycorrhizal colonization.

#### 4.5.2 Plant Tissue Analysis

After collection, shoots, and roots were separated, dried (60 °C) to constant weight, and weighed. The material was ground and submitted to sulfur digestion for macronutrient analysis (N and P). P concentration was obtained by colorimetry, and N concentration by the micro-Kjeldahl method, as described in Tedesco et al (1995). Plant accumulated N and P were obtained, multiplying the concentration in shoots biomass and roots by their dry mass.

#### 4.5.3 AMF Root Mycorrhizal Colonization and Soil Glomalin

For mycorrhizal colonization, thin root samples were washed in tap water, clarified in KOH 10%, acidified in HCl 2%, and stained with trypan blue (Koske and Gemma 1989). The colonization percentage was quantified by the intersection method (McGonigle et al. 1990b); briefly, 1.0 cm thin stained root fragments were placed on microscope slides and observed at 200 x magnification in a light microscope. About 100 intersections per sample were examined to determine the total mycorrhizal colonization.

Soil easily extractable and total glomalin contents were determined according to Wright and Upadhyaya (1998) with extraction in sodium citrate in an autoclave and determined by the Bradford method (1976).

#### 4.5.4 Fluorescein diacetate (FDA) and acid phosphatase analysis

Hydrolysis of fluorescein diacetate (FAD) was determined using 1.0 g of soil incubated at 25 °C for two hours with 0.1 mL of 4.8 mmol<sup>-1</sup> fluorescein diacetate solution and 19.9 mL of buffer solution with 60 mmol sodium phosphate L<sup>-1</sup> and pH 7.6. The reaction was stopped by adding 20 mL of Acetone and the solution was centrifuged at



4,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was filtered, and the extract absorbance measured at 490 nm (Alef and Nannipieri, 1995).

For acid phosphatase activity quantification, 1.0 g of soil was mixed with p-nitrophenyl phosphate in a modified universal buffer solution (MUB pH 6.5) and incubated at 37 °C for one hour, and hydrolysis inhibited by adding calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) 0.5 mol L<sup>-1</sup> and NaOH 0.5 mol L<sup>-1</sup>. Subsequently, the extract was filtered, and the absorbance quantified in a spectrophotometer at 410 nm (Alef and Nannipieri, 1995).

#### 4.5.5 Statistical Analysis

All data were submitted to the homogeneity of variance analysis using Bartlett's test before subsequent analysis of variance (ANOVA). When effects were significant, means were separated by confidence interval at 5% error probability. Graphs were generated, including standard errors of the mean. All analyses were performed in the statistical program R (R Core Team 2020) and the package "Rmisc" (Hope 2013). Principal component analysis (PCA) of variables was performed using the "vegan" and "ggbiplot" package. Variables with Vif ("HH" package) over 10 were removed from the model before performing the PCA.

## 4.6 RESULTS

Inoculation with AMF, alone or combined with *Azospirillum* (AMF + AZO increased plant biomass at 75 days after seeding, compared with NI and AZO treatments (Fig. 1A). In the second sampling, at 180 days, *Azospirillum*-inoculated plants (AZO), AMF, and AMF + AZO plants accumulated more biomass (62.2-89.0%) than non-inoculated (NI) plants (Fig. 1B). *C. juncea* showed the highest biomass production with 67% and 76% contribution at 75 days and 180 days, respectively. *L. purpureus* made up 3 % of the total biomass at 75 days and 0.5 % at 180 days (Fig. 1A and 1B). As the other species did not establish themselves, spontaneous species made an important contribution to biomass production; they comprised 30 % of the total biomass at 75 days and 24 % at 180 days (Fig. 1A and 1B).

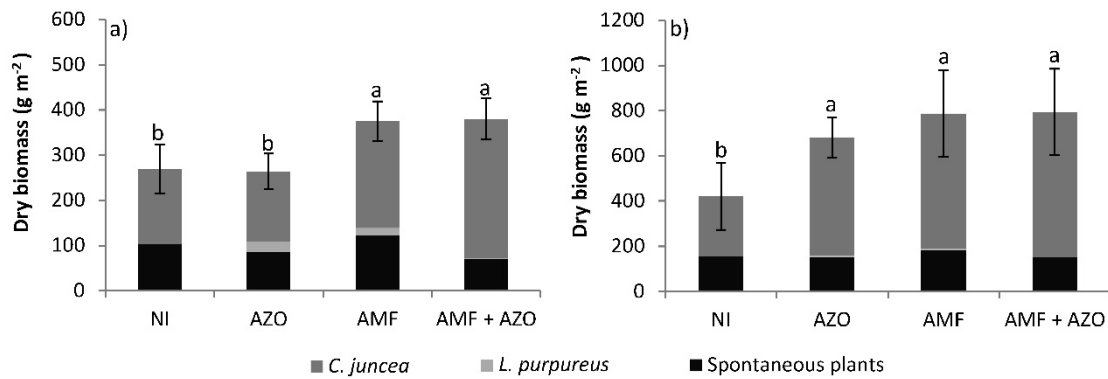


Figure 1. Dry biomass of *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus*, and spontaneous plants, 75 days (a) and 180 days (b) after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. Error bars with confidence interval (CI) of 95% separating the different treatments. Different letters indicate significant difference by CI at 5 % error probability level.

In the 180-day collection, we identified the resident vegetation and found eight families and 20 species of spontaneous plants (Table S1). Plants of the Poaceae family comprised 74 % of spontaneous species biomass, while Cyperaceae contributed 9 %, Onagraceae (represented by a single species, *Ludwigia leptocarpa*) add 8 %, and 6 % of the biomass are Asteraceae. The families with the smallest biomass production were Commelinaceae, Plantaginaceae, Pontederiaceae, and Solanaceae, adding 3 % of the total spontaneous plant biomass (Table S1).

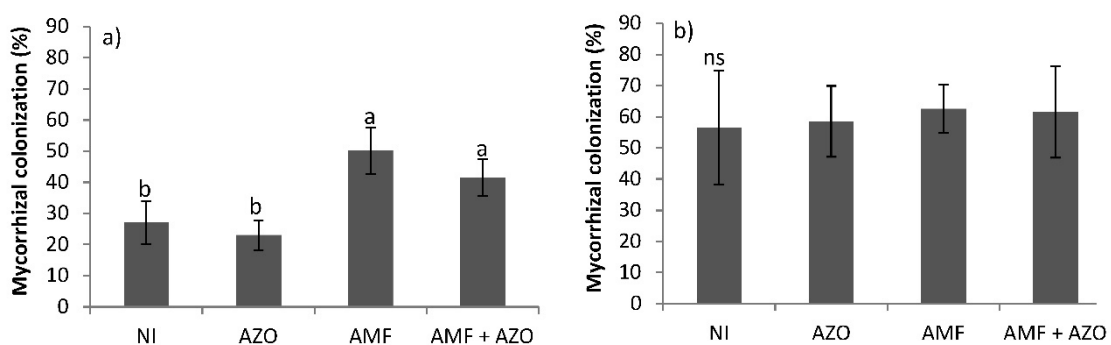


Figure 2. Mycorrhizal colonization of a pool of roots of *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus* and spontaneous species, 75 days (a) and 180 days (b) after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO) or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. Error bars with confidence interval (CI) of 95% separating the different treatments. Different letters indicate significant differences at a 5% error probability level by CI.

Mycorrhizal colonization at 75 days was higher in treatments inoculated with the mycorrhizal inoculant (AMF and AMF + AZO) than in plants with no AMF inoculation (Fig. 2A). At 180 days, there were no differences among treatments in mycorrhizal colonization (Fig. 2B).

Plant P and N concentrations did not differ between inoculation treatments in both sampling dates (Table 1). *Lablab purpureus* had the highest P concentration at 75 days, 86 % higher than *Crotalaria* and spontaneous plants. N concentration in *Crotalaria juncea* and *Lablab purpureus* had similar values, while the spontaneous plants' concentrations were 27% lower (Table 1). At 180 days, the highest P and N concentrations occurred in the spontaneous plants (Table 1).

Table 1. Phosphorus (P) and nitrogen (N) concentrations (mean±CI) in *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus*, and spontaneous plants, 75 and 180 days after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azopirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO) or not inoculated (NI), in a Coal-mining region undergoing environmental recovery process.

Treatments	P concentration (g kg <sup>-1</sup> )			N concentration (g kg <sup>-1</sup> )		
	<i>C. juncea</i>	<i>L. purpureus</i>	Spontaneous plants	<i>C. juncea</i>	<i>L. purpureus</i>	Spontaneous plants
75 days						
NI	3.24±0.30	6.43±1.03	3.63±0.57	24.55±2.83	20.69±5.32	18.58±2.51
AZO	3.12±0.30	6.24±1.18	3.17±0.65	25.34±1.46	24.45±5.58	17.65±5.33
AMF	3.28±0.44	5.60±0.89	3.41±0.53	26.33±3.35	21.25±3.60	18.66±5.46
AMF + AZO	3.36±0.29	6.80±1.05	3.51±0.58	25.94±2.60	25.59±6.79	16.98±4.36
Average ± CI	3.25±0.15	6.20±0.53	3.43±0.25	25.60±1.12	23.58±2.53	17.97±1.94
CV %	13.10	18.29	21.76	12.58	22.96	31.90
180 days						
NI	1.63±0.28	NA <sup>1</sup>	2.78±0.30	8.83±1.40	NA	16.11±2.25
AZO	1.57±0.37	4.99±0.69	2.32±0.21	9.81±2.16	17.45±7.06	19.63±2.06
AMF	1.62±0.27	5.36±0.47	2.85±0.45	9.68±0.75	16.60±4.83	17.44±2.65
AMF + AZO	1.53±0.33	4.65 <sup>#</sup>	2.75±0.28	9.66±1.42	16.14 <sup>#</sup>	16.11±2.52
Average ± CI	1.59±0.13	5.11±0.34	2.67±0.15	9.50±0.65	16.81±4.21	17.32±1.12
CV %	25.58	10.11	15.07	19.63	26.32	17.82

<sup>1</sup>NA = Species absent from the treatment.

<sup>#</sup> Species found in two or fewer plots; confidence interval (CI) could not be calculated.

At 180 days, spontaneous plants' P and N concentrations varied among plant families and species. P concentrations ranged from 1.48 to 5.75 g kg<sup>-1</sup>, while N concentrations ranged from 10.2 to 27.9 g kg<sup>-1</sup> (Table S1). Among the four most abundant spontaneous

plant families, Asteraceae had the highest concentrations of both nutrients, with  $4.19 \pm 0.48 \text{ g kg}^{-1}$  of P and  $24.17 \pm 3.34 \text{ g kg}^{-1}$  of N. Cyperaceae had  $2.21 \pm 0.54 \text{ g P kg}^{-1}$  and  $18.78 \pm 2.02 \text{ g N kg}^{-1}$ , while Poaceae concentrations had  $2.56 \pm 0.15 \text{ g P kg}^{-1}$  and  $16.23 \pm 1.04 \text{ g N kg}^{-1}$ .

Accumulated P (PA) at 75 days was 52% higher in treatments with AMF inoculation (AMF and AMF + AZO) than in NI and AZO treatments (Fig. 3A). At 180 days, AMF and AMF + AZO treatments also had higher P accumulation than the non-inoculated treatment (NI, a 72% increase), while the AZO treatment was in an intermediate position, neither differing from NI nor the other inoculated treatments (Fig. 3B).

N accumulation (NA) at 75 days was 44% higher in AMF and AMF + AZO than in NI and AZO (Fig. 3C). At 180 days, the treatment with *A. brasilense* also accumulated more N, together with AMF and AMF + AZO, in the biomass compared to NI (Fig. 3D) (69.7-89.0% increment).

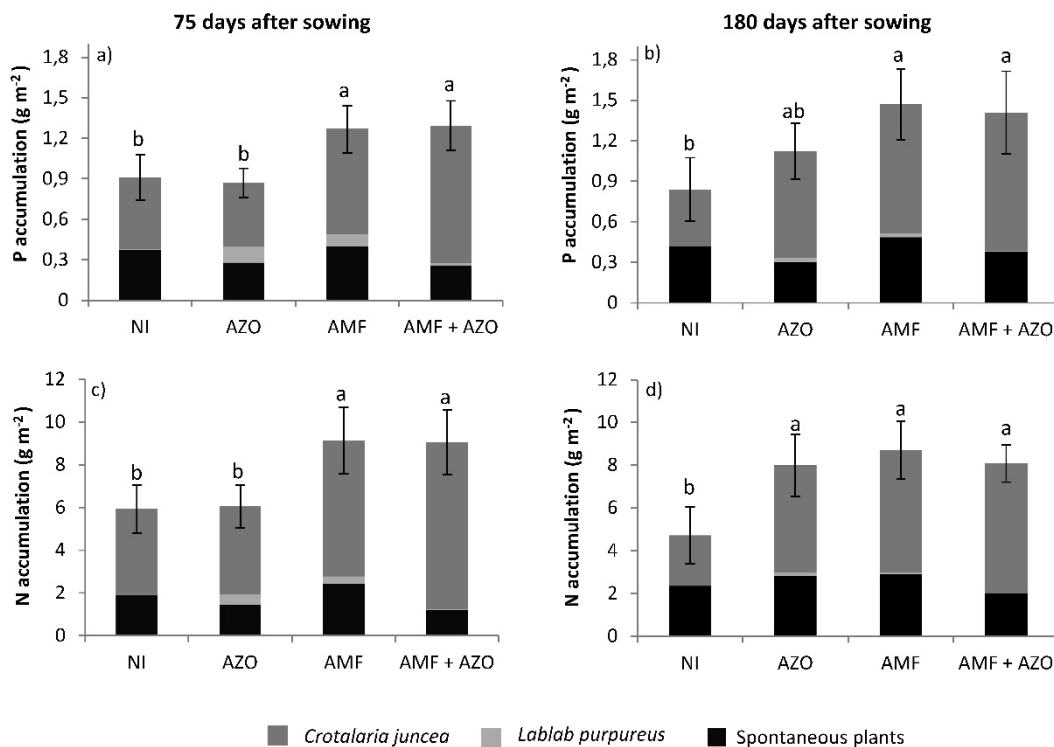


Figure 3. Phosphorus and nitrogen accumulation of *Crotalaria juncea*, *Lablab purpureus*, and spontaneous plants, 75 days (A) and 180 days (B) after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. Error bars with confidence interval (CI) of 95% separating the different treatments. Different letters indicate significant difference by CI at 5% error probability level.

Soil glomalin content, fluorescein diacide hydrolysis. and acid phosphatase activity were affected by the inoculation treatments in both sampling times. Inoculation with AMF + AZO differed from NI treatment, as it promoted increases in all glomalin fractions and soil enzyme activity. This was followed by the AMF treatment, which differed from the control in all variables except for the NI treatment in GDE at 75 days. The AZO inoculated treatment was in an intermediate position in all glomalin fractions at 75 days, GDE at 180, and FDA at 75 days. There were no differences between AZO, AMF and AZO + AMF treatments in soil glomalin fractions and enzyme activity (FDA and acid phosphatase).

Table 2. Soil glomalin (easily extractable (GEE), difficult to extract (GDE) and total (GT)), hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) and acid phosphatase activity 75 days and 180 days after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process.

Treatments	Glomalin			Enzimatic Activity	
	GEE	GDE	GT	FDA	Phosfatase
<b>75 days</b>					
NI	0.84 b	2.70 b	3.54 b	33.26 b	238.77 b
AZO	1.09 ab	3.35 ab	4.44 ab	51.09 ab	360.66 a
AMF	1.17 a	3.43 ab	4.60 a	58.99 a	402.74 a
AMF + AZO	1.43 a	3.82 a	5.25 a	62.63 a	400.38 a
Average ± CI	1.14±0.11	3.33±0.22	4.46±0.30	51.49±6.02	350.6±34.6
CV %	20.79	15.56	15.01	27.63	22.84
<b>180 days</b>					
NI	0.88 b	2.80 b	3.68 b	27.41 b	270.42 b
AZO	1.29 a	3.38 ab	4.67 a	55.94 a	412.17 a
AMF	1.27 a	3.64 a	4.91 a	54.81 a	373.64 a
AMF + AZO	1.30 a	3.46 a	4.76 a	47.09 a	373.54 a
Average ± CI	1.18±0.09	3.32±0.17	4.50±0.25	46.31±5.85	357.44±28.75
CV %	18.94	12.09	12.87	28.96	19.34

\* Different letters indicate significant difference by CI at 5% error probability level.

The principal components analysis summarizes the data presented above and their interrelationships (Figure 4). The two analysis components seized a total data variation of 69.0%. The confidence interval at a 5% probability of error separated the AMF and AMF + AZO treatments from the NI treatment. All variables in the PCA had higher values

in AMF and AMF + AZO treatments than in all the others. There was clustering of the FDA, Acid phosphatase, GEE and TG variables. There was also clustering of mycorrhizal colonization, dry biomass, PA, and NA data.

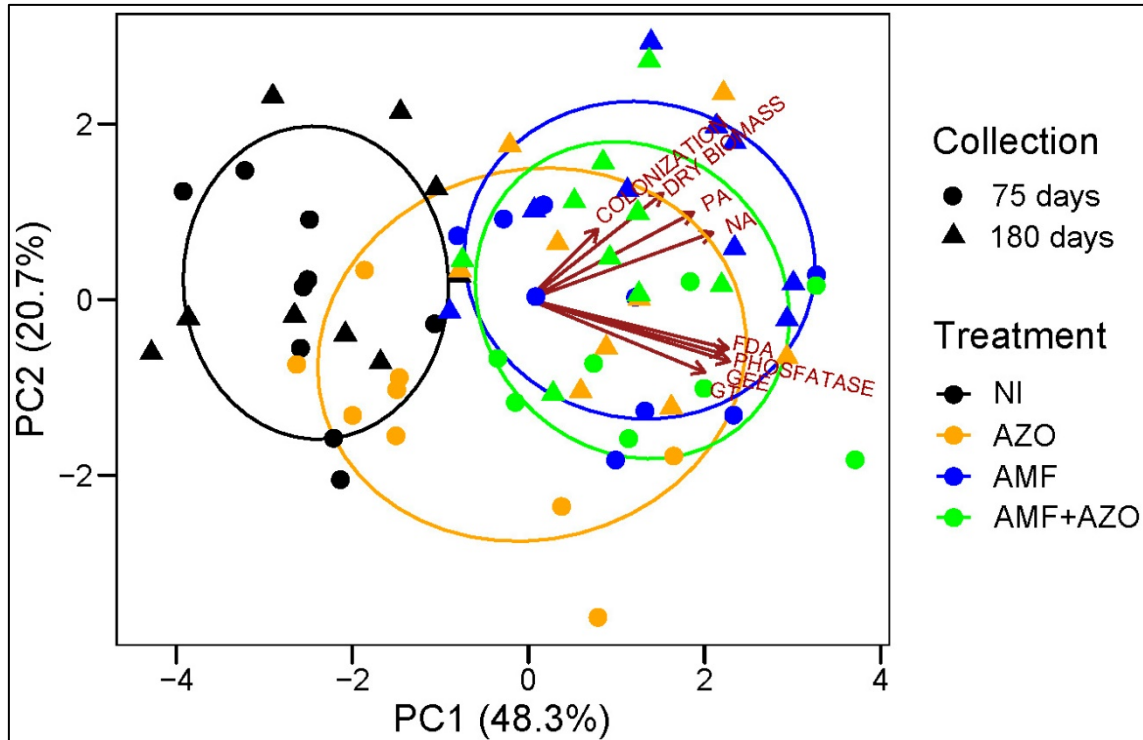


Figure 4. Principal component analysis (PCA) of variables of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azospirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO), or not inoculated (NI), in two samplings (75 days and 180 days after sowing) in a coal-mining region undergoing environmental recovery process. PA = P accumulation; NA = N accumulation; FDA = hydrolysis of fluorescein diacetate; EEG = easily extractable glomalin; TG = total glomalin.

#### 4.7 DISCUSSION

Inoculation of herbaceous plants with *R. intraradices* and *A. brasilense* is promising for the initial recovery process of areas degraded by coal mining. The mycorrhizal inoculant showed effect since the first evaluation, 75 days after sowing, while *A. brasilense* showed effect 180 days after sowing. The microorganisms promoted higher plant biomass production, as well as more P and N accumulation in plants. Those results are linked to higher root mycorrhizal colonization rates at 75 days promoted by AMF inoculation and increasing soil enzyme activity with inoculations. The mycorrhizal symbiosis enhances nutrient and water uptake by plants since the beginning of the

association, besides alleviating stress (Smith and Smith 2012). The inoculants based on *A. brasilense* and *R. intraradices* are commercially available and are easy to acquire by companies and institutions managing the reclamation of degraded areas.

At 180 days, there were no differences in mycorrhizal colonization between treatments, probably due to the presence of AMF propagules from neighboring natural areas or inoculated plots, transported by rain, wind, or living organisms (Paz et al. 2021). AMF inoculation at sowing warrants better initial plant development, and consequently, soil cover, with marked results at 180 days.

The efficiency of the *R. intraradices* (Rootella BR) inoculant has been shown in crops such as soybean (Stoffel et al. 2020a) and corn (Stoffel et al. 2020b). However, this is the first study using this isolate for reclamation of degraded areas. Other *R. intraradices* have already shown efficiency in the reclamation of areas contaminated with coal waste by increasing vegetal biomass, soil bacterial and fungal populations, and acid phosphatase activity (Bi et al., 2018).

There are reports of beneficial effects of *Azospirillum* in mining areas undergoing environmental reclamation. Widawati and Suliasih (2019) evaluated the potential use of microorganisms in such settings, found promising results of *Azospirillum lipoferum* CBT4 inoculation in *Sorghum bicolor*. The isolate, initially selected for its potential for IAA production and P solubilization, survived four types of tin-contaminated soil and enhanced *S. bicolor* growth. Thus, our study is the first to test the effect of *A. brasilense* in promoting plant growth in a coal mining area under reclamation.

We found increases in soil enzyme activity with inoculation of two microorganisms. The increase in enzyme activity is linked to greater availability of nutrients and, consequently, a greater production of plant biomass by the plants (Souza et al. 2020; Ghosh et al. 2020). This relationship between the variables was evident in our study, where the treatments with the highest growth and plant tissue nutrient accumulation also had the highest biological activity (Figure 4). All variables/indicators of soil biological activity (Glomalin, FDA, and acid phosphatase) were efficient in demonstrating the differences and benefits provided by the treatments.

The co-inoculated treatment (AMF + AZO) did not increase any variable compared with the treatment inoculated only with AMF. There are, however, reports of synergistic effects of coinoculation with these microorganisms. Co-inoculation of cowpea with *R. clarus* and *A. brasilense* promoted increases in N, P, K, Ca, Mg, uptake, in addition to

higher biomass, nodule number, protein concentration, and nitrogenase and phosphatase activity (Rabie et al. 2005). Response to co-inoculation of AMF and *Azospirillum* may differ with plant species. Negalur and Lakshman (2016) found a positive effect of AMF (*Glomus geosporum*) inoculation on the shoot and root mass of three legumes (*Cicer arietinum* L., *Vigna unguiculata* L., and *Vigna radiata* L.). However, the co-inoculation of AMF and *Azospirillum* sp. promoted increases in shoot biomass, compared to AMF alone, only in *Vigna radiata*. The absence of synergism may be related to soil nutrient availability, weather conditions, or plant species.

In our study, the species with the highest plant biomass was *C. juncea*, a legume with high potential for biomass production and N biological fixation (Foster et al. 2017). *C. juncea* N concentration (25.6 g kg<sup>-1</sup>) at 75 days after sowing was higher than in agricultural systems (20.2 g kg<sup>-1</sup>) measured by Pissinati et al. (2018). In work by Pissinati et al. (2018), N concentration in the *C. juncea* tissue lowered after 110 days, a pattern similar to our study, in which the N concentration was lower at 180 days than in the previous sampling. That must result from the plant senescence process. Those high N concentrations in *C. juncea*, associated with high biomass production, indicate that the species is very efficient in cycling this nutrient. P concentrations in *C. juncea* were similar to values found in the spontaneous species but lower than in *L. purpureus*.

*C. juncea* is tolerant to degraded and trace-element contaminated soils, especially with AMF inoculation (Melo et al. 2014; Ferreira et al. 2018). AMF can improve nutrient uptake and promote plant growth in degraded environments, including those contaminated with trace elements. In a study by Ferreira et al. (2015), inoculation of *R. clarus* increased the supply of P to the plants and decreased Cu translocation of from roots to shoots.

AMF can decrease availability of trace elements through retention and immobilization in cell wall components of intra- and extra-radical hyphae. That may also happen due to compartmentalization of the metal within fungal spores (Gonzalez-Chavez et al. 2002, Meier et al. 2012, Cornejo et al. 2013). Another mechanism promoted by AMF is glomalin production, which can immobilize substantial amounts of trace elements in soils (Gonzalez-Chavez et al. 2004, Cornejo et al. 2008). In our study, we verified the effects of treatments on the increase of soil glomalin levels, including for the treatment with *A. brasilense*. This effect may be associated with AMF autochthonous to the area, and the glomalin quantification technique, which is not specific, as it quantifies other soil proteins present that are produced by other organisms (Gillespie et al., 2011). Besides



those effects, inoculation can promote increases in a and b chlorophyll concentrations, Mg and Fe uptake (necessary for the photosynthetic process), as well as increase in activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), crucial for cellular protection of plants under stress conditions (Ferreira et al. 2015).

The spontaneous plants had substantial participation in revegetating the areas under reclamation, contributing to plant biomass accumulation and nutrient cycling. In general, grasses had the most important share of plant biomass production. *Brachiaria plantaginea* was the most common spontaneous plants. This species is widespread in Brazil, especially in crops (Lorenzi 2008), and colonizes coal mining areas under reclamation (Costa 2007). Poaceae family plants have a high C/N ratio, and thus slow decomposition rates, which increases the permanence of the soil cover (Silva et al. 2007; Raiesi and Kabiri 2016).

The presence of such spontaneous species in initial phases of the reclamation process is significant because, over time, they will replace the plants introduced in the area and continue the ecological succession process. The diversity of herbaceous plants with different colonization strategies is essential, as they contribute in different ways to the recovery of ecosystem functions. Legumes promote biological fixation of N, facilitating the establishment of new plant species and families (Palmborg et al. 2005). With fast growth and a higher C/N ratio, Poaceae help stabilize soil cover (Chambers 2000), and Asteraceae are excellent colonizers of mined areas (Martínez-Ruiz and Marrs 2007).

Some of the species present in the area possibly came from the seed bank present in the peat. For example, *L. leptocarpa* and *Heteranthera sp* are predominant in wetlands, very common in areas of flood irrigated rice paddies (Lorenzi 2008). *L. leptocarpa* has been found in floristic surveys in the region where the peat was collected (Ferreira 2017).

Our study demonstrated the importance of inoculating growth-promoting microorganisms in pioneering herbaceous plants used in land reclamation. Microorganisms can warrant plants a series of benefits, such as increased nutrient uptake and stress alleviation. *C. juncea* showed a remarkable ability to colonize the areas under reclamation and allowed the emergence of spontaneous species, which can further contribute to the recovery process.

#### 4.8 CONCLUSION

*Crotalaria juncea* yielded the highest biomass, contributing to nutrient cycling, especially nitrogen.

Inoculation with *Rhizophagus intraradices* or *Azospirillum brasilense* promoted the increase of soil glomalin and enzyme activity.

Inoculation with *Rhizophagus intraradices* or *Azospirillum brasilense* promoted the growth of pioneer herbaceous plants in the environmental recovery of an area degraded by coal mining.

Poaceae species predominate in the initial process of ecological succession in a coal mining area under reclamation in South Brazil.

#### 4.9 REFERENCES

Ahemad M, Khan MS (2013) Pesticides as Antagonists of Rhizobia and the Legume-*Rhizobium* Symbiosis: a Paradigmatic and Mechanistic Outlook. *Biochem Mol Biol* 1:63-75. <https://doi.org/10.12966/bmb.12.02.2013>

Ahirwal J, Maiti SK (2016) Assessment of soil properties of different land uses generated due to surface coal mining activities in tropical Sal (*Shorea robusta*) forest, India. *Catena* 140:155–163. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.01.028>

Alef K, Nannipieri P (1995) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press.

Ali H, Khan E, Sajad MA (2013) Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere* 91:869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>

Antoniadis V, Golia EE, Shaheen SM, Rinklebe J (2017) Bioavailability and health risk assessment of potentially toxic elements in Thriasio Plain, near Athens, Greece. *Environ Geochem Health* 39:319–330. <https://doi.org/10.1007/s10653-016-9882-5>

Antoniadis V, Shaheen SM, Levizou E, Shahid M, Niazi NK, Vithanage M, Ok YS, Bolan N, Rinklebe J (2019) A critical prospective analysis of the potential toxicity of trace element regulation limits in soils worldwide: Are they protective concerning health risk assessment? - A review. *Environ Int* 127:819–847. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.039>

Arora PK (2020) (ed) *Microbial Technology for Health and Environment, Microorganisms for Sustainability*. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2679-4>

Barassi CA, Sueldo RJ, Creus CM, Carrozzi LE, Casanovas WM, Pereyra MA (2008) Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: *Azospirillum* Sp.: Cell Physiology, Plant Interactions and Agronomic Research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología pp 49–59.

Bedini S, Pellegrino E, Avio L, Pellegrini S, Bazzoffi P, Argese E, Giovannetti M (2009) Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol Biochem* 41:1491–1496. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.005>

Berbara RLL, de Souza FA, Fonseca HMA (2006) Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. In: Fernandes MS (ed) Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo pp 53–88.

Bi Y, Zhang Y, Zou H (2018) Plant growth and their root development after inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi in coal mine subsided areas. *Int J Coal Sci Technol* 5:47–53. <https://doi.org/10.1007/s40789-018-0201-x>

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254.

Brasil (2016) 10º Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais. Processo nº.2000.72.04.002543-9. Justiça Federal, 1ª Vara Federal de Criciúma-SC, 218 p.

Chambers JC (2000) Seed movements and seedling fates in disturbed sagebrush steppe ecosystems: Implications for restoration. *Ecological Applications* 10:1400–1413. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[1400:SMASFI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[1400:SMASFI]2.0.CO;2)

Cornejo P, Meier S, Borie G, Rillig MC, Borie F (2008) Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci Total Environ* 406:154–160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.045>

Cornejo P, Pérez-Tienda J, Meier S, Valderas A, Borie F, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2013) Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biol Biochem* 57:925–928. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.031>

Costa S (2007) Estrutura da vegetação herbáceo-arbustiva dos solos construídos em áreas mineradas de carvão a céu aberto e a relação de *Axonopus obtusifolius* (Raddi) chase com Mn e Pb. Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Elsgaard L, Petersen SO, Debosz K (2001) Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 2. Effects on soil microbiology as influenced by sewage sludge and incubation time. *Environ Toxicol Chem* 20:1664–1672. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200807>

EPAGRI (2001) Dados e informações biofísicas da unidade de planejamento regional litoral sul catarinense-UPR 8. Boletim Técnico. Epagri/Ciram.

Feng Y, Wang J, Bai Z, Reading L (2019) Effects of surface coal mining and land

reclamation on soil properties: A review. *Earth-Science Reviews* 191:12–25. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2019.02.015>

Ferreira JPR, Hassemer G, Trevisan R (2017) Aquatic macrophyte flora of coastal lakes in Santa Catarina, southern Brazil. *Iheringia Ser Bot* 72:409:419. <https://doi.org/10.21826/2446-8231201772311>

Ferreira PAA, Ceretta CA, Soriani HH, Tiecher TL, Soares CRFS, Rossato LV, Nicoloso FT, Brunetto G, Paranhos JT, Cornejo P (2015) *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. *Appl. Soil Ecol* 91:37-47. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.02.008>

Ferreira PAA, Ceretta CA, Tiecher T, Facco DB, Garlet LP, Soares CRFS, Soriani HH, Nicoloso FT, Giachini AJ, Brunetto G, Cornejo P (2018) *Rhizophagus clarus* and Phosphorus in *Crotalaria juncea*: Growth, Glomalin Content and Acid Phosphatase Activity in a Copper-Contaminated Soil. *Rev Bras Ciênc Solo* 42. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20170245>

Filip Z (2002) International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agric Ecosyst Environ* 88:169-174. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00254-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00254-7)

Filipini LD, Pilatti FK, Meyer E, Ventura BS, Lourenzi CR, Lovato PE (2021) Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. *Arch Microbiol* 203:1033–1038. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>

Foster JL, Muir JP, Bow JR, Valencia E (2017) Biomass and nitrogen content of fifteen annual warm-season legumes grown in a semi-arid environment. *Biomass Bioenergy* 106:38–42. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.08.016>

Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Brit Mycol Soc* 46:235–244. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0)

Giller KE, Witter E, Mcgrath SP (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol Biochem* 30:1389–1414. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00270-8)

Gillespie AW, Farrell RE, Walley FL, Ross AR, Leinweber P, Eckhardt KU, Regier TZ, Blyth RI. 2011. Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biol Biochem.* 43:766-77. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.12.010>

Gonzalez-Chavez CD, Haen J, Vangronsveld J, Dodd JC (2002) Dodd Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240:287–297. <https://doi.org/10.1023/A:1015794622592>

González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA (2004) The role of

glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ Pollut* 130:317–323. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.004>

Guimarães FV, Klein J, Ferreira MB, Klein DK (2020) Promotion of rice growth and productivity as a result of seed inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Afr J Agric Res* 16:765–776. <https://doi.org/10.5897/AJAR2020.14723>

Hardin G (2013) Non-renewable energy sourcesrgy sources. In: Chiras DD (ed). *Env Sci. Burlington* pp 275–312.

Hope RM (ed) (2013) *Rmisc: Ryan Miscellaneous*. R package version 1.5.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413–425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS (2015) Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool improve yield and sustainability. *Am J Plant Sci* 6:811–817. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.66087>

Hwang SF (1992) Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the Development of *Verticillium* and *Fusarium* Wilts of Alfalfa. *Plant Dis* 76:239. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0239>

Jastrow JD, Miller RM, Lussenhop J (1998) Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. *Soil Biol Biochem* 30:905–916. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00207-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00207-1)

Khan A, Sharif M, Ali A, Shah SNM, Mian IA, Wahid F, Jan B, Adnan M, Nawaz S, Ali N (2014) Potential of AM Fungi in Phytoremediation of Heavy Metals and Effect on Yield of Wheat Crop. *Am J Plant Sci* 5:1578–1586. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.511171>

Koske RE, Gemma JN (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res* 92:486–488. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(89\)80195-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(89)80195-9)

Kumar S, Maiti SK, Chaudhuri S (2015) Soil development in 2-21 years old coalmine reclaimed spoil with trees: A case study from Sonapur-Bazari opencast project, Raniganj Coalfield, India. *Ecol Eng* 84:311–324. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.043>

Leite CR, dos Santos JGD, Silva EL, Alves CRCR, Hungria M, Leite RC, dos Santos AC (2019) Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. *Crop Pasture Sci* 70:61. <https://doi.org/10.1071/CP18105>

Lorenzi H (2008) *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa-SP (Brazil).

Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H (2016) Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J Environ Manage* 174:14-25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>

Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi MK, Lahori AH, Wang Q, Li R, Zhang Z (2016) Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 126:111–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023>

Martínez-Ruiz C, Marrs RH (2007) Some factors affecting successional change on uranium mine wastes: Insights for ecological restoration. *Appl Veg Sci* 10:333–342. <https://doi.org/10.1111/j.1654-109X.2007.tb00432.x>

Maszenan AM, Liu Y, Ng WJ (2011) Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. *Biotechnol Adv* 29:111–123. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.09.004>

Matos AT (2010) *Poluição ambiental: impactos no meio físico*. Editora UFV.

Mcgonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115:495-501. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x>

Meier S, Borie F, Bolan N, Cornejo P (2012) Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Crit Rev Environ Sci* 42:741–775. <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.528518>

Meyer E, Londoño DMM, de Armas RD, Giachini AJ, Rossi MJ, Stoffel SCG, Soares CRFS (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi in the growth and extraction of trace elements by *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) in a substrate containing coal mine wastes. *Int J Phytoremediation* 19:113-120. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207596>

Melo WR, Schneider J, Costa ETS, Soares CRFS, Guilherme LRG, Moreira FMS (2014) Phytoprotective Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Species Against Arsenic Toxicity in Tropical Leguminous Species. *Int J Phytoremediation* 16:840–858. <https://doi.org/10.1080/15226514.2013.856852>

Mishra S, Sharma S, Vasudevan P (2008) Comparative effect of biofertilizers on fodder production and quality in guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.): Effect of biofertilizers on fodder production in *Panicum maximum* Jacq. *J Sci Food Agric* 88:1667–1673. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3267>

Moretti LG, Crusciol CAC, Bossolani JW, Momess L, Garcia A, Kuramae EE, Hungria M (2020) Bacterial Consortium and Microbial Metabolites Increase Grain Quality and Soybean Yield. *J Soil Sci Plant Nutr* 20:1923–1934. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00263-5>

Moura GGD, Armas RD, Meyer E, Giachini AJ, Rossi MJ, Soares CRFS (2016) Rhizobia isolated from coal mining areas in the nodulation and growth of leguminous trees. *Rev*

Bras Ciênc Solo 40. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20150091>

Naoe AML, Peluzio JM, Campos LJM, Naoe LK, Silva RA (2020) Co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars subjected to water deficit. *Rev bras eng agríc ambient* 24:89–94. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v24n2p89-94>

Negalur CB, Lakshman HC (2016) Interaction between AMF (*Glomus geosporum*), *Rhizobium*, *Azospirillum* and their effect on three leguminous plant to improve growth and N, P, K, uptake. *Sci Agric* 6:68–74. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000500012>

Newsham KK, Fitter AH, Watkinson AR (1995) Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *Trends Ecol Evol* 10:407–411. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89157-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89157-0)

Oksanen JA, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MH (2020). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-7.

Palmborg C, Scherer-Lorenzen M, Jumpponen A, Carlsson G, Huss-Danell K, Högborg P (2005) Inorganic soil nitrogen under grassland plant communities of different species composition and diversity. *Oikos* 110:271–282. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13673.x>

Paz C, Öpik M, Bulascoschi L, Bueno CG, Galetti M (2021) Dispersal of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Evidence and Insights for Ecological Studies. *Microb Ecol* 81:283–292. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01582-x>

Pellegrini M, Spera DM, Ercole C, Del-Gallo M (2021) *Allium cepa* L. Inoculation with a Consortium of Plant Growth-Promoting Bacteria: Effects on Plants, Soil, and the Autochthonous Microbial Community. *Microorganisms* 9:639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030639>

Pissinati A, Moreira A, Santoro PH (2018) Yield components and nutrients content in summer cover plants used in crop rotation in no-tillage system. *Comm Soil Sci Plant Anal* 49:1604–1616. <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1474899>

Rabie GH, Aboul-Nasr MB, Al-Humiany A (2005) Increased salinity tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* and a nitrogen-fixer *Azospirillum brasilense*. *Mycobiology*, 33:51-60. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2005.33.1.051>

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing: reference index. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Raiesi K, Kabiri V (2016) Identification of soil quality indicators for assessing the effect of different tillage practices through a soil quality index in a semi-arid environment. *Ecol Indic* 71:198–207. <https://doi.org/10.4489%2FMYCO.2005.33.1.051>

Rajkumar M, Sandhya S, Prasad MNV, Freitas H (2012) Perspectives of plant-associated

microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol Adv* 30:1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.011>

Requena N, Jimenez I, Toro M, Barea JM (1997) Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol*, 136:667-677. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00786.x>

Richard M. Heiberger (2022). HH: Statistical Analysis and Data Display: Heiberger and Holland. R package version 3.1-47. URL <https://CRAN.R-project.org/package=HH>

Rios-Montes K, Pino NJ, Peñuela GA, Mendoza A (2020) Response of Rhizobacterial Community to Biochar Amendment in Coal Mining Soils with *Brachiaria Decumbens* as Pioneer Plant. *Soil and Sediment Contamination: An Int J* 29:26–42. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1669531>

Rocha-Nicoleite E, Campos ML, Citadini-Zanette V, Santos R, Martins R, Soares CRFS (2013) Mata Ciliar: Implicações técnicas sobre a restauração após mineração de carvão. Criciúma: SATC.

Saxena G, Bharagava R (2017) Organic and Inorganic Pollutants in Industrial Wastes: Ecotoxicological Effects, Health Hazards, and Bioremediation Approaches. In: Bharagava R (ed), *Environmental Pollutants and Their Bioremediation Approaches*. CRC Press pp 23–56. <https://doi.org/10.1201/9781315173351-3>

Silva MB, Kliemann HJ, Silveira PM, Lanna AC (2007) Atributos biológicos do solo sob influência da cobertura vegetal e do sistema de manejo. *Pesq agropec bras* 42:1755–1761. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001200013>

Silva LFO, Fdez-Ortiz SV, Martinez-Arkarazo I, Castro K, Oliveira MLS, Sampaio CH, de Brum IAS, de Leão FB, Taffarel SR, Madariaga JM (2013) Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage. *Sci Total Environ* 447:169–178. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.013>

Smith SE, Smith FA (2012) Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. *Mycologia* 104:1-13. <https://doi.org/10.3852/11-229>

Stoffel SCG, Soares CRFS, Meyer E, Lovato PE, Giachini AJ (2020a) Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. *Afr J Agric Res* 16:702–713. <https://doi.org/10.5897/AJAR2020.14766>

Stoffel SCG, Soares CRFS, Meyer E, Lovato PE, Giachini AJ (2020b) Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. *Cienc Rural* 50: e20200109. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200109>

Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ (1995) Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
Upadhyay N, Verma S, Pratap-Singh A, Devi S, Vishwakarma K, Kumar N, Pandey A,



Dubey K, Mishra R, Kumar-Tripathi D, Rani R, Sharma S (2016) Soil ecophysiological and microbiological indices of soil health: a study of coal mining site in sonbhadra, uttar Pradesh. *J Soil Sci Plant Nutr* 16:778-800. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162016005000056>

Vincent Q. Vu (2011). ggbiplot: A ggplot2 based biplot. R package version 0.55. <http://github.com/vqv/ggbiplot>

Widawati S, Suliasih S (2019) Role of Indigenous Nitrogen-fixing Bacteria in Promoting Plant Growth on Post Tin Mining Soil. *Makara J. Sci.* 23:28–38. <https://doi.org/10.7454/mss.v23i1.10801>

Wright SF, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, 198: 97–107. <https://doi.org/10.1023/A:1004347701584>

Yuan M, He H, Xiao L, Zhong T, Liu H, Li S, Deng P, Ye Z, Jing Y (2014) Enhancement of Cd phytoextraction by two *Amaranthus* species with endophytic *Rahnella* sp. JN27. *Chemosphere* 103:99–104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.040>

Zeffa DM, Perini LJ, Silva MB, de Sousa NV, Scapim CA, Oliveira ALM, Amaral-Júnior, AT, Azeredo-Gonçalves LS (2019) *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLoS ONE* 14: e0215332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>

Zhengfu B, Inyang HI, Daniels JL., Otto F., Struthers S (2010) Environmental issues from coal mining and their solutions. *Min Sci Technol (China)* 20:215–223. [https://doi.org/10.1016/S1674-5264\(09\)60187-3](https://doi.org/10.1016/S1674-5264(09)60187-3)

#### 4.10 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Families and species of spontaneous plants with the respective relative dry biomass (RDB) of each species and P and N concentrations, 180 days after sowing of plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (AMF), *Azopirillum brasilense* (AZO), singly or combined (AMF + AZO) or not inoculated (NI), in a coal-mining region undergoing environmental recovery process.

Family	Species	RDB %	P concentration g kg <sup>-1</sup>	N concentration g kg <sup>-1</sup>
	<i>Conyza bonariensis</i>	0.08	4.87 #	21.91 #
	<i>Erechtites hieraciifolius</i>	1.62	3.24 #	24.01 #
Asteraceae	<i>Erechtites sp.</i>	2.33	4.42±0.70	23.84±7.61
	<i>Emilia fosbergii</i>	1.77	4.41±1.34	24.36±7.67
	<i>Bidens pilosa</i>	0.14	4.03 #	27.86 #
Commelinaceae	<i>Commelina diffusa</i>	1.81	4.77±1.7	19.87±3.16
	<i>Cyperus sp1.</i>	1.54	2.47±1.44	19.69±4.93
Cyperaceae	<i>Cyperus sp2.</i>	3.72	2.04±0.58	17.64±2.99
	<i>Cyperus eragrostis</i>	3.88	1.48±0.58	17.8±6.81
Onagraceae	<i>Ludwigia leptocarpa</i>	8.17	2.62±0.79	17.94±4.11
	<i>Scoparia dulcis</i>	0.25	3.10±0.39	17.13±10.11
Plantaginaceae	<i>Micranthemum sp.</i>	0.02	3.21 #	17.91 #
	<i>Brachiaria plantaginea</i>	45.78	2.64±0.41	14.76±2.67
	<i>Paspalum sp.</i>	6.78	2.51±0.66	16.65±4.17
Poaceae	Poaceae sp1	6.69	2.54±0.48	18.63±3.36
	<i>Setaria parviflora</i>	2.03	3.35±0.56	13.51±5.94
	<i>Cynodon dactylon</i>	11.45	1.85±0.27	17.45±0.37
	<i>Andropogon sp.</i>	1.01	1.48 #	10.19 #
Pontederiaceae	<i>Heteranthera sp.</i>	0.03	5.75 #	16.66 #
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>	0.91	2.73±0.03	20.34±6.19
-	-	100 %	2.88±1.11	18.33±5.23

# Species found in two or fewer plots; confidence interval (CI) could not be calculated.

**5 -CAPÍTULO 2 - *Bradyrhizobium*, *Azospirillum brasilense* E FUNGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PROMOVEM O CRESCIMENTO  
VEGETAL DE *Crotalaria juncea* EM SOLO DE ÁREA DE  
MINERAÇÃO DE CARVÃO**

RESUMO

Áreas com passivos ambientais trazem uma série de preocupações, principalmente áreas degradadas pela mineração de carvão, e devem ser recuperadas. Dentre as técnicas mais aceitas está a construção do perfil do solo seguido da revegetação com espécies pioneiras associadas a microrganismos. O uso de inoculantes microbiológicos nessas áreas muitas vezes não é praticado devido à falta de conhecimento e da aplicabilidade dessas técnicas. Desta forma, este estudo avaliou os efeitos da interação entre *Bradyrhizobium* sp. - BR 2001, *Azospirillum brasilense* - Abv5 e fungos micorrízicos arbusculares (Rootella BR<sup>TM</sup> - *Rhizophagus intraradices* e UFSC-14 - *R. clarus* (autóctone da área de mineração) na promoção de crescimento de *Crotalaria juncea* para revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão no Brasil. O experimento foi realizado em casa de vegetação com *Crotalaria juncea* submetida a inoculação e coinoculação dos três grupos de microrganismos em um delineamento trifatorial completo. Aos 90 dias após a semeadura, o experimento foi coletado para determinação da massa seca da parte aérea e raízes das plantas, teor e acúmulo de N, P, K, Ca e Mg. Também foram coletadas amostras de solo para determinar a atividade enzimática (Hidrólise de diacetato de fluoresceína – DAF e fosfatase ácida), teor de glomalina e disponibilidade de nutrientes (P, K, Ca e Mg) do solo. Os dados foram submetidos à análise de normalidade e homogeneidade de variâncias e posteriormente a anova trifatorial seguido de separação de médias por Skott-knott a 5% de probabilidade de erro. Todos os microrganismos promoveram incrementos de massa seca da parte aérea (MSPA) e raiz e acúmulo de nutrientes na MSPA da *C. juncea*, quando em coinoculação. Esse aumento da produção de biomassa e acúmulo de nutrientes é devido ao aumento da atividade enzimática da DAF e fosfatase ácida no solo, que promoveu uma maior disponibilização de nutrientes para as plantas. O teor de Glomalina foi influenciado somente pela inoculação dos FMA, sem diferenças entre eles. Ficou evidente nesse trabalho, que, conforme aumenta a complexidade do sistema com a adição de microrganismos com funções complementares, melhor é o desempenho na

promoção de crescimento vegetal. Os dois FMA, tanto o *R. intraradices* quanto o *R. clarus* promoveram incrementos no crescimento das plantas. No entanto, o *R. clarus* (autóctone da área) apresentou desempenho superior para a maioria dos parâmetros analisados. Em resumo, ficaram comprovados os benefícios da inoculação com produtos comerciais e com microrganismos obtidos na área em recuperação para promoção de crescimento vegetal de *C. juncea*, espécie pioneira para uso em processos de recuperação ambiental.

**Palavras-chave:** coinoculação, micorrizas, bactéria promotora de crescimento de plantas, aporte nutricional.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos na agricultura cresce constantemente e estão comprovados os benefícios que trazem para o desenvolvimento das culturas. Esses organismos agem na promoção do crescimento vegetal, no controle biológico de pragas e doenças e na amenização de estresses bióticos e abióticos (Moura et al. 2016; Hakim et al. 2021; Stoffel et al. 2020a; Filipini et al. 2021), e sua aplicação se estende a processos de recuperação de áreas degradadas. No Brasil, foram comercializadas mais de 80 milhões de doses de inoculante na safra 2019/2020, com cerca de 87,5% destes destinados à cultura da soja (*Glycine max*) e 12 % às gramíneas de maneira geral, com ganhos de produtividade acima de 10% (GlobalFert, 2021). No entanto, para recuperação de áreas degradadas, inoculantes ainda não são usados, havendo poucos estudos nessa área.

No Brasil, a mineração de carvão ocasionou a degradação de aproximadamente 5,7 mil hectares na região Sul (Brasil 2016), e para a recuperação destas áreas é necessária a reconstrução do perfil do solo. Esse processo envolve a adição de uma camada de solo de área de empréstimo, correção do pH e adição de nutrientes, além do estabelecimento de espécies herbáceas pioneiras associadas a microrganismos promotores do crescimento, para acelerar os processos de recuperação ambiental (Rocha-Nicoleite et al. 2013). O conjunto de tais técnicas promove melhorias nos atributos químicos, físicos e biológicos do solo, permitindo o crescimento das plantas e o estabelecimento da fauna do solo (Upadhyay et al. 2016; Feng et al. 2019).

Dentre as espécies vegetais utilizadas nos processos de recuperação ambiental, a *Crotalaria juncea* possui alto potencial (Pereira et al., 2002). Ela é utilizada como adubo verde, podendo melhorar as propriedades do solo através da deposição de material orgânico, além de atuar como um sequestrador natural de carbono no solo. A fixação biológica de nitrogênio realizada por bactérias associadas a *Crotalaria juncea* pode aumentar o teor de nitrogênio do solo das áreas de mineração em processo de recuperação, favorecendo a atividade de toda a comunidade biológica (Das et al., 2020). Além disso, a espécie é capaz de se associar a diversas espécies de microrganismos, incluindo *Bradyrhizobium* (Maheshwari et al., 2021), *Azospirillum* (Devi et al., 2013) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Ferreira et al., 2018), dentre outros (Devi et al., 2013).

Diversos grupos de microrganismos podem promover o crescimento das plantas, mas alguns grupos se destacam promovendo o crescimento em áreas degradadas, tais como as

bactérias promotoras do crescimento das plantas (BPCP) (Abhilash et al., 2016) e os fungos micorrízicos arbusculares (Berbara et al., 2006).

As BPCP se dividem em dois grupos principais, as nodulíferas e as não nodulíferas. As bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) nodulíferas se associam com espécies de leguminosas e realizam a fixação do nitrogênio atmosférico, transformando o N<sub>2</sub> em formas absorvíveis pelas plantas (Ahemad e Kibret, 2014; Bruijn, 2015). Esse processo ocorre dentro de nódulos formados durante o processo de associação planta-bactéria e a fixação do N é mediada pela enzima nitrogenase, presente nas BFN (Lindström e Mousavi, 2020). Ademais, esse processo pode suprir toda ou grande parte da demanda de N da planta (Luca e Hungria, 2014; Santos et al., 2019).

O outro grupo de BPCP é o das bactérias associativas não nodulíferas, que habitam raízes, caules, colmos e folhas, incluindo representantes dos gêneros *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum* (Moreira et al., 2013; Bruijn, 2015). Este grupo de BPCP também possui a capacidade de fixar N, além de atuar na mobilização de diversos nutrientes, produzir uma série de fitohormônios e compostos capazes de atuar em promoção de crescimento das plantas, controle de pragas e doenças e mitigação de estresses ambientais (Goswami et al., 2016; Sahoo et al., 2014; Saraf et al., 2014). Além disso, essas bactérias atuam na indução de resistência sistêmica das plantas e contra estresses bióticos e abióticos (Khan et al., 2020; Hakim et al, 2021; Pellegrini et al. 2021).

As BPCP podem promover um melhor estabelecimento das plantas em ambientes contaminados por metais tóxicos, como por exemplo nas regiões de mineração de carvão (Rajkumar et al. 2012; Ma et al., 2016). Algumas rizobactérias podem facilitar a produção de sideróforos, aumentando a disponibilidade e absorção de ferro (Bhat et al., 2019). *Azospirillum brasilense* é uma das espécies de BPCP mais estudadas e utilizadas na agricultura pela sua capacidade de se associar a diversas espécies de plantas. Inoculantes a base de *Azospirillum* são amplamente comercializados na América do Sul, com um aumento médio de 10% no rendimento das culturas agrícolas (Cassán e Diaz-Zorita, 2016).

Além das BPCP, os FMA também se associam às raízes das plantas formando uma rede de micélio intra (MIR) e extrarradicular (MER), que atua como uma extensão do sistema radicular, e desta forma conseguem aumentar a superfície e o volume de solo explorado (Berbara et al. 2006). Esta associação promove uma maior absorção de água e nutrientes, especialmente P, protege as plantas hospedeiras contra a toxicidade de metais pesados (Meier et al. 2012; Meyer et al. 2017; Betancur-Agudelo et al., 2020) e de

patógenos (Hwang et al. 1992; Newsham et al. 1995). A extensa rede de MER dos FMA também contribui para a estabilidade dos agregados do solo devido ao crescimento e atividade das hifas, exercendo uma ação física sobre as partículas do solo, e pela produção e deposição no solo de glicoproteínas chamadas glomalinas (Jastrow et al. 1998; Berbara et al. 2006; Bedini et al. 2009). A combinação destes benefícios normalmente promove, em ambientes agrícolas, aumentos de rendimento, biomassa seca, número e biomassa de nódulos em leguminosas (Haro et al., 2017). Em ambientes degradados, onde a presença e atividade de microrganismos adaptados mostram-se essenciais ao processo de revegetação, os resultados costumam ser ainda mais expressivos.

Os microrganismos convivem e interagem na rizosfera e nas raízes das plantas, e assim a inoculação pode ser realizada isoladamente ou em combinações pré-definidas, chamadas de coinoculação. A coinoculação com bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio e *A. brasilense* em leguminosas, tais como soja (Hungria et al. 2015; Moretti et al. 2020) e feijão (Filipini et al. 2021) é comprovadamente benéfica, promovendo incrementos de produtividade superiores a 8%, em comparação com áreas inoculadas somente com *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* (Hungria et al., 2013).

Para áreas degradadas, a co-inoculação de FMA e PGPB mostra-se uma opção promissora, pois os microrganismos podem apresentar resultados sinérgicos tanto entre eles quanto para a planta. O fornecimento de nutrientes essenciais pelos FMA às plantas, suprimindo necessidades nutricionais importantes podem favorecer a simbiose com as BPCP, principalmente *Rhizobium* (Xie et al., 2020). A coinoculação combinada de FMA e *Rhizobium* em leguminosas como ervilha (Xavier e Germida, 2003), alfafa (Ashrafi et al., 2014), e trevo branco (Xie et al., 2020), tem promovido maior crescimento das plantas que a inoculação somente com *Rhizobium*. A coinoculação de FMA é capaz de aumentar o número de nódulos, auxiliando no processo de fixação de N (Haro et al., 2017; Xie et al., 2020).

No Brasil, diversos estudos têm avaliado a eficiência de isolados de microrganismos autóctones para uso em processo de recuperação ambiental. O fungo *R. clarus* (UFSC-14), isolado de áreas degradadas pela mineração de carvão, promoveu o crescimento e amenização de estresse por elementos traços em diferentes espécies de plantas pioneiras (Meyer et al., 2017; Stoffel et al., 2016). No entanto, não foram encontrados registros de trabalhos com o inoculante comercial a base de *A. brasilense* e *R. intraradices* em

condições similares no Brasil, sendo este trabalho pioneiro na utilização de inoculantes comerciais em solos degradados de áreas de mineração de carvão no Brasil.

Este estudo visa avaliar a interação de um isolado de FMA autóctone (UFSC-14 - *R. clarus*) e de um inoculante contendo *R. intraradices* (não autóctone) juntamente com BPCP (*Bradyrhizobium* e *A. brasilense*) sobre a atividade biológica do solo, disponibilização e absorção de nutrientes e promoção de crescimento vegetal em *Crotalaria juncea* usada na revegetação de áreas degradadas por mineração de carvão.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Descrição Geral

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em Florianópolis, no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC. O solo utilizado é oriundo de um horizonte B utilizado no processo de recuperação de uma área degradada pela mineração de carvão em Treviso-SC (28° 31 '51,07"S 49° 27' 50,05"O).

O solo recebeu 14,5 g dm<sup>-3</sup> (equivalente a 29 Mg ha<sup>-1</sup>) de calcário (PRNT 100%), 18,2 g dm<sup>-3</sup> (equivalente a 52 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) de cama de aves, e 75,0 g dm<sup>-3</sup> (equivalente a 150 Mg ha<sup>-1</sup>) de turfa (Turfa Fértil Agro S/A, Brasil, 29°1'22.41 "S 49°29'56.06 "O). Os atributos físico-químicos resultantes foram: argila 200 g dm<sup>3</sup>; matéria orgânica (MO) 9 g dm<sup>-3</sup>; pH em água 5,0; 11,1 mg P kg<sup>-1</sup> (Mehlich I); 158,6 mg K kg<sup>-1</sup>; 8,3 cmol<sub>c</sub> Ca dm<sup>-3</sup>; 8,4 cmol<sub>c</sub> Mg dm<sup>-3</sup>; 20,1 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> capacidade de troca catiônica (CTC); 85% saturação de base (V%).

A *Crotalaria juncea* foi submetida a inoculação e coinoculação de três grupos de microrganismos. O experimento foi disposto em um delineamento trifatorial, sendo os fatores: inoculação com *Bradyrhizobium* sp. - BR 2001 (com e sem inoculação), inoculação com *Azospirillum brasilense* - Abv5 (com e sem inoculação) e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (sem inoculação e inoculação com *Rhizophagus intraradices* - Rootella BR ou *Rhizophagus clarus* - UFSC 14). O experimento foi um trifatorial completo (2x2x3) com nove repetições, disposto em delineamento inteiramente casualizado, totalizando 108 unidades experimentais.

Foram semeadas cinco sementes por vaso de 2,5 L e após a germinação foi efetuado o desbaste para três plantas por vaso. Os inoculantes utilizados tiveram suas dosagens previamente calculadas pensando na recomendação de 600.000 plantas ha<sup>-1</sup> (30 kg



sementes  $\text{ha}^{-1}$ ) de *Crotalaria juncea*, corrigindo-se para o número total de plantas por tratamento. Deste modo, foram aplicadas doses equivalentes a  $200\text{ml ha}^{-1}$  de *Bradyrhizobium* sp. - BR 2001 ( $1 \times 10^9 \text{ UFC ml}^{-1}$ ),  $200\text{ml ha}^{-1}$  de *Azospirillum brasilense* (Abv5) ( $2 \times 10^8 \text{ UFC ml}^{-1}$ ),  $120 \text{ g ha}^{-1}$  (13 propágulos  $\text{vaso}^{-1}$ ) de *Rhizophagus intraradices* - Rootella BR<sup>TM</sup> ( $2,08 \times 10^4$  propágulos  $\text{g}^{-1}$ ) e  $0,27 \text{ g vaso}^{-1}$  (13 propágulos  $\text{vaso}^{-1}$ ) de *Rhizophagus clarus* ( $4,7 \times 10^1$  propágulos  $\text{g}^{-1}$ ) (Novais et al., 2017). Para garantir similaridade físico-química entre os tratamentos, uma porção de solo inóculo do *R. clarus* (previamente multiplicado com *Brachiaria decumbens*) foi autoclavado a  $121^\circ\text{C}$  por 60 min e posteriormente adicionou-se  $0,27 \text{ g vaso}^{-1}$  nos tratamentos que não receberam o inóculo de *R. clarus*.

A semeadura foi realizada em 18/04/21 e a coleta no dia 16/07/21, totalizando 90 dias de condução do experimento. Durante a condução do experimento, foi adicionado água periodicamente, não havendo aporte nutricional além do informado anteriormente.

### 5.2.2 Análise de tecido vegetal

Após a coleta, a biomassa da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) foram separadas, secas ( $60^\circ\text{C}$ ) até peso constante e pesadas. A matéria seca da parte aérea (MSPA) foi moída e submetida à digestão sulfúrica para posterior análise de macronutrientes (N e P). O teor de P foi determinado por colorimetria (Meneghetti, 2018) e o teor de N pelo método micro-Kjeldahl, conforme descrito em Tedesco et al (1995). O teor de K foi determinado em fotômetro de chama e os teores de Ca e Mg em espectrofotômetro de absorção atômica. Foram calculados o N, P, K, Ca e Mg acumulados na MSPA da planta, multiplicando-se o teor de nutrientes pela massa seca produzida.

### 5.2.3 Análise de P, K, Ca e Mg disponível no solo

Os métodos para as análises químicas das amostras de solo foram os descritos em Tedesco (1995). Uma extração em solução de Mehlich I foi realizada para posterior determinação de fósforo por colorimetria (Meneghetti, 2018) e potássio por fotometria de chama. Cálcio e Magnésio trocáveis foram extraídos em solução KCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e determinados em espectrofotômetro de absorção atômica.

#### 5.2.4 Teor de Glomalina no solo

O teor de glomalina facilmente extraível e total do solo foi determinado conforme Wright e Upadhyaya (1998) com extração em citrato de sódio em autoclave e determinado pelo método de Bradford (1976).

#### 5.2.5 Análise de Diacetato de Fluoresceína (DAF) e Fosfatase ácida

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) foi determinada utilizando-se 1,0 g de solo incubado a 25 °C em agitação, durante duas horas, com 0,1 mL de solução de diacetato de fluoresceína 4,8 mmol<sup>-1</sup> e 19,9 mL de solução tampão de fosfato de sódio 60 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,6; em seguida a reação foi interrompida pela adição de 20ml de acetona e posteriormente centrifugada a 4.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado e a absorvância do extrato medida a 490 nm (Alef e Nannipieri, 1995).

Para avaliação da atividade da fosfatase ácida, 1,0 g de solo foi misturado com p-nitrofenil fosfato em solução tampão universal modificada (MUB pH 6,5) e incubado a 37 °C durante uma hora, e a hidrólise inibida mediante adição de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0,5 mol L<sup>-1</sup> e NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, o extrato foi filtrado e a absorvância quantificada em espectrofotômetro a 410 nm (Alef e Nannipieri, 1995).

#### 5.2.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R (R Core Team 2020). Todos os dados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett e ao teste de normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk) para posterior análise de variância (ANOVA) trifatorial. Os dados de MSR foram transformados com  $(X+0,5)^{0,5}$  para atender aos pressupostos da ANOVA. Quando os efeitos foram significativos, as médias foram separadas por Skott-Knott a 5% de probabilidade de erro. Tanto a ANOVA quanto o desdobramento foram executados utilizando a função “fat3.dic” do pacote “ExpDes” (Ferreira et al., 2021). Os gráficos foram gerados com as respectivas médias e erros padrões utilizando o pacote “metan” (Olivoto e Lúcio, 2020). Foi realizada uma análise de correlação de Pearson utilizando o pacote “corrplot” e os valores classificados de acordo com Mukaka (2012) como negligenciável (0 a 0,30), fraco (0,30 a 0,50), moderado (0,50 a 0,70), alto (0,7 a 0,90) e muito alto (>0,9).

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Biomassa Vegetal

Todos os microrganismos quando coinoculados promoveram incrementos significativos na parte aérea e nas raízes de *Crotalaria juncea*. Houve interação significativa entre os três grupos de microrganismos para o incremento de biomassa vegetal (Tabela S1). Quando inoculados individualmente, os microrganismos promoveram incrementos de MSPA (em comparação ao tratamento não inoculado) na ordem de 35% para *A. brasilense* e de 56% para *R. clarus*, enquanto a inoculação de *Bradyrhizobium* e *R. intraradices* não promoveu incrementos quando inoculados individualmente (Figura 1a). Para a MSR, houve incrementos de 147 % com a inoculação dos FMA (*R. intraradices* ou *R. clarus*) e de 56 % com *A. brasilense*, sem incrementos significativos com a inoculação de *Bradyrhizobium* de forma individual. Na MST, *A. brasilense*, *R. intraradices* e *R. clarus* estiveram ligados a incrementos de 38, 36 e 69%, respectivamente. A inoculação de *Bradyrhizobium* também não promoveu incrementos na MST, e *R. clarus* promoveu incrementos 25% superiores à inoculação de *R. intraradices*, quando aplicados de forma individual. No entanto, a inoculação de *Bradyrhizobium* promoveu incrementos na MSPA, MSR e MST em todos os tratamentos com qualquer uma das outras combinações de inoculação.

Em conjunto com a inoculação de *A. brasilense*, a adição dos FMA promoveu incrementos médios de 44% na MSPA, 95% para MSR (*R. intraradices* com 68% e *R. clarus* com 121%) e 52% para MST. A inoculação de FMA juntamente com *Bradyrhizobium* promoveu incrementos, comparativamente ao tratamento inoculado somente com *Bradyrhizobium*, na ordem de 64% para MSPA, 194% para MSR e 182% para MST. A tripla inoculação com *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* e *R. clarus* apresentou o melhor desempenho, com incrementos na ordem de 182% para MSPA, 389% para MSR e 210% para MST em comparação com o tratamento não inoculado. O tratamento com a tripla inoculação contendo *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* e *R. intraradices*, não diferiu do tratamento inoculado somente com as duas BPCP (*Bradyrhizobium* e *A. brasilense*), mas em contrapartida, a tripla inoculação contendo *R. clarus* promoveu incrementos de 18% para MSPA, 26% para MSR e 19% para MST.

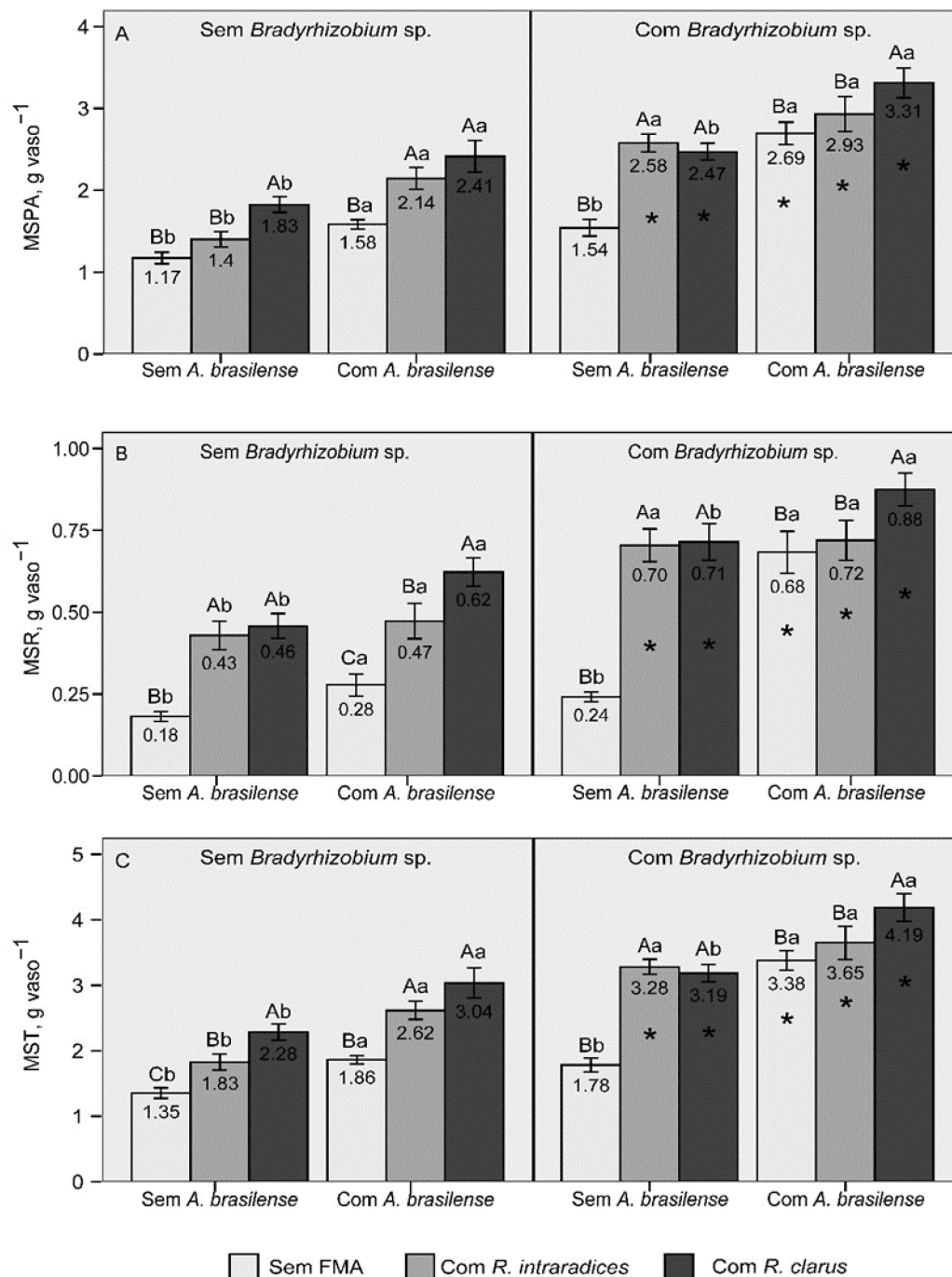


Figura 1. Matéria seca da parte aérea (MSPA) (A), matéria seca da raiz (MSR) (B) e matéria seca total (MST) (C) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp.

### 5.3.2 Teor e Acúmulo de N, P, K, Ca e Mg na biomassa seca da parte aérea

A inoculação promoveu aumento no acúmulo de N, P, K, Ca e Mg pelas plantas, sem que houvesse aumento na concentração desses elementos no tecido vegetal (**Tabela S2 e Tabela S3**). Aumentos no acúmulo de N ocorreram com a inoculação individual dos microrganismos e com a tripla inoculação. A inoculação de *Bradyrhizobium*, *A. brasilense*, *R. intraradices* e *R. clarus* de forma isolada promoveram, respectivamente, incrementos de 37, 43, 29 e 59% no N acumulado na MSPA, comparativamente ao controle não inoculado (**Figura 2a**). A coinoculação de FMA juntamente com *A. brasilense* promoveu aumentos de 37%, em comparação com o tratamento inoculado somente com *A. brasilense*, enquanto a coinoculação de FMA com *Bradyrhizobium* promoveu incrementos de 59% comparativamente ao tratamento inoculado somente com *Bradyrhizobium*. A coinoculação de *Bradyrhizobium* e *A. brasilense* promoveu incrementos de 69% comparativamente ao tratamento somente com *Bradyrhizobium*. A tripla inoculação com *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* e FMA promoveu incrementos significativos comparativamente aos tratamentos com a inoculação de somente dois microrganismos. A tripla inoculação contendo *R. clarus* apresentou desempenho 9,5% superior à inoculação com *R. intraradices*.

Os três grupos de microrganismos promoveram incrementos no acúmulo de P na MSPA (**Tabela S2**), com incrementos de 26 a 67% para a inoculação individual dos microrganismos, com destaque para *R. clarus* (**Figura 2b**). A inoculação com a combinação de dois microrganismos promoveu incrementos de 89 a 120%. A tripla inoculação de *A. brasilense*, *Bradyrhizobium* e *R. clarus* promoveu os maiores acúmulos de P no tecido vegetal, 33 % superior ao tratamento somente com *A. brasilense*, *Bradyrhizobium* e 183 % superior ao tratamento sem nenhuma inoculação.

Foram verificados aumentos no acúmulo de K na MSPA nos tratamentos com inoculação. Com a inoculação isolada, somente *R. clarus* promoveu aumentos no acúmulo de K (**Figura 3a**). A inoculação de dois microrganismos juntos promoveu aumentos da disponibilidade de K na ordem de 90 a 135%. Na inoculação tripla, somente a combinação *Bradyrhizobium* + *A. brasilense* + *R. clarus* foi superior às inoculações duplas, 161% superior ao controle não inoculado. A combinação contendo *R. intraradices* apresentou a mesma eficiência das duplas inoculações.

Para o Ca, dentre as inoculações simples, somente *Bradyrhizobium*, *A. brasilense* e *R. clarus* promoveram incrementos no acúmulo do elemento na MSPA, na ordem de 34, 31 e 45%, respectivamente (**Figura 3b**). A inoculação de *Bradyrhizobium* promoveu incrementos no acúmulo de Ca em todas as combinações testadas. As inoculações duplas promoveram incrementos de 75 a 115%, comparativamente ao controle. Das triplas inoculações, somente aquela contendo *R. clarus* foi estatisticamente superior (159%) às duplas.

O acúmulo de Mg na MSPA não foi afetado pela interação entre os microrganismos, havendo somente efeitos simples. Foram constatados aumentos no acúmulo de Mg na ordem de 43% para *Bradyrhizobium*, 34% para *A. brasilense* e 31% para os FMA (*R. clarus* e *R. intraradices*) (**Figura 3c**).

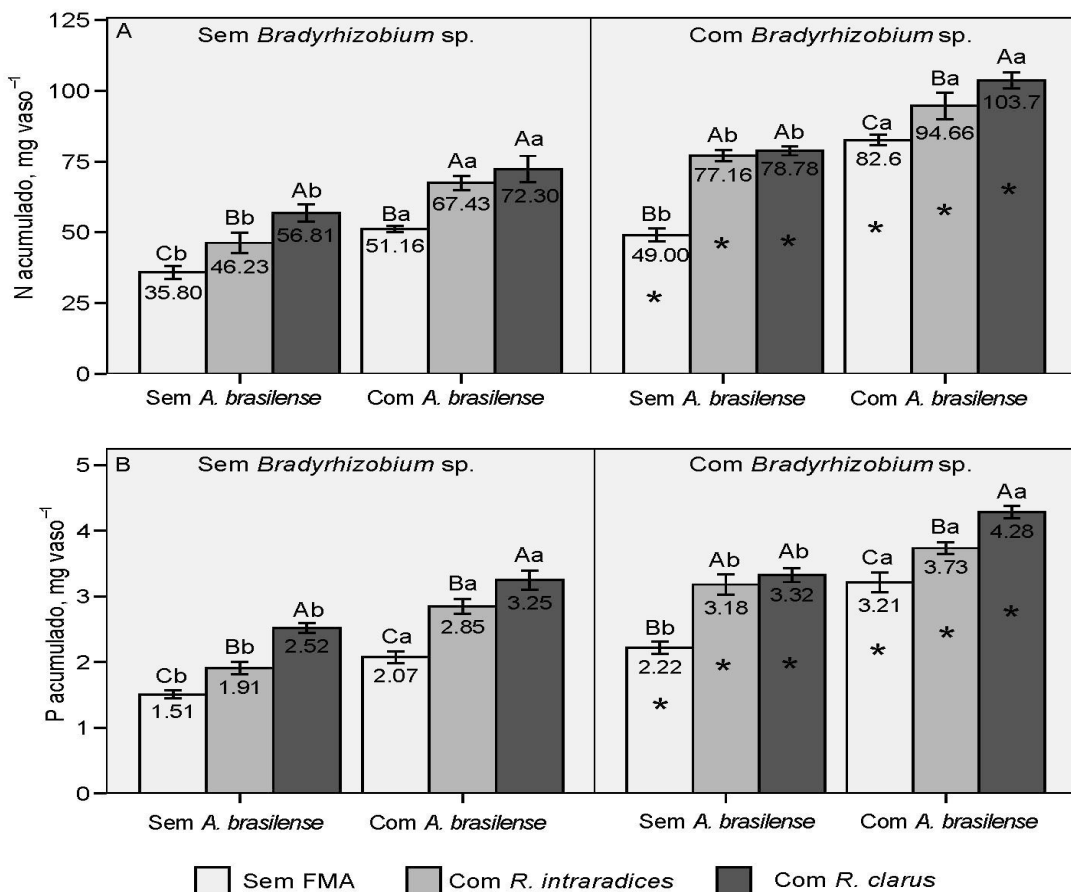


Figura 2. Nitrogênio (A) e fósforo (B) acumulados na matéria seca da parte aérea (MSPA) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp.

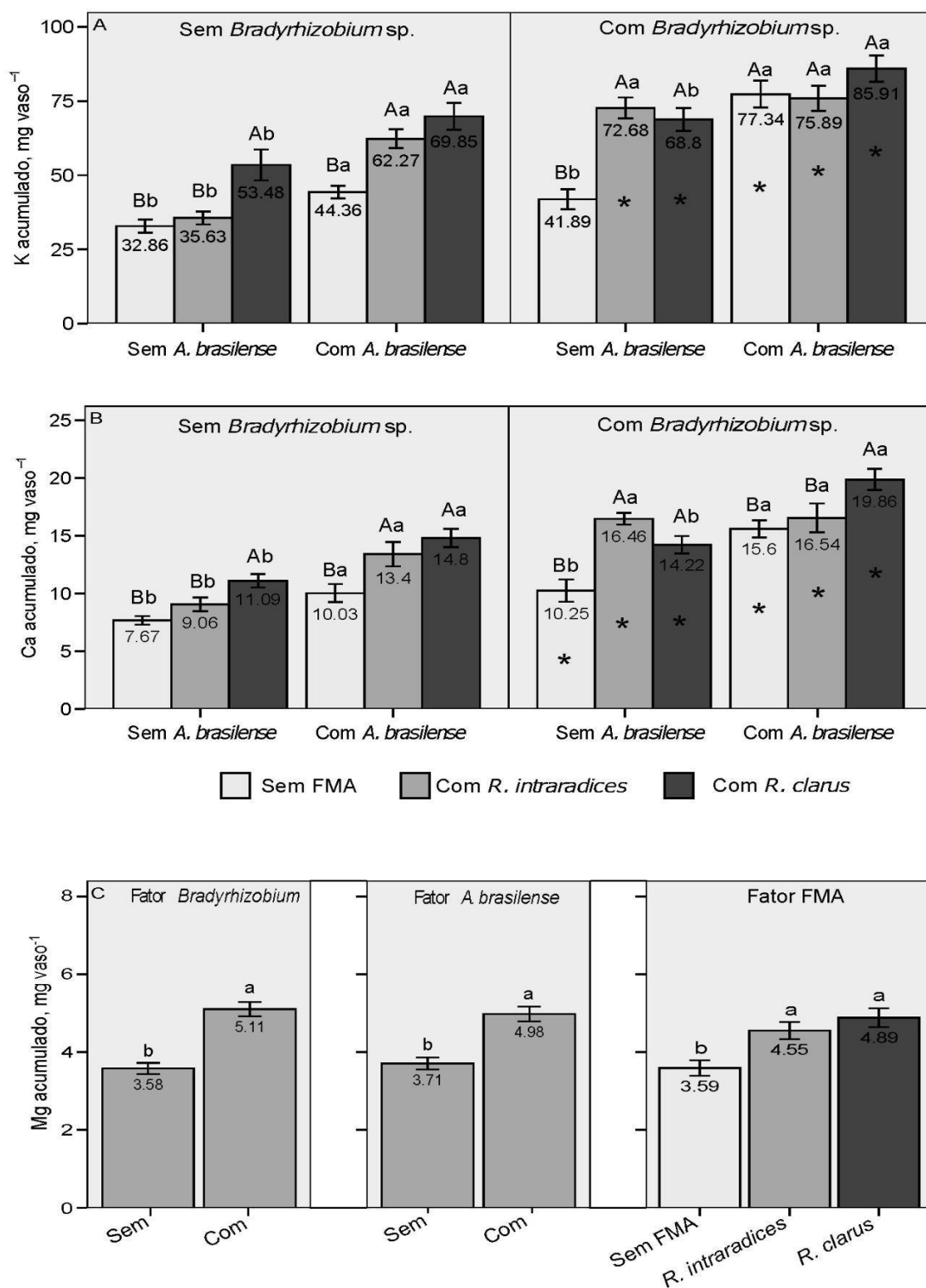


Figura 3. Potássio (A), Cálcio (B) e Magnésio (C) acumulados na matéria seca da parte aérea (MSPA) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp.

### 5.3.3 Hidrólise de diacetato de fluoresceína (DAF) e atividade da fosfatase ácida

Todos os microrganismos, quando coinoculados, promoveram aumentos da atividade enzimática do solo, avaliada pela análise de hidrólise de diacetato de fluoresceína (DAF) e da fosfatase ácida (**Tabela S4**). Quando inoculados isoladamente, somente *R. clarus* promoveu aumentos na DAF (19 %) e na fosfatase ácida (34%) do solo, comparativamente ao controle (**Figura 4a**).

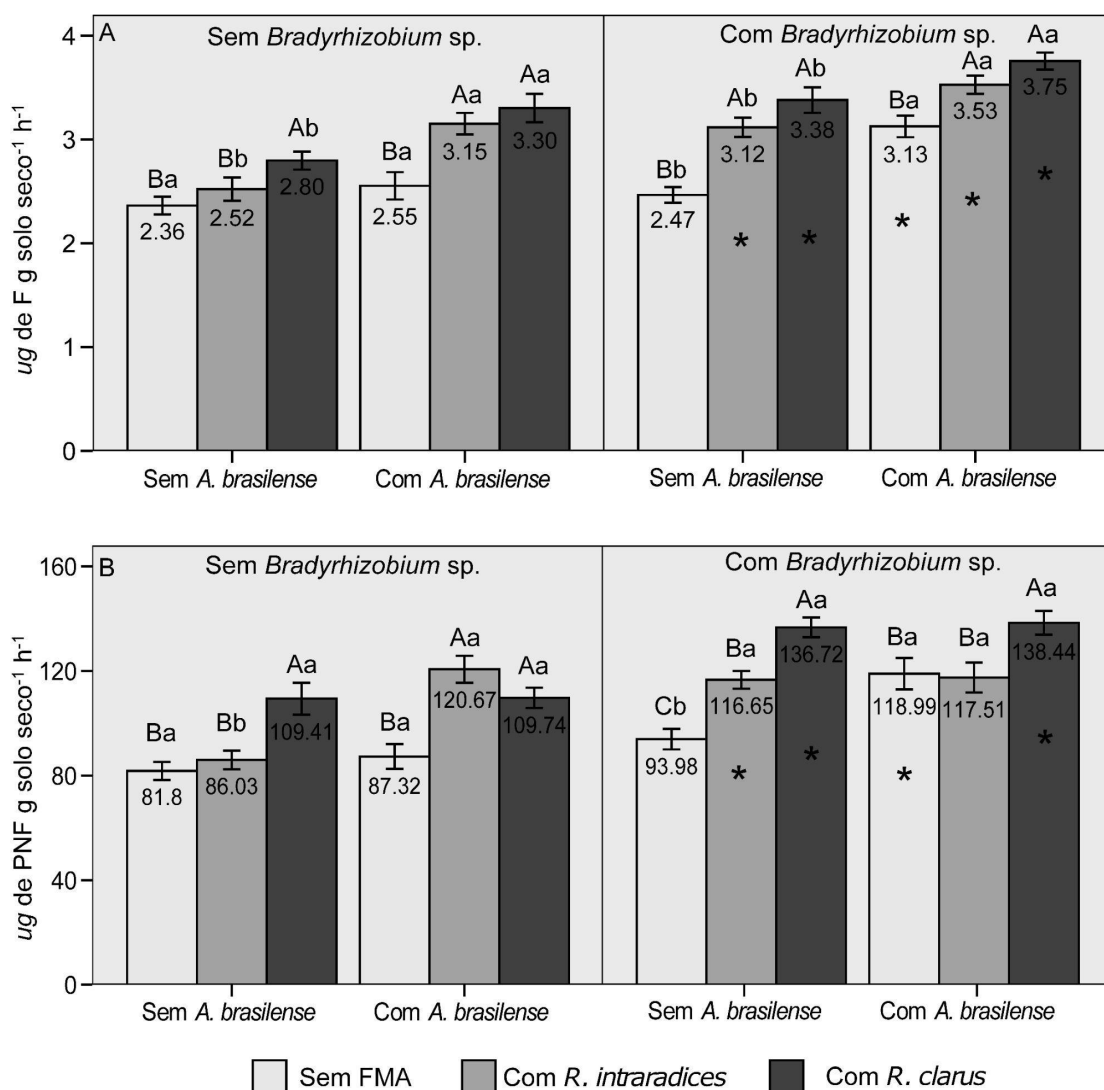


Figura 4. Atividade enzimática avaliada pela análise de diacetato de Fluoresceína (DAF) (A) e Fosfatase ácida (B) de solo cultivado com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp. F = Fluoresceína.



Para a DAF, a inoculação com a combinação de dois microrganismos promoveu incrementos de 32 a 43%, comparativamente ao controle (**Figura 4a**). A tripla inoculação, independente da espécie de FMA, promoveu incrementos na atividade da DAF do solo em 16% comparativamente ao tratamento coinoculado com *Bradyrhizobium* + *A. brasilense* e 54% ao controle.

A inoculação da *C. juncea* com *R. clarus*, de forma isolada ou combinada, promoveu aumento significativo da atividade da fosfatase ácida no solo em todas as combinações testadas (**Figura 4b**). Quando o *R. clarus* foi co-inoculado com *Bradyrhizobium* sp. ou com *Bradyrhizobium* sp. + *A. brasilense*, houve incremento de 67% e 69%, respectivamente, em comparação ao controle. A coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. ou *A. brasilense* com FMA promoveu aumentos significativos, com destaque para interação *Bradyrhizobium* sp. e FMA. O aumento na atividade da fosfatase ácida foi de 24% a 35% na inoculação dupla, comparativamente ao controle não inoculado (**Figura 4b**). A tripla inoculação não diferiu dos tratamentos contendo a combinação *Bradyrhizobium* e FMA.

#### 5.3.4 Teores de glomalina do solo

Somente a fração facilmente extraível (GFE) da glomalina foi afetada pelos tratamentos. Entre os fatores, somente a inoculação de FMA alterou os teores de GFE no solo, não verificando efeitos das bactérias, nem das interações entre os microrganismos. A inoculação com *R. intraradices* ou *R. clarus*, promoveu incrementos de 6,5% na GFE no solo (**Tabela S5 e Figura 5**).

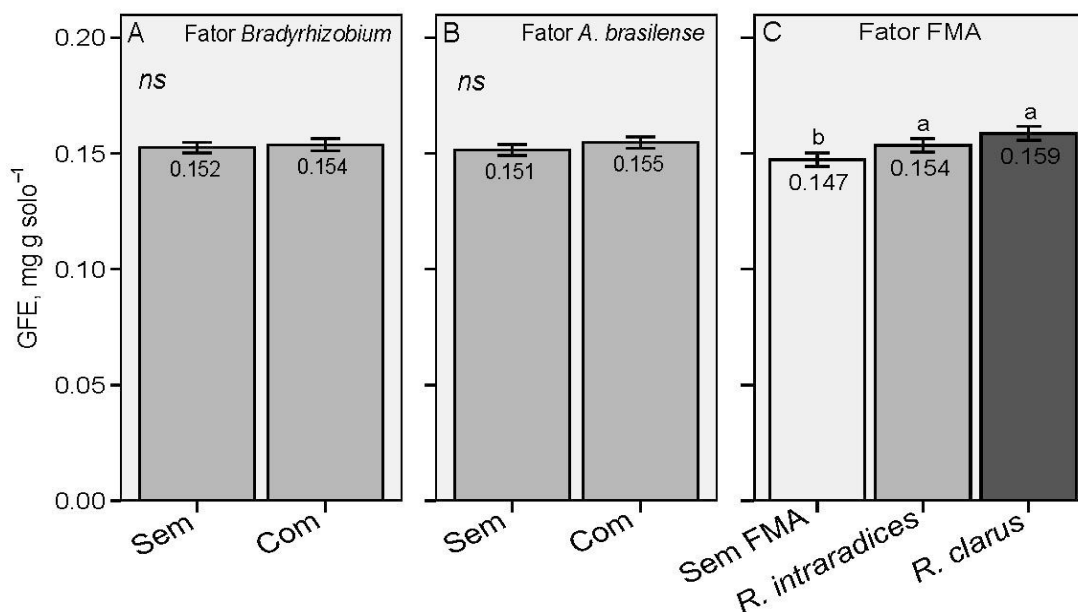


Figura 5. Análise dos fatores simples *Bradyrhizobium* (A), *A. brasilense* (B) e FMA (C) para glomalina facilmente extraível (GFE) de solo cultivado com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* entre grupos e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp. F = Fluoresceína.

### 5.3.5 Disponibilidade de nutrientes no solo

A disponibilidade de K, Ca e Mg foi afetada pelos tratamentos aplicados, enquanto a disponibilidade de P (Melich I ou Resina) ao final do experimento não foi influenciada por nenhum dos tratamentos aplicados (**Tabela S6**). A disponibilidade do K foi influenciada por todos os fatores simples e pela interação *Bradyrhizobium* vs FMA e *A. brasilense* vs FMA. A disponibilidade de Mg foi influenciada pelos fatores *Bradyrhizobium* e FMA de forma isolada, assim como a interação entre eles. Sobre o Ca houve efeito da interação tripla sobre a disponibilidade no solo.

Para o K, somente houve aumento da disponibilidade nos tratamentos com FMA quando associado com *A. brasilense* (39% de aumento) ou *Bradyrhizobium* (46% de aumento), comparativamente aos tratamentos com a inoculação somente das bactérias (**Figura 6a**).

Para Ca, todos os microrganismos inoculados isoladamente promoveram aumentos da disponibilidade (11 a 16%). A coinoculação de *A. brasilense* juntamente com FMA não promoveu incrementos comparativamente à inoculação isolada de *A. brasilense* ou FMA. A tripla inoculação promoveu aumentos significativos (20%), tanto para *R. clarus* quanto *R. intraradices*, na disponibilidade em comparação ao controle não inoculado (**Figura 6b**).

O Mg teve maior disponibilização somente nos tratamentos com a coinoculação de *Bradyrhizobium* e FMA. Os aumentos na disponibilidade foram de 12% comparativamente ao tratamento somente com *Bradyrhizobium* (**Figura 6c**).

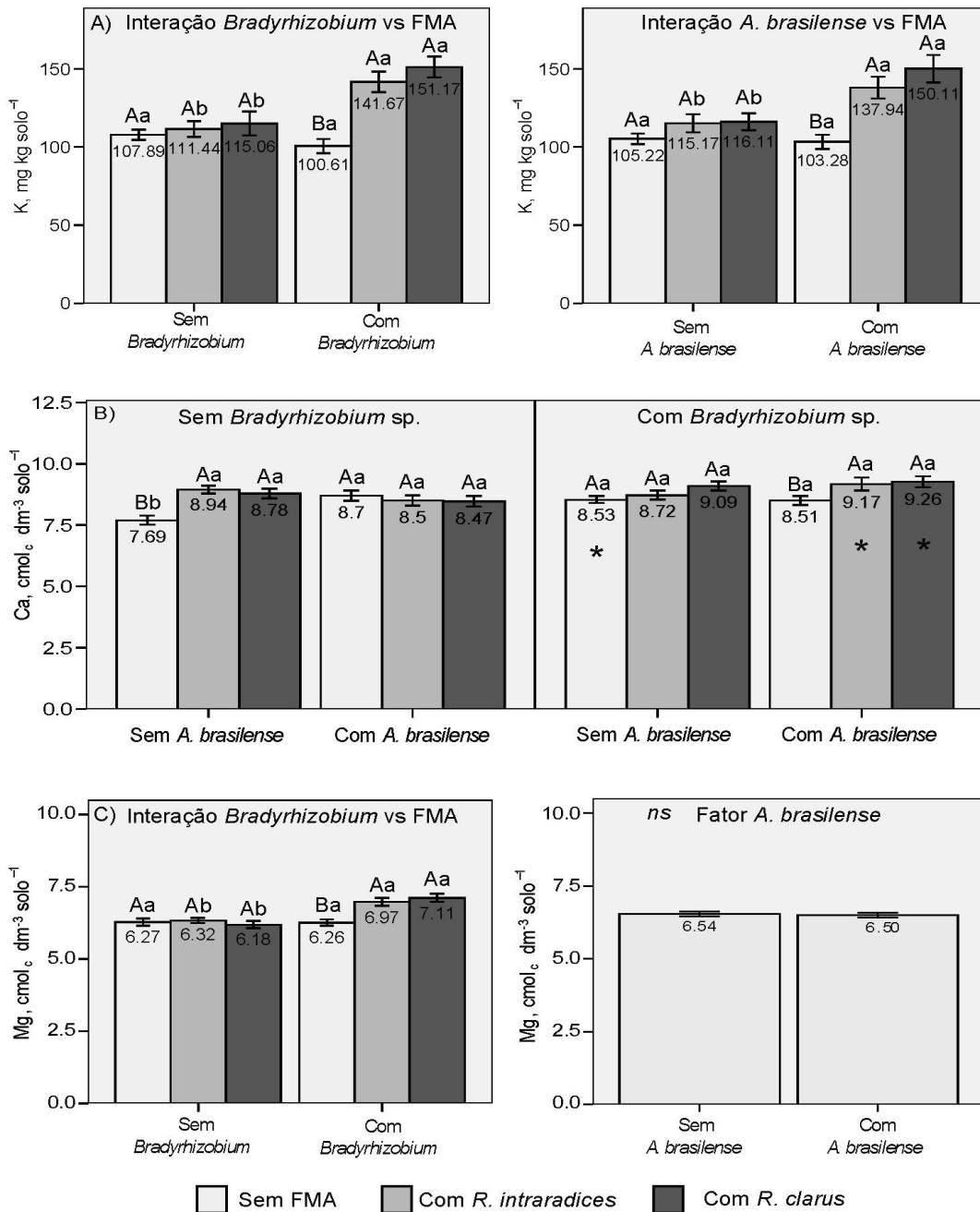


Figura 6. Desdobramento dos efeitos da interação dos tratamentos com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14) sobre a disponibilidade de Potássio (A), Cálcio (B) e Magnésio (C) no solo ao final do cultivo. Gráficos com médias e barras de erro padrão (n=9). Letras maiúsculas indicam diferenças entre tratamentos para o fator de inoculação com FMA dentro de cada grupo e letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* sp para gráfico A e C. Para o gráfico B, letras minúsculas indicam diferenças para o fator de inoculação com *A. brasilense* e “\*” indica diferenças para o fator de inoculação com *Bradyrhizobium* sp. FMA = Fungos Micorrízicos Arbusculares.

### 5.3.6 Correlação entre variáveis do solo e atributos de crescimento das plantas

As variáveis associadas à atividade enzimática do solo (DAF e Fosfatase ácida), foram as que melhor se correlacionaram com as variáveis de crescimento das plantas, produção de biomassa (MSPA, MSR e MST) e acúmulo de nutrientes no tecido vegetal (N, P, K, Ca e Mg) (**Figura 7**). Essas variáveis apresentaram valores de correlação variando de moderado a alto (Mukaka, 2012), enquanto as demais variáveis do solo avaliadas, apresentaram valores de correlação baixos a insignificantes.



Figura 7. Correlação das variáveis do solo com as variáveis associadas ao crescimento vegetal em experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14). Os dados da correlação de Pearson foram classificados de acordo com Mukaka (2012) como insignificante (0 a 0,30), baixo (0,30 a 0,50), moderado (0,50 a 0,70), alta (0,7 a 0,90) e muito alta (>0,9).

## 5.4 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou o efeito da coinoculação de várias combinações de FMA e BPCP em uma leguminosa. Houve sinergismo entre *Crotalaria juncea*, os FMA e BPCP em relação ao incremento da produção de biomassa vegetal, aumento da disponibilidade de nutrientes no solo (K, Ca, Mg), acúmulo de nutrientes na biomassa da parte aérea (P, K, Ca e Mg) e atividade enzimática do solo (DAF e fosfatase ácida). Estes resultados destacam o papel dos microrganismos na ciclagem de nutrientes, na promoção do crescimento de plantas e na recuperação das plantas e da microbiota em ambientes degradados. Resultados semelhantes têm evidenciado a importância de microrganismos dos diferentes grupos consorciados, promovendo aumentos no acúmulo de nutrientes no tecido vegetal (Gitonga et al., 2021; Gough et al., 2021; Canei, 2021), aumento da biomassa (Biró et al., 2000; Gitonga et al., 2021; Gough et al., 2021; Canei, 2021) e produtividade, além da redução do uso de fertilizantes (Gitonga et al., 2021) e até mesmo no controle biológico (Gough et al., 2021; Prasad, 2021).

Em nosso trabalho, a análise da inoculação de somente um microrganismo, de forma isolada, para promoção de crescimento vegetal da parte aérea mostrou que os maiores incrementos foram com *R. clarus* enquanto para promoção de crescimento de raízes os dois FMA se destacaram. Por sua vez, foram verificados incrementos mais expressivos para todas as combinações de dois microrganismos, exceto para *A. brasilense* junto com *R. intraradices*. As inoculações com três microrganismos combinados promoveram incrementos de MSPA e MST superiores à dupla inoculação, quando os dois FMA foram combinados com as bactérias, enquanto para a MSR, somente o *R. clarus* foi superior à dupla inoculação. Essa maior produção de biomassa seca está associada a maior absorção e disponibilização de nutrientes para as plantas, evidenciadas pelos dados de acúmulo de nutrientes na MSPA, que apresentou um comportamento semelhante.

O aumento significativo da biomassa e do acúmulo de nutrientes na parte aérea sob a inoculação dos microrganismos, principalmente quando coinoculados, é explicada pela forma de atuação das BPCP e FMA sobre a promoção de crescimento. A coinoculação de microrganismos promove uma série de benefícios mútuos que potencializa todo o processo simbiótico e promove maiores benefícios do ponto de vista nutricional, fisiológico e de proteção das plantas (Biró et al., 2000; Zeffa et al., 2019; Calzavara et al., 2018). Por exemplo, a inoculação de *A. brasilense* ou FMA juntamente com *Bradyrhizobium* promove aumento da nodulação pelo *Bradyrhizobium*, resultando em

maior fixação de N para as plantas (Püschel et al., 2017; Meena et al., 2018). Por outro lado, os FMA também atuam na absorção de uma série de nutrientes do solo, especialmente o P, elemento limitante para o crescimento das plantas e funcionamento da simbiose planta-*Bradyrhizobium* (Püschel et al., 2017). Além disso, o *A. brasilense* atua modulando uma série de hormônios promotores de crescimento vegetal, promovendo um melhor desenvolvimento radicular e da parte aérea das plantas (Zeffa et al., 2019), conseqüentemente levando a maior absorção de água e nutrientes (Calzavara et al., 2018). Com isso, essa interação benéfica entre os diferentes microrganismos promove maior acúmulo de biomassa e nutrientes nas plantas (Filipini et al., 2021; Canei, 2021).

Diversos mecanismos podem atuar na disponibilização de nutrientes no solo e estímulo do crescimento das plantas, e dentre eles está a exsudação de substâncias orgânicas pelas raízes das plantas que atuam estimulando a microbiota que, por sua vez, atuará nos processos de mineralização e disponibilização de nutrientes (Priyadharsini e Muthukumar, 2016; Das e Pradhan, 2016; Rawat et al., 2018). Os exsudatos radiculares e a microbiota do solo também atuam liberando quelatos que auxiliam nos processos de absorção de nutrientes pelas plantas (Jones, 1998). O presente estudo mostrou o efeito da inoculação dos microrganismos sobre a disponibilização de nutrientes no solo e aumento da atividade enzimática do solo. A atividade enzimática do solo, mensurada pela DAF e fosfatase ácida, se correlacionou com a biomassa (MSPA, MSR e MST) e o acúmulo de nutrientes (N, P, K, Ca e Mg) da parte aérea das plantas.

A DAF e a Fosfatase ácida mostram-se bons indicadores para avaliar os processos de disponibilização de nutrientes no solo, e conseqüentemente aumento da biomassa e acúmulo de nutrientes na MSPA. Outros estudos já têm indicado essas análises para avaliar a capacidade do solo em realizar a ciclagem de nutrientes (Souza et al., 2020; Ghosh et al., 2020). A avaliação da atividade da DAF mensura a atividade de diversas enzimas, tais como: proteases, lipases e esterases presentes no solo (Schnürer e Rosswall, 1982). Essas enzimas atuam nos processos de hidrólise de vários compostos e constitui o primeiro passo na mineralização dos nutrientes que chega ao solo através da incorporação dos restos culturais, fertilizantes orgânicos ou pela morte de organismos.

A velocidade e intensidade do processo de mineralização e disponibilização do P orgânico podem ser acompanhadas pela avaliação da atividade da fosfatase ácida, essencial para acompanhamento de solos em ambientes degradados e com baixa disponibilidade de P (Speir e Ross, 2002). O P orgânico contido na cama de aves, na

forma de fitina, ácidos nucleicos e fosfolipídios, é um estoque importante e pode ser mineralizado pela ação da fosfatases, que são secretadas por plantas e microrganismos (Tabatabai, 1994; George et al., 2011). Dessa forma, a atividade da fosfatase ácida está ligada ao crescimento e atividade das raízes (Dinkelaker e Marschner, 1992; Krämer e Green, 2000), e o presente estudo mostrou correlação entre MSR e atividade da fosfatase ácida. Há evidência que as fosfatases extracelulares sintetizadas por microrganismos do solo são responsáveis pela disponibilização de 30-65% do P total nos solos (Condrón et al. 2005).

No experimento aqui relatado, a principal fonte de nutrientes foi a cama de aves, composta em grande parte por resíduos orgânicos, misturada ao solo da área de empréstimo. Para disponibilizar os nutrientes de sua forma orgânica para inorgânica, uma intensa atividade de microrganismos é necessária para realizar o processo de decomposição dos materiais orgânicos (Adnan et al., 2019). Esses microrganismos realizam a disponibilização de nutrientes principalmente através da produção de diversas enzimas que mineralizam da matéria orgânica, disponibilizando os nutrientes na rizosfera e possibilitando melhor aproveitamento das plantas (Adnan et al., 2019; Sattar et al., 2019; El-Sawah et al., 2021). Isso explica o aumento da atividade enzimática do solo em grande parte dos tratamentos inoculados, e essa atividade enzimática estar correlacionada com a disponibilidade de nutrientes no solo e consequente promoção de crescimento vegetal.

Após serem disponibilizados no solo, os nutrientes sofrem diversos processos químico e físicos, podendo se ligar a partículas de argila ou MO, formar complexos com outros elementos, ser utilizados e ficar imobilizados na biomassa microbiana (Heuck et al., 2015; Adnan et al., 2019). As características químicas dos elementos têm um papel muito importante na definição da dinâmica deles no solo. Dentre os elementos avaliados neste estudo, o P tem uma maior afinidade em se ligar a hidróxidos e argilas e formar complexos com outros elementos, tornando-o indisponível às plantas, diferente do Ca, Mg e K (Halajnia et al., 2009; Sanchez, 2019). Esse fato pode explicar por que neste estudo, mesmo com aumento da atividade da fosfatase ácida, os teores de P presentes no solo não aumentaram. Como constatado no trabalho de Adnan et al. (2019), à medida que o P é disponibilizado, pode imediatamente ser absorvido pelas plantas, sendo o excedente adsorvido ou formado complexos com outros elementos. Outra explicação pode ser que parte do P foi imobilizado na biomassa microbiana (Achat et al., 2010; Heuck et al., 2015).



Os FMA e as BPCP exercem papel importante na aquisição de nutrientes pouco móveis e disponíveis no solo, como P (SMITH E READ, 2008), o que explica o maior acúmulo de P encontrado em nosso estudo com a inoculação. A inoculação de FMA potencializa a atividade enzimática do solo (Canei, 2021), além de promover melhorias nas propriedades físicas e químicas do solo (Ezawa e Yoshida, 1994); El-Sawah et al., 2021). Além disso, as BPCP atuam sobre a disponibilização de P de forma direta, pela secreção de fosfatase e liberação de ácidos orgânicos (Taurian et al., 2010). Dessa forma, o aumento da atividade da fosfatase no solo está atrelado à inoculação de FMA e BPCP, possibilitando que a planta utilize fontes orgânicas de P. O P no solo no decorrer do tempo sai da solução do solo para se adsorver em superfícies de argilas (Halajnia et al. 2009), ou formar complexos insolúveis com cátions, como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em solo alcalino ou com óxidos e hidróxidos de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  em solos ácidos (Yadav et al. 2017). Uma pequena fração das principais formas inorgânicas de P (fosfato tricálcico  $(\text{Ca}_3\text{PO}_4)_2$ , fosfato de alumínio  $(\text{Al}_3\text{PO}_4)$ , fosfato de ferro  $(\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2)$ , pode ser novamente convertida em P solúvel por microrganismos (Song et al., 2008; Khan et al., 2013; Sharma et al., 2013) através de mecanismos como a excreção de íons  $\text{H}^+$  ou ação de ácidos orgânicos (acético, láctico, cítrico, oxálico) e inorgânicos (sulfúrico e carbônico) (Chen et al., 2006; Yi et al., 2008; Khan et al., 2013).

As hifas de FMA exsudam vários compostos orgânicos em seu solo circundante, variando de pequenas moléculas orgânicas, como frutose, a compostos mais complexos, por exemplo, lipo-quitto-oligossacarídeos, peptídeos e glicoproteínas, com funções de sinalização ou outras. Por meio da absorção de nutrientes solúveis da solução do solo e da exsudação de compostos químicos específicos agindo como atrativos ou compostos inibidores, os fungos FMA podem moldar o microbioma em torno das hifas, com consequências para uma variedade de processos do solo, incluindo mineralização de N orgânico e nitrificação (Bukovská et. al., 2018; Zhang et al., 2018; Jansa et al., 2020). Os fungos exploram o solo em busca de nutrientes minerais a distâncias de até 10 cm das raízes, além do que podem alcançar os pelos radiculares, superando as zonas de depleção ao redor das raízes para nutrientes limitados pela difusão (Smith et al., 2001; Jansa et al., 2005). No presente estudo, exsudatos estimulados pela inoculação podem ter promovido o aumento da atividade enzimática DAF e fosfatase ácida do solo.

Todos os nutrientes sofrem influência direta da estrutura física e química do solo; sendo assim, os acréscimos da deposição de glomalina no solo são essenciais na dinâmica

de ciclagem dos nutrientes. A glomalina extraída por citrato e determinada por Bradford (1975) também é chamada de proteína do solo associada à glomalina, por não apresentar somente a fração de proteínas produzida por FMA (Gillespie et al., 2011). Ela pode representar uma fração que contém uma série de outras proteínas, junto com diversos lipídios e compostos fenólicos, que não podem ser distinguidos um do outro ao se usar o ensaio inespecífico de Bradford para medir a concentração de proteínas (Kern et al., 2003; Gillespie et al., 2011). A glomalina, especificamente, é uma glicoproteína hidrofóbica constituinte estrutural dos FMA, até o momento identificada apenas dentro do filo Glomeromycota (Wright et al., 1996). A glomalina contém 28–45% de C, 0,9–7,3% de N e 0,03–0,1% de P (Sousa et al., 2012; Wang et al., 2014). Embora essa fração de proteína do solo determinada no estudo não seja específica, foram verificados efeitos somente dos FMA sobre sua concentração no solo. A elevação da concentração de glomalina no solo está direta e positivamente correlacionada à estabilidade dos agregados do solo (Wright e Upadhyaya, 1998; Wright et al., 2007; Rillig, 2004). Conseqüentemente, o ambiente é beneficiado por todos os benefícios de um solo bem estruturado, como trocas gasosas, proteção da matéria orgânica, infiltração de água, crescimento de raízes entre outros. Além disso, a glomalina é capaz de sequestrar metais presentes no solo, diminuindo sua disponibilidade e conseqüentemente sua toxicidade às plantas e aos microrganismos (Gonzalez-Chavez et al., 2004; Chern et al., 2007), podendo colaborar com o estabelecimento das plantas em áreas contaminadas.

Aumentos nos teores de glomalina do solo também foram verificados por outros autores com a inoculação de *R. intraradices* (Bedini et al., 2009) e *R. clarus* (Ferreira et al., 2018). Ferreira et al. (2018) verificaram incrementos nos teores de glomalina facilmente extraível do solo de até 156% em solo sem aplicação de P, superior ao este estudo em que houve aumentos de 6,5%. O trabalho citado também constatou incrementos no teor de glomalina total do solo. O estudo realizado por Ferreira et al. (2018) foi com o mesmo isolado do nosso estudo (*R. clarus* - UFSC 14) e com a mesma planta (*C. juncea*).

A coinoculação de BPCP e FMA em espécies vegetais, com o objetivo de recuperação de áreas degradadas, é fundamental, de forma direta para as plantas, em decorrência do favorecimento do seu estabelecimento e desenvolvimento em condições edáficas distintas, como baixa disponibilidade de nutrientes no solo e teores de metais pesados (Cu e Zn), e de forma indireta nas propriedades bio-físico-químicas do solo. Isso ocorre em decorrência do aumento na atividade enzimática do solo, indicando melhorias

contínuas no aproveitamento dos nutrientes do solo pelos microrganismos, enquanto estes disponibilizam os nutrientes às plantas, que conseqüentemente apresentarão melhor desempenho produzindo maior quantidade de biomassa e potencializando a recuperação da área. Ademais, a coinoculação pode favorecer os processos biogeoquímicos do solo, e a qualidade dele, no que diz respeito a sua recuperação, além de, em casos com presença de metais pesados disponíveis no solo em alta concentração, mobilizar elementos como Cu e Zn não deixando-os disponíveis às plantas (Ferreira et al., 2018).

Em estudo realizado por Canei (2021), a coinoculação de *R. intraradices* (Rootella<sup>BR</sup>) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Rhizobium* sp e *Pseudomonas* sp.) em espécies arbóreas (*C. myrianthum*, *M. scabrella*, *S. multijuga*), promoveram incrementos na biomassa vegetal de 254, 221 e 445%, respectivamente. A mesma autora, em estudo a campo, verificou que a coinoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (*Rhizobium* sp. + *Pseudomonas* sp. + *Pantoea* sp.) juntamente com *R. intraradices* (Rootella<sup>BR</sup>) aumentou a taxa de sobrevivência das mudas de *S. multijuga*.

Em nosso estudo, os dois fungos micorrízicos arbusculares foram eficientes para os diversos parâmetros avaliados, mas houve um destaque para o *R. clarus* (UFSC - 14). Esse isolado é autóctone das áreas de mineração de carvão e já se mostrou eficiente na promoção de crescimento vegetal de várias espécies vegetais. Ferreira et al. (2018) verificaram incrementos de até 116% na biomassa de *C. juncea* inoculada com o mesmo isolado (UFSC 14), comparativamente ao tratamento não inoculado, em solo com teor natural de P. Entre os principais benefícios promovidos por este isolado e avaliado em diversos estudos, está o maior fornecimento de nutrientes (principalmente P) às plantas (Stoffel et al. 2016; Meyer et al., 2017; Ferreira et al., 2018), redução de fitotoxidez por elementos traço (Stoffel et al. 2016; Ferreira et al., 2018), aumento da atividade enzimática e teor de glomalina do solo (Ferreira et al., 2018), resultando em maior produção de biomassa da parte aérea e raízes das plantas. Em de Meyer et al. (2017), a inoculação com *R. clarus* promoveu incrementos de 229% nos teores de P da parte aérea e de 88% nos teores de P das raízes de vetiver. Os estudos que corroboram a eficiência desse isolado em diversas situações e culturas indicam que o *R. clarus* (UFSC – 14) é um candidato com potencial para uso em inoculantes comerciais de FMA.

O uso de microrganismos autóctones das áreas que se deseja recuperar é uma técnica muito eficiente, pois esses microrganismos possuem uma melhor adaptação às condições

ambientais, comparativamente a isolados não autóctones (Mulas et al., 2013). No entanto, nem sempre é possível isolar e desenvolver um procedimento de multiplicação desses microrganismos para cada situação específica. Nesse sentido, o inoculante comercial pode ser uma estratégia viável para utilizar nos processos de recuperação ambiental.

Nosso estudo demonstrou o potencial que os microrganismos possuem para promover o aumento da atividade enzimática e disponibilização de nutrientes do solo, resultando em maior produção de biomassa vegetal e acúmulo de nutrientes. Também ficou evidente que a coinoculação dos microrganismos gerou resultados mais significativos, evidenciando o efeito sinérgico da co-inoculação de *Bradyrhizobium* sp e *A. brasilense* juntamente com FMA (*R. intraradices* ou *R. clarus*).

## 5.5 CONCLUSÕES

A coinoculação dos microrganismos *Bradyrhizobium* sp, *A. brasilense* e FMA (*R. intraradices* ou *R. clarus*) promove aumentos da atividade biológica do solo, e consequentemente a disponibilização de nutrientes e crescimento da *C. juncea*.

A coinoculação de dois microrganismos juntos promove incrementos superiores à inoculação simples, e a inoculação dos três microrganismos promove incrementos superiores às duplas inoculações.

A atividade enzimática do solo tem a correlação mais alta com produção de biomassa e acúmulo de nutrientes no tecido vegetal das plantas.

Os FMA promovem aumentos no teor de glomalina facilmente extraível do solo.

O isolado de *R. clarus* (UFSC - 14), autóctone de áreas de mineração é mais eficiente que um fungo micorrízico arbuscular exótico no aumento da atividade enzimática e do crescimento vegetal.

## 5.6 REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C.; DUBEY, R. K.; TRIPATHI, V.; GUPTA, V. K.; SINGH, H. B. Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 847–850, nov. 2016.
- ACHAT, D. L.; MOREL, C.; BAKKER, M. R.; AUGUSTO, L.; PELLERIN, S.; GALLET-BUDYNEK, A.; GONZALEZ, M. Assessing turnover of microbial biomass phosphorus: Combination of an isotopic dilution method with a mass balance model. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2231–2240, dez. 2010.
- ADNAN, M.; KHAN, I. A.; SAEED, M.; IHSAN, M. Z.; SAUD, S.; RIAZ, M.; WANG, D.; WU, C. Integration of poultry manure and phosphate solubilizing bacteria improved availability of Ca bound P in calcareous soils. **3 Biotech**, v. 9, n. 10, p. 368, out. 2019.
- 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, jan. 2014.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London San Diego: Academic Press, 1995.
- ARCAND, M. M.; SCHNEIDER, K. D. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 4, p. 791–807, dez. 2006.
- ASHRAFI, E.; ZAHEDI, M.; RAZMJOO, J. Co-inoculations of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia under salinity in alfalfa. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 619–629, 3 set. 2014.
- BEDINI, S.; PELLEGRINO, E.; AVIO, L.; PELLEGRINI, S.; BAZZOFFI, P.; ARGESE, E.; GIOVANNETTI, M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1491–1496, jul. 2009.

- BERBARA, R. L. L.; SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. III - FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES: MUITO ALÉM DA NUTRIÇÃO. *In: Nutrição mineral de plantas*. Viçosa, MG: Fernandes, M.S. (ed). Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 53–88.
- BETANCUR-AGUDELO, M.; MEYER, E.; LOVATO, P. E. Growth, heavy metal uptake, and photosynthesis in “Paulsen 1103” (*Vitis berlandieri* x *rupestris*) grapevine rootstocks inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi from vineyard soils with high copper contents. **VITIS - Journal of Grapevine Research**, v. 59, n. 4, p. 169–180, 29 out. 2020.
- BHAT, M. A.; RASOOL, R.; RAMZAN, S. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable and eco-friendly agriculture. v. 3, p. 23–25, 2019.
- BIRÓ, B.; KÖVES-PÉCHY, K.; VÖRÖS, I.; TAKÁCS, T.; EGGENBERGER, P.; STRASSER, R. J. Interrelations between *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers and arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of alfalfa in sterile, AMF-free or normal soil conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 2, p. 159–168, out. 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BRASIL. **10º Relatório de Monitoramento dos Indicadores Ambientais. Processo nº.2000.72.04.002543-9**. [s.l.] Justiça Federal, 1ª Vara Federal de Criciúma-SC, 2016.
- BRUIJN, F. J. DE. Introduction. *In: BRUIJN, F. J. DE (Ed.). Biological Nitrogen Fixation*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2015. p. 1–4.
- BUKOVSKÁ, P.; BONKOWSKI, M.; KONVALINKOVÁ, T.; BESKID, O.; HUJSLOVÁ, M.; PÜSCHEL, D.; ŘEZÁČOVÁ, V.; GUTIÉRREZ-NÚÑEZ, M. S.; GRYNDLER, M.; JANSA, J. Utilization of organic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi—is there a specific role for protists and ammonia oxidizers? **Mycorrhiza**, v. 28, n. 3, p. 269–283, abr. 2018.

- CALZAVARA, A. K.; PAIVA, P. H. G.; GABRIEL, L. C.; OLIVEIRA, A. L. M.; MILANI, K.; OLIVEIRA, H. C.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; OLIVEIRA, M. C. N. DE; DIAS-PEREIRA, J.; STOLF-MOREIRA, R. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 20, n. 5, p. 870–878, set. 2018.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, dez. 2016.
- CHEN, J. H. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. *In: International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, 2006.* [s.l: s.n.]. v. 20p. 1–10.
- CONDON, L. M.; TURNER, B. L.; CADE-MENUN, B. J. Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. *In: Sims, J.T.; Sharpley, A.N. Phosphorus: agriculture and the environment. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, 2005.* [s.l: s.n.]. p. 87-121.
- DAS, I.; PRADHAN, M. Potassium-Solubilizing Microorganisms and Their Role in Enhancing Soil Fertility and Health. *In: MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P.; MEENA, R. S. (Eds.). Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture.* New Delhi: Springer India, 2016. p. 281–291.
- DAS, K.; BISWAKARMA, N.; ZHIIPAO, R.; KUMAR, A.; GHASAL, P. C.; POONIYA, V. Significance and Management of Green Manures. *In: GIRI, B.; VARMA, A. (Eds.). Soil Health. Soil Biology.* Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 197–217.
- DEVI, M.; KING SOLOMON, E.; NIVAS, D.; CHANDRU, S. Enhancement of Soil Fertility Through Agro Inputs on Response to Cover Crop of *Crotalariajuncea* L. *In: VELU, R. K. (Ed.). Microbiological Research In Agroecosystem Management.* India: Springer, 2013. p. 175–186.

- DINKELAKER, B.; MARSCHNER, H. In vivo demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil-grown plants. **Plant and Soil**, v. 144, n. 2, p. 199–205, 1 ago. 1992.
- EL-SAWAH, A. *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Soil Key Enzymes, Plant Growth, Seed Yield, and Qualitative Attributes of Guar. **Agriculture**, v. 11, n. 3, p. 194, 27 fev. 2021.
- ELSGAARD, L.; PETERSEN, S. O.; DEBOSZ, K. Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 2. Effects on soil microbiology as influenced by sewage sludge and incubation time. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1664–1672, ago. 2001.
- ETESAMI, H. Plant–microbe interactions in plants and stress tolerance. *In: Plant Life Under Changing Environment*. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 355–396.
- EZAWA, T.; YOSHIDA, T. Characterization of phosphatase in marigold roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 40, n. 2, p. 255–264, jun. 1994.
- FENG, Y.; WANG, J.; BAI, Z.; READING, L. Effects of surface coal mining and land reclamation on soil properties: A review. **Earth-Science Reviews**, v. 191, p. 12–25, abr. 2019.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs Package**. [s.l.: s.n.].
- FERREIRA, P. A. A.; CERETTA, C. A.; TIECHER, T.; FACCO, D. B.; GARLET, L. P.; SOARES, C. R. F. S.; SORIANI, H. H.; NICOLOSO, F. T.; GIACHINI, A. J.; BRUNETTO, G.; CORNEJO, P. Rhizophagus Clarus and Phosphorus in Crotalaria juncea: Growth, Glomalin Content and Acid Phosphatase Activity in a Copper-Contaminated Soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 42, n. 0, 26 jul. 2018.
- FILIP, Z. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 88, n. 2, p. 169–174, fev. 2002.



- FILIPINI, L. D.; PILATTI, F. K.; MEYER, E.; VENTURA, B. S.; LOURENZI, C. R.; LOVATO, P. E. Application of Azospirillum on seeds and leaves, associated with Rhizobium inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1033–1038, abr. 2021.
- GEORGE, T. S.; FRANSSON, A. M.; HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J. Phosphorus nutrition: rhizosphere processes, plant response and adaptations. *In: Phosphorus in action*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2011. [s.l: s.n.]. p. 245–271.
- GHOSH, A.; SINGH, A. B.; KUMAR, R. V.; MANNA, M. C.; BHATTACHARYYA, R.; RAHMAN, M. M.; SHARMA, P.; RAJPUT, P. S.; MISRA, S. Soil enzymes and microbial elemental stoichiometry as bio-indicators of soil quality in diverse cropping systems and nutrient management practices of Indian Vertisols. **Applied Soil Ecology**, v. 145, p. 103304, jan. 2020.
- GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 10–11, p. 1389–1414, set. 1998.
- GITONGA, N. M.; KOSKEY, G.; NJERU, E. M.; MAINGI, J. M.; CHERUIYOT, R. Dual inoculation of soybean with *Rhizophagus irregularis* and commercial *Bradyrhizobium japonicum* increases nitrogen fixation and growth in organic and conventional soils. **AIMS Agriculture and Food**, v. 6, n. 2, p. 478–495, 2021.
- GLOBALFERT .2º **Reporte anual do mercado de fertilizantes**. Disponível em: <<https://www.globalfert.com.br/OGFposEvento/arquivo/Outlook-GlobalFert-2021.pdf>>.
- GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 19 jan. 2016.
- GOUGH, E. C.; OWEN, K. J.; ZWART, R. S.; THOMPSON, J. P. Arbuscular mycorrhizal fungi acted synergistically with Bradyrhizobium sp. to improve nodulation, nitrogen fixation, plant growth and seed yield of mung bean (*Vigna*

radiata) but increased the population density of the root-lesion nematode *Pratylenchus thornei*. **Plant and Soil**, v. 465, n. 1–2, p. 431–452, ago. 2021.

HAKIM, S.; NAQQASH, T.; NAWAZ, M. S.; LARAIB, I.; SIDDIQUE, M. J.; ZIA, R.; MIRZA, M. S.; IMRAN, A. Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 617157, 15 fev. 2021.

HALAJNIA, A.; HAGHNIA, G. H.; FOTOVAT, A.; KHORASANI, R. Phosphorus fractions in calcareous soils amended with P fertilizer and cattle manure. **Geoderma**, v. 150, n. 1–2, p. 209–213, abr. 2009.

HARO, H.; SANON, K. B.; LE ROUX, C.; DUPONNOIS, R.; TRAORÉ, A. S. Improvement of cowpea productivity by rhizobial and mycorrhizal inoculation in Burkina Faso. **Symbiosis**, v. 74, n. 2, p. 107–120, 1 fev. 2018.

HEUCK, C.; WEIG, A.; SPOHN, M. Corrigendum to Heuck et al. (2015) “Soil microbial biomass C:N:P stoichiometry and microbial use of organic phosphorus”, *Soil Biology & Biochemistry* 85, 119-129. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 127, p. 329–330, dez. 2018.

HODGE, A.; FITTER, A. H. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 31, p. 13754–13759, 3 ago. 2010.

HORWATH, W. R.; PAUL, E. A. Microbial Biomass. *In*: WEAVER, R. W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Eds.). . **SSSA Book Series**. Madison, WI, USA: Soil Science Society of America, 2018. p. 753–773.

HUNGRIA M ; NOGUEIRA MA; ARAUJO RS. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool improve yield and sustainability. . **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, n. 06, p. 811–817, 2015.

- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791–801, out. 2013.
- HWANG, S. F. Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the Development of Verticillium and Fusarium Wilts of Alfalfa. **Plant Disease**, v. 76, n. 3, p. 239, 1992.
- JANSA, J.; MOZAFAR, A.; FROSSARD, E. Phosphorus Acquisition Strategies within Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community of a Single Field Site. **Plant and Soil**, v. 276, n. 1–2, p. 163–176, out. 2005.
- JANSA, J.; ŠMILAUER, P.; BOROVIČKA, J.; HRŠELOVÁ, H.; FORCZEK, S. T.; SLÁMOVÁ, K.; ŘEZANKA, T.; ROZMOŠ, M.; BUKOVSKÁ, P.; GRYNDLER, M. Dead Rhizophagus irregularis biomass mysteriously stimulates plant growth. **Mycorrhiza**, v. 30, n. 1, p. 63–77, jan. 2020.
- JASTROW, J. D.; MILLER, R. M.; LUSSENHOP, J. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie|The submitted manuscript has been created by the University of Chicago as operator of Argonne National Laboratory under Contract No. W-31-109-ENG-38 with the U.S. Department of Energy.1. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 905–916, jul. 1998.
- JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and Soil**, v. 205, n. 1, p. 25–44, 1998.
- KHAN, M. S.; AHMAD, E.; ZAIDI, A.; OVES, M. Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. *In: Maheshwari DK et al (eds) Bacteria in agrobiolgy: crop productivity. Springer, Berlin, 2013. [s.l: s.n.].* p. 237–265.
- KHAN, N.; BANO, A.; ALI, S.; BABAR, MD. A. Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 2, p. 189–203, mar. 2020.

- KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v. 92, n. 4, p. 486–488, jun. 1989.
- KRÄMER, S.; GREEN, D. M. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 179–188, 1 fev. 2000.
- LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1314–1335, set. 2020.
- LUCA, M. J. DE; HUNGRÍA, M. Plant densities and modulation of symbiotic nitrogen fixation in soybean. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 3, p. 181–187, jun. 2014.
- MA, Y.; RAJKUMAR, M.; ZHANG, C.; FREITAS, H. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. **Journal of Environmental Management**, v. 174, p. 14–25, jun. 2016.
- MAHESHWARI , N. K.; SINGH, R. P.; MANCHANDA, G.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) Nodulating Bacteria Capable For High Antagonistic Potential And Plant Growth Promotion Attributes. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**. p. 385–389, 2021.
- MCGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H.; EVANS, D. G.; FAIRCHILD, G. L.; SWAN, J. A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 115, n. 3, p. 495–501, jul. 1990.
- MEIER, S.; BORIE, F.; BOLAN, N.; CORNEJO, P. Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 741–775, abr. 2012.
- MENEGHETTI, A. M. **Manual de procedimentos de amostragem e análise química de plantas, solo e fertilizantes**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.

- MEYER, E.; LONDOÑO, D. M. M.; ARMAS, R. D. DE; GIACHINI, A. J.; ROSSI, M. J.; STOFFEL, S. C. G.; SOARES, C. R. F. S. Arbuscular mycorrhizal fungi in the growth and extraction of trace elements by *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) in a substrate containing coal mine wastes. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 2, p. 113–120, 1 fev. 2017.
- MOREIRA, F. M. S.; CARES, J. E.; ZANETTI, R.; STURMER, S. **O ecossistema solo: Componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. Lavras: UFLA, 2013.
- MORETTI, L. G.; CRUSCIOL, C. A. C.; BOSSOLANI, J. W.; MOMESSO, L.; GARCIA, A.; KURAMAE, E. E.; HUNGRIA, M. Bacterial Consortium and Microbial Metabolites Increase Grain Quality and Soybean Yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 1923–1934, dez. 2020.
- MOURA, G. G. D. DE; ARMAS, R. D. DE; MEYER, E.; GIACHINI, A. J.; ROSSI, M. J.; SOARES, C. R. F. S. Rhizobia Isolated from Coal Mining Areas in the Nodulation and Growth of Leguminous Trees. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, n. 0, 2016.
- MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal: The Journal of Medical Association of Malawi**, v. 24, n. 3, p. 69–71, set. 2012.
- MULAS, D.; DÍAZ-ALCÁNTARA, C.; MULAS, R.; MARCANO, I.; BARQUERO, M.; SERRANO, P.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. Inoculants based in Autochthonous Microorganisms, a Strategy to Optimize Agronomic Performance of Biofertilizers. In: GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. (Ed.). **Beneficial Plant-microbial Interactions**. [s.l.] CRC Press, 2013. p. 301–328.
- NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, n. 10, p. 407–411, out. 1995.

- NOVAIS, C. B.; BORGES, W. L.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; GIOVANNETTI, M.; SIQUEIRA, J. O. **Técnicas básicas em micorrizas arbusculares**. Lavras: UFLA, 2017.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H.; WAGNER, H.; OKSANEN, M. J. **Package 'vegan'. Community ecology package, version. 2:1-295, 2013.** [s.l: s.n.].
- OLIVOTO, T.; LÚCIO, A. D. metan: An R package for multi-environment trial analysis. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 6, p. 783–789, jun. 2020.
- PELLEGRINI, M.; SPERA, D. M.; ERCOLE, C.; DEL GALLO, M. Allium cepa L. Inoculation with a Consortium of Plant Growth-Promoting Bacteria: Effects on Plants, Soil, and the Autochthonous Microbial Community. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 639, 19 mar. 2021.
- PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, v. 239, n. 1, p. 123–132, 1 fev. 2002.
- PRASAD, K. Effect of Dual Inoculation of Arbuscular Mycorrhiza Fungus and Cultivar Specific Bradyrhizobium Japonicum On the Growth, Yield, Chlorophyll, Nitrogen and Phosphorus Contents of Soybean (*Glycine Max (L.) Merrill.*) Grown on Alluvial Soil. **Journal of Innovation in Applied Research**, v. 4, 2021.
- PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. Interactions Between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Potassium-Solubilizing Microorganisms on Agricultural Productivity. *In*: MEENA, V. S.; MAURYA, B. R.; VERMA, J. P.; MEENA, R. S. (Eds.). **Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture**. New Delhi: Springer India, 2016. p. 111–125.
- PÜSCHEL, D.; JANOUŠKOVÁ, M.; VOŘÍŠKOVÁ, A.; GRYNDLEROVÁ, H.; VOSÁTKA, M.; JANSÁ, J. Arbuscular Mycorrhiza Stimulates Biological Nitrogen Fixation in Two *Medicago* spp. through Improved Phosphorus Acquisition. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 27 mar. 2017.

- R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing: reference index.** R Foundation for Statistical Computing, 2020. Viena: [s.n.].
- RAJKUMAR, M.; SANDHYA, S.; PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1562–1574, nov. 2012.
- RAWAT, J.; SANWAL, P.; SAXENA, J. Towards the Mechanisms of Nutrient Solubilization and Fixation in Soil System. *In*: MEENA, V. S. (Ed.). **Role of Rhizospheric Microbes in Soil**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 229–257.
- RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 84, n. 4, p. 355–363, 1 nov. 2004.
- ROCHA-NICOLEITE, E.; CAMPOS, M. L.; CITADINI-ZANETTE, V.; SANTOS, R.; MARTINS, R.; SOARES, C. **Mata Ciliar: Implicações técnicas sobre a restauração após mineração de carvão**. Criciúma: SATC, 2013.
- SAHOO, R. K.; ANSARI, M. W.; PRADHAN, M.; DANGAR, T. K.; MOHANTY, S.; TUTEJA, N. Phenotypic and molecular characterization of native Azospirillum strains from rice fields to improve crop productivity. **Protoplasma**, v. 251, n. 4, p. 943–953, jul. 2014.
- SANCHEZ, P. A. **Properties and Management of Soils in the Tropics**. [s.l.] Cambridge University Press., 2019.
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 205, dez. 2019.
- SANTOS MS; NOGUEIRA MA; HUNGRIA M. Outstanding impact of Azospirillum brasilense strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 24 fev. 2021.

- SARAF, M.; PANDYA, U.; THAKKAR, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. **Microbiological Research**, Special Issue on Plant Growth Promotion. v. 169, n. 1, p. 18–29, 20 jan. 2014.
- SATTAR, A.; NAVEED, M.; ALI, M.; ZAHIR, Z. A.; NADEEM, S. M.; YASEEN, M.; MEENA, V. S.; FAROOQ, M.; SINGH, R.; RAHMAN, M.; MEENA, H. N. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 146–159, jan. 2019.
- SCHNURER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1256–1261, jun. 1982.
- SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, dez. 2013.
- SMITH, S. E.; DICKSON, S.; SMITH, F. A. Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? **Functional Plant Biology**, v. 28, n. 7, p. 685, 2001.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. AND. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3. ed. London: Academic Press, London., 2008.
- SONG, O. R.; LEE, S. J.; LEE, Y. S.; LEE, S. C.; KIM, K. K.; CHOI, Y. L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by Burkholderia cepacia DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 151–156, mar. 2008.
- SPEIR, T. W.; ROSS, D. J. Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. *In: Enzymes in the environments: activity, ecology and applications/eds. Burn, R.G.; Dick, R.P. 2002.* [s.l: s.n.]. p. 407–431.
- STOFFEL, S. C. G.; ARMAS, R. D. DE; GIACHINI, A. J.; ROSSI, M. J.; GONZALEZ, D.; MEYER, E.; NICOLEITE, C. H.; ROCHA-NICOLEITE, E.; SOARES, C. R. F. S. ARBUSCULAR MYCORRHIZAL IN THE GROWTH OF LEGUMINOUS



- TREES ON COALMINE WASTE ENRICHED SUBSTRATE. **CERNE**, v. 22, n. 2, p. 181–188, 8 jun. 2016.
- STOFFEL, S. C. G.; SOARES, CLÁUDIO ROBERTO FONSECA SOUSA; MEYER, E.; LOVATO, P. E.; GIACHINI, A. J. Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, n. 7, p. e20200109, 2020.
- STOFFEL, S. C. G.; SOARES, CLÁUDIO ROBERTO FONSECA SOUSA; MEYER, E.; LOVATO, P. E.; GIACHINI, A. J. Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 5, p. 702–713, 31 maio 2020.
- TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. *In*: **Weaver, R.W.; Angle, S.; Bottmley, P. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison: SSSA, 1994.** [s.l: s.n.]. p. 903–947.
- TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v. 329, n. 1–2, p. 421–431, abr. 2010.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. **J. Análises de solo, plantas e outros materiais.** Porto alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
- TISSERANT, E. *et al.* Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 50, p. 20117–20122, 10 dez. 2013.
- UPADHYAY, N. *et al.* Soil ecophysiological and microbiological indices of soil health: a study of coal mining site in sonbhadra, uttar Pradesh. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 16, n. 3, p. 778–800, 2016.
- WANG, F.; KERTESZ, M. A.; FENG, G. Phosphorus forms affect the hyphosphere bacterial community involved in soil organic phosphorus turnover. **Mycorrhiza**, v. 29, n. 4, p. 351–362, jul. 2019.

- WRIGHT, S. F.; FRANKE-SNYDER, M.; MORTON, J. B.; UPADHYAYA, A. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. **Plant and Soil**, v. 181, n. 2, p. 193–203, abr. 1996.
- WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v. 198, n. 1, p. 97–107, 1 jan. 1998.
- WRIGHT, S.; GREEN, V.; CAVIGELLI, M. Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. **Soil and Tillage Research**, v. 94, n. 2, p. 546–549, jun. 2007.
- XAVIER, L. J. C.; GERMIDA, J. J. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* enhance pea yield and nutrition. **Biology and Fertility of Soils**, v. 37, n. 5, p. 261–267, maio 2003.
- XIE, M.-M.; ZOU, Y.-N.; WU, Q.-S.; ZHANG, Z.-Z.; KUČA, K. Single or dual inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia regulates plant growth and nitrogen acquisition in white clover. **Plant, Soil and Environment**, v. 66, n. No. 6, p. 287–294, 23 jun. 2020.
- YADAV, H.; FATIMA, R.; SHARMA, A.; MATHUR, S. Enhancement of applicability of rock phosphate in alkaline soils by organic compost. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 80–85, maio 2017.
- YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1059–1065, jul. 2008.
- YUAN, M.; HE, H.; XIAO, L.; ZHONG, T.; LIU, H.; LI, S.; DENG, P.; YE, Z.; JING, Y. Enhancement of Cd phytoextraction by two *Amaranthus* species with endophytic *Rahnella* sp. JN27. **Chemosphere**, v. 103, p. 99–104, maio 2014.
- ZEFFA, D. M.; PERINI, L. J.; SILVA, M. B.; SOUSA, N. V. DE; SCAPIM, C. A.; OLIVEIRA, A. L. M. DE; AMARAL JÚNIOR, A. T. DO; AZEREDO GONÇALVES, L. S. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and

nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215332, 18 abr. 2019.

ZHANG, L.; FENG, G.; DECLERCK, S. Signal beyond nutrient, fructose, exuded by an arbuscular mycorrhizal fungus triggers phytate mineralization by a phosphate solubilizing bacterium. **The ISME Journal**, v. 12, n. 10, p. 2339–2351, out. 2018.

## 5.7 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de Matéria seca da parte aérea (MSPA), Matéria seca da raiz (MSR) e Matéria seca total (MST) de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14).

Fonte de variação	GL	MSPA		MSR		MST	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
<i>Bradyrhizobium</i> (Br)	1	116,79	<0,001	97,07	<0,001	145,09	<0,001
<i>A. brasilense</i> (Az)	1	78,57	<0,001	40,96	<0,001	86,73	<0,001
FMA	2	33,74	<0,001	71,70	<0,001	50,68	<0,001
Br * Az	1	1,72	0,193	3,26	0,074	2,91	0,091
Br * FMA	2	0,97	0,383	0,18	0,837	0,85	0,433
Az * FMA	2	0,82	0,445	10,42	<0,001	2,38	0,098
Br * Az * FMA	2	4,54	0,013	5,92	0,004	5,90	0,004
Erro	96						
CV%		18,39		12,81		17,24	

Tabela S 2. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de teor de N, P, K, Ca e Mg na MSPA de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e fungos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *R. clarus* (UFSC 14)).

Fonte de variação	GL	Teor de N		Teor de P		Teor de K		Teor de Ca		Teor de Mg	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
<i>Bradyrhizobium</i> (Br)	1	0,13	0,724	1,43	0,235	2,05	0,155	3,20	0,077	1,09	0,299
<i>A. brasilense</i> (Az)	1	0,43	0,513	0,01	0,917	0,51	0,476	2,98	0,087	0,50	0,482
FMA	2	0,09	0,918	0,70	0,502	0,58	0,564	0,80	0,451	1,67	0,194
Br * Az	1	0,01	0,904	0,57	0,452	3,30	0,072	1,04	0,310	0,97	0,327
Br * FMA	2	0,23	0,792	0,62	0,539	1,28	0,283	0,03	0,967	0,03	0,969
Az * FMA	2	0,07	0,930	0,79	0,455	0,75	0,473	2,49	0,089	2,75	0,069
Br * Az * FMA	2	1,45	0,239	1,50	0,228	3,04	0,052	0,27	0,763	0,79	0,459
Erro	96										
CV%		12,36		13,12		11,07		13,38		14,33	

Tabela S 3. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de acúmulo de N, P, K, Ca e Mg na MSPA de *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e fungos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *R. clarus* (UFSC 14)).

Fonte de variação	GL	Acúmulo de N		Acúmulo de P		Acúmulo de K		Acúmulo de Ca		Acúmulo de Mg	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
<i>Bradyrhizobium</i> (Br)	1	237,97	<0,001	238,32	<0,001	91,12	<0,001	91,66	<0,001	88,49	<0,001
<i>A. brasilense</i> (Az)	1	160,00	<0,001	156,40	<0,001	72,03	<0,001	58,57	<0,001	61,30	<0,001
FMA	2	67,37	<0,001	100,96	<0,001	30,07	<0,001	27,38	<0,001	22,86	<0,001
Br * Az	1	5,61	0,020	0,51	0,477	0,01	0,924	0,06	0,813	0,37	0,547
Br * FMA	2	1,37	0,257	0,70	0,502	1,66	0,196	0,71	0,495	0,74	0,480
Az * FMA	2	0,88	0,417	0,21	0,814	1,44	0,242	2,40	0,096	2,69	0,073
Br * Az * FMA	2	3,56	0,032	3,74	0,027	9,97	<0,001	5,87	0,004	2,97	0,056
Erro	96										
CV%		12,9		11,56		18,73		18,36		19,43	

Tabela S 4. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de Fosfatase ácida e Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (DAF) do solo de experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14).

Fonte de variação	GL	DAF		Fosfatase ácida	
		F	p-valor	F	p-valor
<i>Bradyrhizobium</i> (Br)	1	55,69	<0,001	63,15	<0,001
<i>A. brasilense</i> (Az)	1	59,62	<0,001	18,06	<0,001
FMA	2	44,75	<0,001	36,81	<0,001
Br * Az	1	0,11	0,742	0,65	0,423
Br * FMA	2	0,86	0,429	2,40	0,096
Az * FMA	2	0,25	0,781	3,80	0,026
Br * Az * FMA	2	3,27	0,043	8,57	<0,001
Erro	96				
CV%		10,35		12,64	

Tabela S 5. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de Glomalina facilmente extraível (GFE), dificilmente extraível (GDE) e total (GT) do solo de experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *R. clarus* (UFSC 14).

Fonte de variação	GL	GFE		GDE		GT	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
<i>Bradyrhizobium</i> (Br)	1	0,13	0,721	0,01	0,906	0,00	0,999
<i>A. brasilense</i> (Az)	1	0,88	0,350	0,07	0,788	0,00	0,969
FMA	2	3,56	0,032	0,12	0,885	0,76	0,477
Br * Az	1	0,03	0,868	0,57	0,452	0,56	0,457
Br * FMA	2	0,45	0,638	0,66	0,521	0,39	0,679
Az * FMA	2	0,32	0,729	1,34	0,268	0,80	0,453
Br * Az * FMA	2	0,25	0,780	0,86	0,427	0,58	0,560
Erro	96						
CV%		11,75		7,73		6,89	

Tabela S6. Quadro da análise de variância (ANOVA) trifatorial para os dados de P (Mehlich I e Resina) e K disponível (Mehlich I) e Ca e Mg disponível em solo de experimento com *Crotalaria juncea* submetida ou não à inoculação de *Bradyrhizobium* sp. (BR 2001), *Azospirillum brasilense* (Abv5) e os fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus intraradices* (Rootella BR) ou *Rhizophagus clarus* (UFSC 14).

Fonte de variação	GL	P mehlich I		P resina		K mehlich I		Ca disponível		Mg disponível	
		F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
<i>Bradyrhizobium</i> (Br)	1	3,10	0,082	0,74	0,391	22,09	<0,001	10,56	0,002	29,94	<0,001
<i>A. brasilense</i> (Az)	1	0,13	0,715	0,93	0,337	19,05	<0,001	1,58	0,212	0,15	0,699
FMA	2	0,55	0,581	0,72	0,489	17,40	<0,001	9,22	<0,001	7,21	0,001
Br * Az	1	0,17	0,684	0,63	0,430	0,01	0,933	0,25	0,615	0,85	0,360
Br * FMA	2	1,15	0,320	1,16	0,317	10,53	<0,001	0,75	0,475	8,61	<0,001
Az * FMA	2	0,81	0,449	0,11	0,896	6,43	0,002	2,43	0,093	1,67	0,193
Br * Az * FMA	2	0,65	0,524	0,23	0,796	1,49	0,230	6,70	0,002	0,46	0,631
Erro	96										
CV%		12,01		15,14		17,94		6,75		7,61	

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou a o potencial, e mesmo a necessidade, de se associarem microrganismos promotores de crescimento vegetal às plantas pioneiras para acelerar processos de recuperação ambiental de áreas degradadas pela mineração de carvão.

A inoculação e coinoculação dos microrganismos promotores de crescimento vegetal (*Bradyrhizobium* sp, *Azospirillum brasilense* e fungos micorrízicos arbusculares – FMA) promoveram aumentos na atividade enzimática do solo, com reflexos na disponibilização de nutrientes e aumentando o crescimento e acúmulo de nutrientes no tecido das plantas de *Crotalaria juncea*.

O isolado autóctone das áreas de mineração foi mais eficiente que o não autóctone. Isso reforça a importância de se realizar mais estudos a fim de isolar microrganismos com maior potencial para ser usado em áreas de recuperação ambiental. No entanto, ficou evidente que o uso de inoculantes comerciais é uma boa estratégia para acelerar os processos de recuperação ambiental de áreas degradadas. O ponto positivo é o fato de tais inoculantes serem facilmente adquiridos pelas empresas responsáveis pelo processo de recuperação ambiental, sem ser necessário desenvolver um processo de produção específico para cada local a ser recuperado.

Recomenda-se a realização de novos estudos avaliando o potencial de outros inoculantes disponíveis no mercado e que podem ser utilizados nesses processos de recuperação ambiental. Os microrganismos possuem um grande potencial para acelerar os processos de recuperação ambiental, assim como de reduzir a necessidade de fertilizantes químicos.

## 7 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES QUÍMICAS E ENZIMÁTICAS

### 7.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FÓSFORO (P) EM EXTRATOS (SOLO E PLANTA)

#### **Solução A:**

*Etapa 1:* Dissolver 20g de  $(\text{NH}_4^+)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  p.a em 200mL de água num béquer.

*Etapa 2:* Em outro béquer contendo 500 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , dissolver 1 g de carbonato (subcarbonato) de bismuto  $((\text{BiO})_2\text{CO}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O})$  e adicionar 139mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

*Etapa 3:* Esfriar, misturar as duas soluções em balão de 1000mL e completar o volume com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada.

#### **Solução de Trabalho (ST):**

Para a determinação de 250 amostras (incluindo curvas e branco), pesar 0,67g de ácido ascórbico e 83,33 mL da **Solução A** e completar o volume com 500 mL de água destilada. Se for determinar menos amostras pode-se fazer menos solução para não desperdiçar. Este reagente deve ser preparado na hora da utilização (SILVA, 2009).

#### **Processo de determinação:**

- a) 0,5mL de alíquota do extrato ou da curva (pode ser necessário diluir a amostra);
  - b) 2,0mL da **ST**;
  - c) Aguardar 30 min e proceder leitura em espectrofotômetro a 725nm.
- Utilizar os seguintes teores de P na curva padrão: 0; 0,4; 0,8; 1,2; 2,5; 5,0  $\text{mg L}^{-1}$
  - Se a leitura for efetuada em multileitora com placas, utilizar mais um ponto na curva com  $10\text{mg L}^{-1}$ . A distância óptica quando efetuado a leitura em microplaca, utilizando 200ul de amostra por poço, é aproximadamente metade da distância óptica da cubeta de 1cm.

#### **Referência bibliográfica**

Meneghetti, A.M. Manual de procedimentos de amostragem e análise química de plantas, solo e fertilizantes [Recurso eletrônico]. Curitiba: EDUTFPR, 2018. 252 p. E-book disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/>



## 7.2 DETERMINAÇÃO DA HIDRÓLISE DO DIACETATO DE FLUORESCÉINA (DAF)

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) indica a atividade de proteases, lípases e esterases do solo, que atuam sobre este substrato, liberando fluoresceína, que é uma substância com coloração verde-amarelada.

### Equipamentos

- ✓ Centrífuga
- ✓ Espectrofotômetro
- ✓ Mesa agitadora
- ✓ pHmetro
- ✓ Pipetas de 0,1-1 e de 1-10 ml

### Materiais

- ✓ Papel filtro
- ✓ Tubos de 50 ml tipo Falcon
- ✓ Suporte para Tubos de 50 ml
- ✓ Ponteiras de 1 e de 10 ml

### Soluções

- Solução Tampão fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  60mM, pH 7,6): Dissolver 22,74g de fosfato de sódio em 800 ml de água. Ajustar o pH para 7,6 com ácido clorídrico (1N). Completar para 1000 ml.
- Solução de diacetato de fluoresceína (Sigma F-7378) (4,8 mM): Dissolver 0,5 g de diacetato de fluoresceína em 250 mL de Acetona. Fracionar em tubos de 10 ml e armazenar a  $-20^\circ\text{C}$  (Ir tirando a medida que for usando).
- Solução padrão de fluoresceína sódica (2,6 mM): Dissolver 0,5 g de fluoresceína sódica (Sigma F6377) em 500 mL de Acetona.
- Acetona

Preparação da curva padrão:

A quantidade de fluoresceína liberada após a hidrólise é calculada por interpolação em uma curva padrão preparada com as seguintes concentrações: 2,5 – 5,0 – 7,5 – 10,0 e 12,5  $\mu\text{g}$  de fluoresceína/mL.

A solução padrão da curva (SPC) é obtida pipetando 5,0 mL da solução padrão de fluoresceína sódica em um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com acetona e homogeneizando bem a solução. Após, para realizar a curva, procede-se conforme tabela abaixo.

Ponto Curva	Para montar os respectivos pontos da curva de Fluoresceína			
	SPC (mL)	Solução tampão	Acetona	Volume total
0	0	2,0	2,0	4,0
2,5	0,1	2,0	1,9	4,0
5,0	0,2	2,0	1,8	4,0
7,5	0,3	2,0	1,7	4,0
10,0	0,4	2,0	1,6	4,0
12,5	0,5	2,0	1,5	4,0

Se a intensidade da cor do filtrado exceder os 12,5  $\mu\text{g}$  de fluoresceína, uma alíquota do filtrado deve ser diluída com solução tampão até que fique dentro dos limites da curva padrão.

### Cálculo:

Fluoresceína (F) ( $\mu\text{g}$  de F g solo  $\text{seco}^{-1} \text{h}^{-1}$ )

$$= ((A - C) \div a) * V \div (PSU * PSS * t)$$

Onde:

a = Coeficiente da equação com intersecção em zero

A = Média da Absorbância da amostra

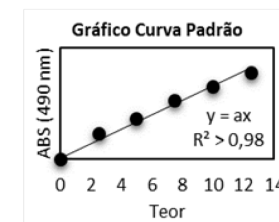
C = Média da Absorbância do controle

V = Volume total do líquido no Falcon (40 mL)

PSU = Peso de solo usado na análise (1 g)

PSS = Peso seco (em g) de 1 g de solo

t = Tempo de incubação em horas (2 horas)



### Procedimento para as Amostras:

As análises devem ser feitas em duplicata (duas análises por amostra).

1. Pesar 1g de solo úmido em tubo Falcon de 50 ml



2. Adicionar 20 mL de tampão fosfato e agitar por 15 min.



3. Adicionar 0,1 mL de solução de diacetato de fluoresceína (4,8mM), agitar por 2h a 25 °C.



4. Adicionar 20 mL de acetona e misturar para interromper a reação. Manipular em capela ou com máscara para gases.



5. Centrifugar a 4000 rpm por 2 minutos e filtrar o sobrenadante com papel filtro.



6. Medir absorbância em espectrofotômetro a 490 nm

### Procedimento para o Controle:

Preparar uma amostra controle para cada amostra de solo.

1. Pesar 1g de solo úmido em tubo Falcon de 50 ml



2. Adicionar 20 mL de tampão fosfato e agitar por 15 min.



3. Agitar por 2h a 25 °C.  
“Não colocar diacetato de fluoresceína”



4. Adicionar 20 mL de acetona e misturar. Seguidamente adicionar 0,1 mL de solução de diacetato de fluoresceína (4,8mM).



5. Centrifugar a 4000 rpm por 2 minutos e filtrar o sobrenadante com papel filtro.



6. Medir absorbância em espectrofotômetro a 490 nm

### 7.3 DETERMINAÇÃO ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA NO SOLO

A fosfatase participa do ciclo do fósforo, promovendo a liberação do P na forma iônica ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ), que é utilizado pelas plantas e microrganismos. Ela catalisa a hidrólise dos ésteres de fosfato e é capaz de agir sobre grande número de substratos. A mensuração da atividade da fosfatase é baseada na leitura em espectrofotômetro do *p* – nitrofenol resultante da atividade enzimática da fosfatase ácida.

#### Equipamentos

- ✓ Centrífuga
- ✓ Espectrofotômetro
- ✓ Mesa agitadora
- ✓ pHmetro
- ✓ Pipetas de 0,1-1 e de 1-10 ml

#### Materiais

- ✓ Papel filtro
- ✓ Tubos de 50 ml tipo Falcon
- ✓ Suporte para Tubos de 50 ml
- ✓ Ponteiras de 1 e de 10 ml

#### Soluções

- Tampão universal (MUB), solução estoque: dissolver 12,1 g tris (hidroximetil aminometano THAM); 11,6 g de ácido maleico; 14 g de ácido cítrico e 6,3 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  em 488 mL de NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e diluir a solução para 1000 mL com água destilada. Armazenar a solução em geladeira a  $4^\circ\text{C}$ .
- Tampão universal (MUB), pH 6,5: pipetar 200 mL da solução estoque MUB em um beaker de 500 mL e titular a solução com HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) até atingir pH 6,5. Transferir para um balão volumétrico 1000 mL e completar o volume com água destilada.
- Solução PNP (*p*-nitrofenil- fosfato  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 0,840 g de PNP em 40 mL de MUB (pH 6,5), após a dissolução, completar a solução para 50 mL com MUB (pH 6,5). Estocar a solução em geladeira.

- $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 73,5 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 700 mL de água destilada, completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ): dissolver 20 g de NaOH em 700 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
- Solução padrão de PNF (*p*-nitrofenol): dissolver 0,1 g de *p*-nitrofenol em 70 mL de água destilada e completar a solução para 100 mL com água destilada. Armazenar a solução em frasco escuro e em geladeira.

#### Preparação da curva padrão:

A quantidade de PNF liberado após a hidrólise é calculada por interpolação em uma curva padrão preparada com as seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3, 4 e 5  $\mu\text{g}$  de PNF/mL.

Para realizar a curva, procede-se conforme tabela abaixo. A solução padrão da curva (SPC) é obtida pipetando 1,0 mL da solução padrão de PNF em um balão volumétrico de 100 mL, completando com água destilada.

Ponto Curva	Para montar os respectivos pontos da curva de PNF				
	SPC (mL)	Água destilada	$\text{CaCl}_2$ ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ )	NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ )	Total (mL)
0	0	5,0	2,0	4,0	10,0
1,0	1	4,0	1,9	4,0	10,0
2,0	2	3,0	1,8	4,0	10,0
3,0	3	2,0	1,7	4,0	10,0
4,0	4	1,0	1,6	4,0	10,0
5,0	5	0,0	1,5	4,0	10,0

Se a intensidade da cor do filtrado exceder os 5,0  $\mu\text{g}$  de PNF, uma alíquota do filtrado deve ser diluída com água destilada até que fique dentro dos limites da curva padrão.

**Cálculo:** Seguir os mesmos passos da metodologia da DAF

- $\mu\text{g}$  de PNF g solo  $\text{seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$

### Procedimento para as Amostras:

As análises devem ser feitas em duplicata (duas análises por amostra).

1. Pesar 1g de solo úmido em tubo Falcon de 15 ml



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de MUB (pH 6,5) e 1,0 mL de solução PNP, agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo.



3. Fechar o frasco e incubar em banho Maria por 1 hora a 37°C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  e 4,0 mL de NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), agitar por alguns segundos até misturar.



5. Centrifugar a 4000 rpm por 2 minutos e filtrar o sobrenadante com papel filtro.



6. Medir absorbância em espectrofotômetro a 410 nm

### Procedimento para o Controle:

Preparar uma amostra controle para cada amostra de solo.

1. Pesar 1g de solo úmido em tubo Falcon de 15 ml



2. Adicionar 0,25 mL de tolueno, 4 mL de MUB (pH 6,5), agitar o frasco por alguns segundos até misturar o conteúdo. Atenção: não adicionar a solução PNP.



3. Fechar o frasco e incubar em banho Maria por 1 hora a 37°C



4. Adicionar 1,0 mL de solução  $\text{CaCl}_2$  e 4,0 mL de NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), agitar por alguns segundos até misturar. Adicionar 1,0 mL de solução PNP e misturar novamente



5. Centrifugar a 4000 rpm por 2 minutos e filtrar o sobrenadante com papel filtro.



6. Medir absorbância em espectrofotômetro a 410 nm.

