

Marcos Leandro dos Santos

MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE
FITOPROTEÇÃO EM ESPÉCIES NATIVAS ASSOCIADAS A
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS
CONTAMINADOS

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do Grau
de **Doutor em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Emílio
Lovato

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio
Roberto Fonsêca Sousa Soares

Florianópolis
2018

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

Santos, Marcos Leandro dos
MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE
FITOPROTEÇÃO EM ESPÉCIES NATIVAS ASSOCIADAS A FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS CONTAMINADOS /
Marcos Leandro dos Santos ; orientador, Paulo Emilio
Lovato, coorientador, Cláudio Roberto Fonsêca
Sousa Santos, 2018.
93 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Enterolobium
contortisiliquum. 3. Parapiptadenia rigida. 4.
microrganismos do solo. 5. estresse metálico. I.
Lovato, Paulo Emilio . II. Santos, Cláudio Roberto
Fonsêca Sousa . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. IV. Título.

Marcos Leandro dos Santos

MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE
FITOPROTEÇÃO EM ESPÉCIES NATIVAS ASSOCIADAS A
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS
CONTAMINADOS

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor e
aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais

Florianópolis, 29 de janeiro de 2018.

Prof. Paulo Emílio Lovato
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof. Paulo Emílio Lovato
Orientador

Prof.^a Edilane Rocha-Nicoleite, Dr.^a
UNESC-SC

Prof.^a Rosete Pescador, Dr.^a
FTT-CCA-UFSC

Prof. Cledimar Rogério Lourenzi, Dr.
ENR-CCA-UFSC

Este trabalho é dedicado aos meus pais,
pelos quais tenho profundo orgulho,
carinho e respeito.

José Carlos dos Santos
Eva Maria Natalícia dos Santos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Eva, aos quais dedico este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Ao Professor Paulo E. Lovato, pela orientação, oportunidade, dedicação e ensinamentos durante todo o curso de Doutorado.

Ao Professor Cláudio R. F. S. Soares, pela co-orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Professor Sidney L. Stürmer pela colaboração neste e demais trabalhos do grupo de Microbiologia do Solo da UFSC.

Aos Professores Jucinei, Arcângelo e Cledimar pelo apoio e disponibilidade em ensinar e colaborar com o trabalho.

Aos Professores Cledimar R. Lourenzi, Rosete Pescador e Edilane Rocha-Nicoleite pela participação da banca de defesa e pelas contribuições no trabalho.

Aos demais Professores do PPG em Recursos Genéticos Vegetais pelos auxílios e ensinamentos durante o curso.

Ao Ângelo e a Camila pela paciência, ensinamentos e colaboração fundamental nas análises.

A Eduarda e Tamires, alunas do Curso de Agronomia engajadas em aprender e a colaborar muito na condução dos experimentos.

Aos colegas do PPG e do Laboratório de Microbiologia do Solo: Alceu, Vanessa, Kelly, Marcelo, Edenilson, Bárbara e Anna, que não mediram esforços em ajudar e trocar ideias sempre que necessário.

Aos colegas do PPG da turma 2014.1, em especial a Marcia Faita, pela amizade e troca de energias necessárias para seguir em frente.

A todos os colegas do Laboratório de Análises de Solos, sempre dispostos a somar e a trocar ideias.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo do Centro de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), que contribuíram para o desenvolvimento dos estudos.

A todos os colegas e amigos que contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

Ao CNPq e a FAPESC pelo apoio financeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADO A TODOS.

“Sejamos incontroláveis, então...e que a gente não desista porque ninguém acredita”
Machado de Assis

MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE FITOPROTEÇÃO EM ESPÉCIES NATIVAS ASSOCIADAS A FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM SOLOS CONTAMINADOS

RESUMO

A exploração de carvão no sul do Brasil levou à eliminação da vegetação nativa, à desestruturação do perfil natural do solo e à contaminação por metais pesados, sem ter havido devida mitigação do impacto ambiental. Essas condições edáficas dificultam a resiliência desses ambientes, sendo necessárias pesquisas embasando intervenções técnicas que acelerem o processo de recuperação. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) são microrganismos, presentes nesses locais, reconhecidos por melhorar o estado nutricional das plantas, principalmente em solos com baixa fertilidade. A presente pesquisa avaliou quais benefícios a inoculação com FMAs e BFN traz para remediação desses solos e para a fitoproteção por espécies arbóreas nativas, com o objetivo de melhorar o crescimento das plantas e remediar o solo contaminado pela mineração. Foram conduzidos três estudos em substrato contendo solo e rejeito coletados em área de mineração de carvão em Criciúma, Santa Catarina. No primeiro ensaio foram cultivadas mudas de timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) em substrato sem e com 30% de rejeito de mineração, inoculadas com *Rhizophagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*. Avaliaram-se crescimento, qualidade de mudas, estado nutricional, colonização micorrízica, glomalina, clorofilas e teores de Cu, Zn e Mn na parte aérea e raízes. A timbaúva tolerou a presença de rejeito no substrato e a inoculação de timbaúva com *R. clarus* mostrou potencial para fitoextração de Cu e Zn, enquanto a inoculação com *A. colombiana* reduziu a translocação desses elementos da raiz para a parte aérea, sendo recomendado para a fitoestabilização desses metais no solo. No segundo experimento, buscou-se avaliar o potencial de fitoremediação por angico (*Parapiptadenia rigida*) cultivado em substrato sem e com 30% de rejeito de mineração, inoculado com *R. clarus* ou *A. colombiana*. Avaliaram-se as variáveis descritas no experimento anterior, além da eficiência na remediação e o fator de bioacumulação de metais pesados. O angico tolerou solo contendo rejeito de mineração de carvão e a inoculação com *R. clarus* ou *A. colombiana* promoveu maior acúmulo de Zn e Mn, e há maior acúmulo e eficiência

na remediação de Cu em plantas inoculadas com *R. Clarus*. A partir dos resultados destes experimentos foram levantadas as hipóteses para o terceiro trabalho, cujo objetivo principal foi entender os mecanismos fisiológicos de fitoproteção ao estresse em plantas de timbaúva inoculada com FMAs e BFN. O experimento fatorial 4 x 4 foi conduzido em câmara de crescimento em substrato contendo 0, 15, 30 e 60% de rejeito, com os tratamentos controle (não inoculado), inoculado com FMAs (*R. clarus* + *A. colombiana*), BFN (*Bradyrhizobium elkanii*) e FMAs+BFN. A adição de rejeito e a inoculação de *R. clarus* + *A. colombiana* e/ou BFN aumentou o crescimento das mudas e promoveu aumento dos teores de proteínas solúveis totais e atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase. Os FMAs aumentam a concentração das fitoquelatinas 3 e 4 complexando principalmente o Zn e Mn nas raízes, o que pode contribuir para reduzir a translocação e a toxidez das mudas. Conclui-se que a inoculação de *E. contortisiliquum* e *P. rigida* com FMAs e BFN aumentam a tolerância dessas espécies arbóreas nativas a metais por desencadear mecanismos fisiológicos que reduzem o estresse. Isso evidencia o potencial de utilização desses microrganismos em programas de fitorremediação e revegetação de solos degradados pela mineração de carvão.

Palavras-chave: *Enterolobium contortisiliquum*, *Parapiptadenia rigida*, microrganismos do solo, estresse metálico.

ABSTRACT

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MECHANISMS OF PHYTOPROTECTION IN NATIVE SPECIES ASSOCIATED TO ARBUSCULAR MYCORRHYZAL FUNGI IN SOILS CONTAMINATED

ABSTRACT

Coal mining in southern Brazil led to losses in native vegetation, soil structure degradation, and contamination with trace elements, including heavy metals, without mitigation of its environmental impacts. Those soil conditions hamper resilience of former mining areas, and research is needed to support technical interventions aiming to accelerate recovery processes. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and nitrogen-fixing bacteria (NFB) are present in such sites and may help to improve plant nutrition. The present study evaluated the benefits of AMF and NFB inoculation of native tree species for remediation of these soils and for phytoprotection, aiming to improve plant growth and remediation of soil degraded by coal mining. Three experiments were carried out with soil added with tailings collected in a coal mining area in Criciúma, Southern Brazil. In the first essay, *Enterolobium contortisiliquum* seedlings were grown in substrate without and with 30% of tailings inoculated with *Rhizophagus clarus* or *Acaulospora colombiana*. Growth, seed quality, nutritional status, mycorrhizal colonization, glomalin, chlorophylls, and shoot and root Cu, Zn and Mn contents were evaluated. *E. contortisiliquum* tolerated tailing addition and inoculation with *R. clarus* enhanced Cu and Zn phytoextraction, while *A. colombiana* reduced translocation of those elements from roots to shoots, showing potential for phytostabilization of those metals in the soil. In the second experiment, with the aim of evaluating the phytoremediation potential of *P. rigida* grown in substrate without and with mining tailings, measured the variables described in the first experiment, as well as remediation efficiency and bioaccumulation factor of heavy metals. *P. rigida* grew in soil containing coal mining tailings, and inoculation with *R. clarus* or *A. colombiana* led to higher Zn and Mn accumulation. There was greater plant Cu accumulation and Cu remediation efficiency in plants inoculated with *R. clarus*. The third experiment aimed to identify physiological mechanisms of stress alleviation in *E. contortisiliquum* inoculated with AMF and NFB. A 4 x 4 factorial experiment was carried out in soil containing 0, 15, 30 and 60% of tailing, the other factor being inoculation

with AMFs (*R. clarus* + *A. colombiana*), NFB (*Bradyrhizobium elkanii*), or AMFs + NFB, and a control (non-inoculated) treatment. Tailing addition and inoculation with AMF and/or NFB increased seedling growth. That was linked to an increase total soluble proteins and catalase, superoxide dismutase, and glutathione reductase activities. The increased enzyme activity reduced stress in leaves due to Cu translocation. AMF increased phytochelatin (PC3 and PC4) concentration. Zn and Mn complexation in roots may have contributed to reduce metal translocation and toxicity in seedlings. In conclusion, inoculation of *E. contortisiliquum* and *P. rigida* with AMF and NFB increase tolerance to trace elements by inducing physiological mechanisms that alleviate stress in those native tree species. Combination of those plant species with microbial inoculation showed potential for use in phytoremediation and revegetation programs in areas under soils degraded by coal mining.

Keywords: *Enterolobium contortisiliquum*, *Parapiptadenia rigida*, soil microorganisms, metal stress.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA	3
Figura 1. Depósito de rejeitos de mineração de carvão (A), drenagem ácida de mina (DAM) (B) e do curso d'água contaminado pela DAM (C).....	4
Figura 2. Perfil de solo (A) e da paisagem (B) em uma área com o solo construído.....	7
Figura 3. Frutos e folhas (A), sementes (B) e árvore adulta de timbaúva (C).....	11
Figura 4. Frutos e folhas (A), sementes (B) e árvore adulta de angico vermelho (C).....	12
Figura 5. Mecanismos de proteção desencadeados pelos FMAs em plantas cultivadas em solos contaminados por metais pesados.....	20
CAPÍTULO II - FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA EFICIÊNCIA DA REMEDIAÇÃO POR <i>Parapiptadenia rigida</i> EM SOLO COM REJEITO DE MINERAÇÃO DE CARVÃO	
Figura 1. Colonização micorrízica (A), glomalina total (B) e peso de nódulos secos (D) em mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com <i>Rhizophagus clarus</i> ou <i>Acaulospora colombiana</i>	36
Figura 2. Altura (A), diâmetro do caule (B), massa seca da parte aérea - MSPA (C), massa seca da raiz – MSR (D), massa seca total – MST (E) e Índice de qualidade de Dickson (F) de mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com <i>Rhizophagus clarus</i> ou <i>Acaulospora colombiana</i>	38
Figura 3. Acúmulo de Cu na massa seca da parte aérea - MSPA (A), Cu na massa seca da raiz - MSR (B), Zn na MSPA (C), Zn na MSR (D), Mn na MSPA (E) e Mn na MSR (F) de mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com <i>Rhizophagus clarus</i> ou <i>Acaulospora colombiana</i>	41
Figura 4. Acúmulo de P na massa seca da parte aérea de mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com <i>Rhizophagus clarus</i> ou <i>Acaulospora colombiana</i>	43
Figura 5. Eficiência na remediação do Cu (A), bioacumulação de Cu (B), eficiência da remediação do Zn (C), bioacumulação do Zn (D), eficiência na remediação de Mn (E) e bioacumulação de Mn (F) em mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com <i>Rhizophagus clarus</i> ou <i>Acaulospora colombiana</i>	45
CAPÍTULO III - MECANISMOS DE FITOPROTEÇÃO LIGADOS A MICORRÍZAS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM <i>E. contortisiliquum</i> EM SOLO CONTAMINADO	
Figura 1. Massa seca da parte aérea (A) e massa seca da raiz (B) de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (<i>R. clarus</i> + <i>A. colombiana</i>) ou BFN (<i>B. elkanii</i>) ou FMA+BFN.....	61
Figura 2. Colonização micorrízica (A) e peso seco de nódulos (B) em raízes de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (<i>R. clarus</i> + <i>A. colombiana</i>) e BFN (<i>B. elkanii</i>) ou FMA+BFN.....	61

Figura 3. Acúmulo de fósforo (A) e nitrogênio (B) na parte aérea de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.....62

Figura 4. Cu na massa seca na parte aérea - MSPA (A), Cu na massa seca da raiz - MSR (B), Zn na MSPA (C), Zn na MSR (D), Mn na MSPA (E) e na Mn na MSR (F) em timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.....64

Figura 5. Proteínas solúveis totais nas folhas (A), H₂O₂ nas folhas (B), CAT – catalase (C), SOD – superóxido dismutase (D) e GR – glutatona redutase (GR) na parte aérea de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.....67

Figura 6. Fitoquelatina (PC) - PC2 na folha (A), PC2 na raiz (B), PC3 na folha (C), PC3 na raiz (D), PC4 na folha (E) e PC4 na raiz (F) de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.....69

ANEXOS

Figura 1. Vista geral dos experimentos (A), estudo com o angico (B e C) e com a timbaúva (D e E), conduzidos casa de vegetação, em substrato sem ou com rejeito de mineração de carvão (-Rej. ou +Rej.), não inoculada (Ni), inoculada com *A. colombiana* (Ac) ou inoculada com *R. clarus* (Rc).....92

Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de raízes de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (Ni), inoculada com BFN (*B. elkanii*) ou FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) ou BFN + FMAs.....93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA EFICIÊNCIA DA REMEDIAÇÃO POR *Parapiptadenia rigida* EM SOLO COM REJEITO DE MINERAÇÃO DE CARVÃO

Tabela 1. Frações granulométricas e atributos químicos de solo sem (-rejeito) e com adição de rejeito de mineração de carvão (+rejeito), 30 dias após a adubação fosfatada e esterelizado em autoclave.....35

Tabela 2. Índice SPAD, clorofila (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl Total), e carotenóides (Carot.) em mudas de angico cultivadas em casa de vegetação, em solo com ou sem rejeito de mineração de carvão, e não inoculado ou inoculado com *Rhizophagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*.....40

CAPÍTULO III - MECANISMOS DE FITOPROTEÇÃO LIGADOS A MICORRÍZAS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM *E. contortisiliquum* EM SOLO CONTAMINADO

Tabela 1. Distribuição granulométrica e atributos químicos do substrato com 0; 15; 30 e 60% de rejeito de mineração de carvão, 24 horas após a fertilização de 150 mg kg⁻¹ de P (como superfosfato triplo) e esterilização em autoclave.....60

Tabela 2. Índice de translocação de Cu, Zn e Mn em mudas de timbaúva cultivadas em casa de vegetação, com ou sem inoculação de FMAs e BFN, em substrato com 0; 15; 30 e 60% de rejeito de mineração de carvão.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFN – Bactéria fixadora de nitrogênio
CAT – Catalase
°C – Graus Celcius
Carot. – Carotenoides
Chl a – Clorofila a
Chl b – Clorofila b
Chl total – Clorofila total
COT – Carbono orgânico total
cm – Centímetro
Cu – Cobre
CV% - Coeficiente de variação
DAM – Drenagem ácida de mina
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ER – Eficiência na remediação
FB – Fator de bioacumulação
FEPAGRO – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
FMA – Fungo micorrízico arbuscular
g – Gramas
GR – Glutathione redutase
h – Hora
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IQD – Índice de qualidade de Dickson
kg – Quilograma
km – Quilômetro
L – Litro
m – Metro
MF – massa fresca
min – minutos
mL – Mililitro
Mn – Manganês
mg – Miligrama
Ni – Não inoculado
nm – Nanômetro
µmol – Micromol
µg – Micrograma
O₂⁻ - Radical superóxido
OH⁻ - Radical hidroxila

PCs - Fitoquelatinas
PCS – Fitoquelatina sintase
PME – Programa de mobilização energética
RNA – Ácido ribonucleico
EROs – Espécies reativas de oxigênio
SOD – Superóxido dismutase
SPAD – Soil Plant Analysis Development
v:v – Relação volume:volume
- R - Sem rejeito
+ R – Com rejeito
Zn – Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.2	O IMPACTO DE ÁREAS DEGRADADAS NO BIOMA MATA ATLÂNTICA.....	5
2.3	LIMITAÇÕES DO SOLO PARA O CRESCIMENTO DAS PLANTAS.....	6
2.4	FITORREMEDIAÇÃO COMO TÉCNICA PARA A RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS.....	9
2.5	USO DE ESPÉCIES FLORESTAIS EM SOLOS CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS.....	10
2.6	MICROORGANISMOS SIMBIONTES EM SOLOS CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS.....	12
2.7	ASSOCIAÇÃO PLANTA-MICROORGANISMOS EM SOLOS CONTAMINADOS.....	14
2.8	MECANISMOS DE FITOPROTEÇÃO A METAIS PESADOS EM PLANTAS INOCULADAS.....	15
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	HIPÓTESES.....	22
5	DESENVOLVIMENTO.....	25
5.1	CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS EXPERIMENTOS.....	25
5.2	DEFINIÇÃO DA DOSE DE REJEITO A SER UTILIZADA.....	25
6	CAPÍTULO I - EFEITO FITOPROTETOR DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM <i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong EM SOLO CONTENDO REJEITO DE MINERAÇÃO DE CARVÃO.....	27
7	CAPÍTULO II - FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA EFICIÊNCIA DA REMEDIAÇÃO POR <i>Parapiptadenia rigida</i> EM SOLO COM REJEITO DE MINERAÇÃO DE CARVÃO.....	29
7.1	INTRODUÇÃO.....	31
7.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
7.2.1	Desenho experimental.....	32
7.2.2	Coleta e caracterização dos substratos.....	32
7.2.3	Inóculos micorrízicos e sementes.....	32
7.2.4	Semeadura e condições de crescimento.....	33
7.2.5	Variáveis quantificadas.....	33
7.2.6	Análises estatísticas.....	34
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
7.3.1	Caracterização dos substratos.....	35
7.3.2	Colonização micorrízica e glomalina total.....	36
7.3.3	Crecimento de plantas e qualidade de mudas.....	37
7.3.4	Índice SPAD, clorofilas e carotenóides.....	39
7.3.5	Acúmulo de Cu, Zn e Mn na parte aérea e raiz.....	40
7.3.6	Acúmulo de fósforo.....	42
7.3.7	Eficiência na remediação e fator de bioacumulação.....	43
7.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
8	CAPÍTULO III - MECANISMOS DE FITOPROTEÇÃO LIGADOS A MICORRÍZAS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM <i>E. contortisiliquum</i> EM SOLO CONTAMINADO.....	52
9.1	INTRODUÇÃO.....	54
9.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	55

9.2.1	Desenho experimental.....	55
9.2.2	Substratos utilizados.....	56
9.2.3	Material biológico.....	56
9.2.4	Semeadura e crescimento.....	56
9.2.5	Coleta das plantas.....	57
9.2.6	Nódulos e colonização micorrízica.....	57
9.2.7	Nutrientes e metais no tecido.....	57
9.2.8	Proteínas totais e estresse oxidativo nas folhas.....	58
9.2.9	Fitoquelatinas.....	59
9.2.10	Análises estatísticas.....	59
9.3	RESULTADOS.....	59
9.3.1	Caracterização dos substratos.....	59
9.3.2	Crescimento.....	60
9.3.3	Colonização micorrízica e nodulação.....	61
9.3.4	Acúmulo de fósforo e nitrogênio nas plantas.....	62
9.3.5	Teores de metais pesados nos tecidos.....	63
9.3.6	H₂O₂, proteínas e enzimas antioxidantes.....	66
9.3.7	Fitoquelatinas.....	68
9.4	DISCUSSÃO.....	70
9.5	CONCLUSÕES.....	73
9.6	REFERÊNCIAS.....	74
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
11	REFERÊNCIAS CONSULTADAS.....	81
12	ANEXOS.....	92
12.1	ESTUDO I E II CONDUZIDOS NA CASA DE VEGETAÇÃO.....	92
12.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NAS RAÍZES DAS MUDAS DO ESTUDO III.....	93

1 INTRODUÇÃO

A descoberta do carvão mineral no Brasil ocorreu em 1827 em Lauro Müller, Santa Catarina. A partir da Primeira Guerra Mundial, o carvão nacional teve seu primeiro surto de exploração, época em que foram ampliados os ramais ferroviários e inauguradas novas empresas de mineração. Em 1946, no governo de Getúlio Vargas, foi construída a Companhia Siderúrgica Nacional, o que deu um impulso ao setor. Com a crise do Petróleo na década de 70, foi dado um novo impulso para o consumo do carvão nacional, pois foi criado o Programa de Mobilização Energética - PME, visando conhecer mais detalhadamente as reservas de carvão nacional e incentivar as atividades de lavra para extração e uso desse combustível.

As atividades de lavra para extração do carvão, tanto a céu aberto quanto subterrânea, foram desenvolvidas sem planejamento adequado e sem observar os padrões de recuperação necessários para manter a qualidade do meio ambiente. Por isso, diversos impactos negativos foram gerados ao ambiente, devido às atividades de lavra e a grande quantidade de rejeitos que foram depositados indiscriminadamente nestas áreas, processos que resultam na eliminação total da vegetação e na contaminação do solo local (SILVA et al., 2013). Isso é ainda mais preocupante por estas áreas de exploração de carvão do estado de Santa Catarina estarem situadas no perímetro do bioma Mata Atlântica, conhecido por ser um dos 25 *hotspots* de diversidade de espécies do planeta (MYERS et al., 2000).

Atualmente existem leis ambientais que obrigam as empresas mineradoras de carvão a recuperarem as áreas degradadas pela sua atividade (ACP do carvão, 2013). A recuperação tem sido feita através da retirada dos rejeitos e com a implantação de espécies vegetais tolerantes a estes ambientes degradados, visando reconstituir a paisagem e evitar os processos erosivos do solo. No projeto técnico de recuperação, quando for proposta a implantação direta de espécies vegetais, seja por mudas, sementes ou outras formas de propágulo em áreas legalmente protegidas, deverão ser utilizadas espécies nativas da região em que estará inserido o projeto de recuperação.

A timbaúva e o angico são leguminosas arbóreas nativas do Brasil. Apesar de estas plantas apresentarem tolerância a alguns metais pesados (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2015), pouco se sabe sobre seu crescimento em solos contendo rejeitos de mineração. Também pouco é conhecido sobre como a presença destes materiais sulfetados pode afetar

a simbiose com os microrganismos do solo, desenvolvimento e fisiologia destas plantas, visando à recuperação das áreas degradadas.

Dentre os microrganismos do solo que podem colonizar as raízes das plantas e viver em mutualismo estão os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN). Diversas espécies de FMAs e BFN foram identificadas em áreas de mineração de carvão (STÜRMER E SIQUEIRA, 2008). Isso é relevante porque estes microrganismos possuem potencial de melhorar o aspecto nutricional e fisiológico das plantas (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006; SMITH E READ, 2008; FERREIRA et al., 2015; DOUBKOVÁ E SUDOVÁ, 2016) e por isso aumentar sua tolerância e sobrevivência das mesmas em solos fortemente impactados pela mineração. As simbioses entre plantas e FMAs não são específicas; a resposta pode variar entre as espécies de plantas e fungos e vai depender das condições ambientais e do tempo de coevolução das espécies (ZHIPENG et al. 2016).

Este trabalho visa contribuir para o avanço nos conhecimentos sobre a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão. É preconizado o uso de recursos florestais nativos associados ou não a FMAs e BFN para a recuperação e possível início de processos de restauração ecológica destas áreas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARVÃO MINERAL E A DEGRADAÇÃO AMBIENTAL

O carvão mineral é um combustível fóssil formado a partir da matéria orgânica de vegetais depositados em bacias sedimentares. Sua formação teve início no Período Carbonífero, na era Paleozoica, quando imensas formações vegetais de ambientes anaeróbicos, como pântanos, deltas e estuários de rios e alguns lagos, foram soterradas em camadas horizontais (BORBA, 2001).

Mundialmente, o carvão fornece 30% da necessidade de energia primária, ficando apenas atrás do petróleo (BP, 2014). Entretanto, esse mineral é responsável pela geração de 30 a 40% da energia elétrica no mundo (WEC, 2013). No Brasil, considerando a equivalência energética, o carvão mineral representa 64% dos recursos não renováveis para geração de energia. Deste total, 26% do carvão é destinado à geração de energia elétrica, enquanto 49% estão destinados ao processamento em coquearias (EPE, 2015).

Se comparadas às reservas continentais, a maior concentração de carvão encontra-se na Europa, incluindo a Rússia, que possui 17,6% do carvão mundial. No entanto, em se tratando de país, os EUA lideram com 26,6% das reservas de carvão do mundo. Na América do Sul, a Colômbia (0,8%), juntamente com o Brasil (0,7%) apresentam as maiores reservas deste combustível fóssil (BP, 2016). Considerando a relação reserva/produção de carvão, a América do Sul tem reservas para suprir o consumo durante 150 anos (BP, 2016).

O Brasil possui 23,6 bilhões de toneladas de carvão mineral. Estas reservas estão situadas majoritariamente no Rio Grande do Sul (90,6% = 21,4 bilhões de toneladas), Santa Catarina (9,3% = 2,2 bilhões de toneladas) e há menores quantidades distribuídas nos estados do Paraná, São Paulo e Maranhão (0,04% = 94,7 milhões de toneladas) (DNPM, 2010). A Bacia Carbonífera de Santa Catarina, com aproximadamente 100 km de comprimento e 20 km de largura, está situada no sentido Norte-Sul, entre a Serra Geral, a Oeste, e o maciço granítico da Serra do Mar, a Leste (KREBS, 2005).

Em Santa Catarina, os processos de lavra ao longo dos anos não foram previamente planejados, visando minimizar os impactos ou reconstituir a paisagem e a biodiversidade local após a mineração. Dependendo da profundidade da camada carbonífera a extração é feita a céu aberto ou subterrânea (ROCHA-NICOLEITE et al., 2013). A lavra a céu aberto é realizada quando a camada carbonífera se encontra a menos de 30 m de

profundidade, e envolve a retirada da camada superficial, contendo maiores teores de matéria orgânica, nutrientes, atividade microbiana e o banco de sementes. Essa camada é composta por rochas removidas para acesso às camadas de carvão mineral, chamado de “estéril” que pode conter rejeito e atingir até 20 m de altura (KOPPE E COSTA, 2008), processo conhecido como inversão das camadas do solo (ROCHA-NICOLEITE et al., 2013). Esse cenário comprometeu o potencial de resiliência dos ambientes degradados por este tipo de lavra, e por isso se necessita nesses casos de medidas e técnicas que aceleram os processos de recuperação (RODRIGUES et al., 2007; ALVES et al., 2012).

Quando a camada carbonífera se encontra a mais de 30 m de profundidade a exploração é realizada por lavra subterrânea, através de galerias (ROCHA-NICOLEITE et al., 2013). Apesar desse tipo de extração gerar menos estéreis, a quantidade de rejeito produzida e depositada na superfície é maior (Figura 1A).

O carvão mineral brasileiro contém altos teores de impurezas, como cinzas e enxofre. Por essa razão cerca de 60-70% do material extraído torna-se rejeito e é depositado próximo às áreas de extração (AMARAL-FILHO et al., 2013). Estima-se que existam aproximadamente 300 milhões de toneladas de rejeitos de carvão na região sul do país. Esses minerais sulfetados, quando expostos a oxigênio e a umidade, oxidam-se facilmente e geram, entre outros produtos, o ácido sulfúrico, sendo este um componente da chamada drenagem ácida de mina (DAM) (Figura 1B) (CAMPOS et al., 2010). A DAM contém grande quantidade de sólidos em suspensão e elevado conteúdo de metais pesados dissolvidos, dentre os quais destacam-se o Al, Mn, Zn, Fe, Cu e Pb (SILVA et al., 2013).

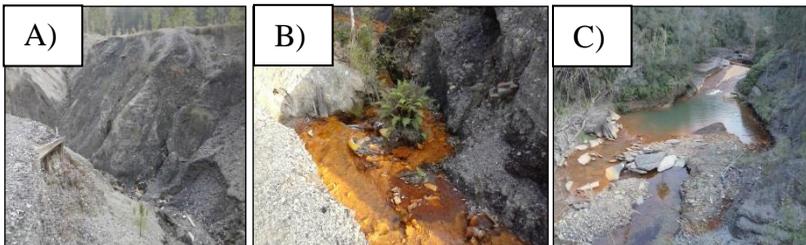


Figura 1. Depósito de rejeitos de mineração de carvão (A), drenagem ácida de mina (DAM) (B) e do curso d'água contaminado pela DAM (C).
Fonte: Arquivo do autor.

Em altas concentrações, esses elementos podem estar presentes na solução do solo e são suscetíveis à lixiviação, o que gera alto risco de

contaminação do solo e dos mananciais hídricos (Figura 1C). Isso cria um grave problema social e ambiental nas regiões carboníferas, como relatado por Silva et al. (2013) sobre a contaminação por metais pesados no Rio Tubarão - SC.

As particularidades e fragilidades ambientais citadas anteriormente impossibilitam que essas áreas retornem por uma trajetória natural a um ecossistema que se assemelhe ao estado inicial, podendo então ser considerada uma área degradada pela mineração de carvão (Instrução normativa ICMBio Nº11/2014). A partir desta análise, tornam-se necessários estudos e intervenções por técnicas que visem à rápida recuperação e recomposição da vegetação desse ambiente para reverter o quadro de degradação (RODRIGUES et al., 2007). Para tal, é importante conhecer a biologia e fisiologia de plantas que tolerem esses solos degradados/contaminados. Elas devem ter um crescimento rápido e, de preferência, a capacidade de acumular em sua biomassa os metais pesados disponíveis. Isso reduz a biodisponibilidade desses metais às espécies menos tolerantes da micro e macrobiota, além de minimizar os riscos de contaminação do lençol freático e mananciais hídricos superficiais.

2.2 O IMPACTO DE ÁREAS DEGRADADAS NO BIOMA MATA ATLÂNTICA

As áreas de exploração de carvão do Estado de Santa Catarina estão situadas no sul do estado, dentro do bioma Mata Atlântica, que é reconhecido pela grande diversidade de espécies, estando entre os 25 *hotspots* de diversidade do planeta (MYERS et al., 2000). Essa diversidade de espécies faz com que reservas da Mata Atlântica do Sudeste, nos estados do Paraná e São Paulo, sejam consideradas sítios do patrimônio natural (UNESCO, 2016). Este bioma é uma das regiões sul-americanas com maior número de áreas de proteção integral (parques, reservas, estações ecológicas e reservas privadas) (TABARELLI et al., 2005). No entanto, a fragilidade dos sistemas de unidades de conservação se restringe à sua extensão, distribuição, falta de recursos e profissionais para a adequada administração destes locais (TABARELLI et al., 2005). Devido a essas limitações, as atividades humanas têm devastado grande parte deste bioma, e os remanescentes de Floresta Atlântica estão localizados em áreas mais elevadas da paisagem, de difícil acesso ou inadequadas para a agricultura (VIANA et al., 1992)

Assim como o aumento populacional e avanços dos centros urbanos (METZGER, 2009), a exploração do carvão mineral contribuiu para que esse bioma seja um dos mais ameaçados do planeta. Somente em Santa

Catarina, existem 818 bocas de minas abandonadas e mais de 5.655 hectares degradados por esta atividade no Bioma Mata Atlântica (SIECESC, 2015).

Com a crescente preocupação sobre mudanças climáticas, a extração do carvão mineral chegou a ser questionada, pois apesar de 3.511 hectares degradados por essa atividade já possuírem projetos de recuperação implantados (SIECESC, 2015), poucos estudos foram conduzidos a fim de verificar o potencial de uso de espécies arbóreas nativas associadas a microrganismos do solo para a recuperação destas áreas, o que seria viável no ponto de vista de recuperação. Além disso, algumas destas espécies são caracterizadas como facilitadores de processos ecológicos (AVILA et al., 2011), o que pode ser positivo para a reabilitação ou restauração ecológica de áreas biodiversas como o bioma Mata Atlântica.

2.3 LIMITAÇÕES DO SOLO PARA O CRESCIMENTO DAS PLANTAS

A lavra a céu aberto consiste de operações de remoção da cobertura vegetal, matéria orgânica, banco de sementes e de material estéril (ver ítem 2.1.). A construção desses solos é realizada a partir da disposição de solo de área de empréstimo, o que resulta em sérias alterações físicas, químicas e biológicas das condições originais (Figura 2), dificultando o processo de resiliência destas áreas (RODRIGUES et al., 2007; CAMPOS et al., 2010), o que é motivo de preocupação pela comunidade científica.

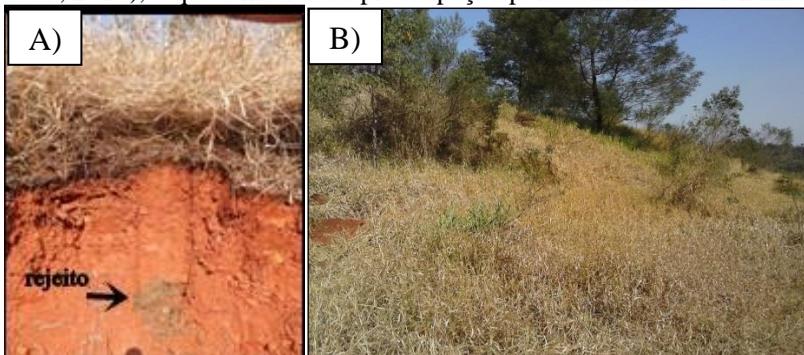


Figura 2. Perfil de solo (A) e da paisagem (B) em uma área com o solo construído. Fonte: Arquivo do autor.

As propriedades físicas dos solos construídos são condicionadas pelo material utilizado e pelo processo de construção (KÄMPF et al., 1997). Geralmente os solos de áreas de empréstimo, após serem

depositados nas áreas mineradas para fins de recuperação, resultam em solos com estrutura fraca e perfil com baixa permeabilidade de água (CAMPOS et al., 2010). Esses fatores podem resultar em grandes modificações nos atributos morfológicos e físicos, e por consequência um inadequado desenvolvimento da vegetação, perdas excessivas de solo por erosão, assoreamento e contaminação dos cursos hídricos (CAMPOS et al., 2010).

Procedimentos como adição de lodo de esgoto (ROBERTS et al., 1988), calcário, cama de aves (NETO et al., 2008) e plantas de cobertura (GONÇALVES et al., 2008; NETO et al., 2008) foram testados para reverter esse quadro. Pretende-se assim melhorar as condições físicas do substrato para crescimento de raízes, visando acelerar o crescimento das plantas. Segundo os autores acima, esses materiais podem aumentar os teores de matéria orgânica e a retenção de água no solo, o que pode contribuir para a recuperação física por aumentar a estabilidade de agregados do solo. No entanto, esses processos de recuperação física podem levar décadas para que as características se assemelhem aos solos não minerados (STÜMPF et al., 2014) e, mesmo após este período, não contribuem para melhorar as condições das camadas mais profundas do perfil do solo (CAMPOS et al., 2010; STÜMPF et al., 2014).

Além das limitações físicas, tanto na lavra a céu aberto quanto na subterrânea, são gerados grandes volumes de rejeitos, que são depositados no entorno da área minerada. Após a oxidação desses materiais sulfetados é gerada a drenagem ácida de mina (DAM) (ver ítem 2.1.). Isso causa alterações químicas, como acidificação dos solos e altas concentrações de metais pesados. Estas limitam o crescimento e sobrevivência de organismos da fauna e flora, além de pôr em risco a saúde da população humana local exposta a esses poluentes (SILVA et al., 2013). O solo com baixo pH caracteriza-se pelos menores teores de nutrientes disponíveis na solução do solo, além das plantas ficarem sujeitas à maior absorção de elementos tóxicos, como os cátions metálicos (LUDWIG et al., 2014).

As plantas expostas a altos teores de Ni, Cd, Pb, Hg e Cr apresentam alterações no metabolismo, como redução da fotossíntese, podendo haver inibição da respiração, do transporte de elétrons nas mitocôndrias e da atividade enzimática (SANITÁ DI TOPPI e GABBRIELLI, 1999). Também pode haver redução na absorção de água e nutrientes, o que muitas vezes resulta em severas injúrias e mesmo na morte das plantas (MOHANPURIA et al., 2007; YADAV, 2010).

Os metais como Cu, Zn e Mn são considerados micronutrientes, mas em altas concentrações, podem trazer prejuízos ao metabolismo das plantas. Alguns desses elementos podem causar fitotoxicidade, mesmo

ligados a partículas do solo ou da matéria orgânica e apresentando baixa mobilidade (BRUNETTO et al., 2014). Os níveis fitotóxicos desses metais variam conforme o elemento, os teores disponíveis e a espécie vegetal estudada, provocando prejuízos ao crescimento das plantas, principalmente pelos danos mitocondriais (BYCZKOWSKI E SORENSON, 1984).

Os teores de Cu, por exemplo, podem variar de 10 a 70 mg kg⁻¹ de matéria seca, dependendo da espécie de planta (KABATA-PENDIAS E PENDIAS, 2011). Em altos teores no tecido vegetal, esse metal pode formar compostos insolúveis com o fosfato nas raízes (VAN STEVENINCK et al., 1994), impedindo seu transporte para a parte aérea e ocasionando deficiência nutricional. Além disso, em níveis fitotóxicos, o Cu pode causar danos devido à agregação da membrana mitocondrial e inibição da ATPase, prejudicando a respiração (BYCZKOWSKI E SORENSON, 1984). O Zn, em níveis fitotóxicos na parte aérea de plantas, pode inibir a síntese de clorofilas, além de provocar inibição da cadeia de transporte de elétrons capaz de diminuir a atividade respiratória pelas mitocôndrias (BYCZKOWSKI E SORENSON, 1984) e, conseqüentemente, reduzir a obtenção de energia necessária para o crescimento vegetal. O Mn pode competir com os sítios de absorção de Ca e Mg, e seu excesso no tecido pode acarretar redução na respiração mitocondrial e na fosforilação oxidativa, comprometendo a obtenção de energia pelas plantas em solos contaminados (BYCZKOWSKI E SORENSON, 1984).

A má qualidade física e química dos solos, ocasionada pela construção dos mesmos nas áreas de mineração podem reduzir a comunidade e a atividade microbiana local (SILVA, 2016). Fungos, bactérias e arqueias, que poderiam estar em íntima associação com a planta ou ocupando a rizosfera, não encontram um ambiente propício para a associação com as plantas. Isso é relevante porque esses microrganismos são responsáveis por serviços como a regulação dos ciclos biogeoquímicos de nutrientes, incluindo a fixação biológica de nitrogênio e a ciclagem de P (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), solubilização do fosfato, produção de sideróforos, flavonóides e fitormônios (HAICHAR et al., 2014; SOARES NETO, 2015), eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução do estresse oxidativo e danos celulares (FERREIRA et al., 2015; CABRAL et al., 2015; DOUBKOVA et al., 2016), o que poderia aumentar a tolerância e o crescimento das plantas nesses ambientes degradados.

2.4 FITORREMEDIAÇÃO COMO TÉCNICA PARA A RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS

Uma técnica eficiente e economicamente viável de descontaminação e recuperação de áreas contaminadas com metais pesados é a exploração do metabolismo de plantas, e dos microrganismos associados, conhecida como fitorremediação (ALI et al., 2013). Wan et al. (2016) contabilizaram os danos causados pela contaminação ambiental por metais pesados e os custos da fitorremediação e concluíram que essa técnica é eficiente e compensa os custos em menos de sete anos após a implantação.

Para se obter sucesso com essa técnica, as plantas utilizadas devem possuir habilidade para o crescimento rápido nesses ambientes, tolerância a altas concentrações de metais pesados e capacidade de acumular em sua biomassa altos teores desses elementos extraídos do solo (ANDRADE et al., 2009; MOOGUEI et al., 2011). O Brasil apresenta grande potencial para a fitorremediação de áreas contaminadas, em razão da grande biodiversidade e do clima, que favorecem os processos biológicos no tratamento da poluição (MARQUES et al., 2011).

Dentre as técnicas de fitorremediação de solos contaminados por metais pesados, destacam-se a fitoextração e a fitoestabilização (ALI et al., 2013). A fitoextração baseia-se na absorção e transporte dos elementos das raízes para a parte aérea das plantas, imobilizando-os e conseqüentemente impedindo sua locomoção no perfil do solo ou para os corpos de água. Para ser considerada fitoextratora de metais pesados, a planta deve retirar do solo e acumular em sua biomassa as seguintes concentrações de pelo menos um dos seguintes elementos: $> 10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Zn e Mn; $> 1.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Pb, Ni ou Cu; $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd (RASKIN et al., 1994). A fitoestabilização é outra forma de diminuir o risco ambiental, na qual plantas são utilizadas para estabilizar o metal no solo, acumulando-o nas raízes e reduzindo assim sua movimentação pela erosão e/ou percolação, minimizando os efeitos destes contaminantes sobre a fauna e flora, assim como a probabilidade de entrarem na cadeia alimentar (WONG, 2003). Além disso, as raízes das plantas também podem oferecer superfícies de precipitação ou adsorção de contaminantes metálicos (PEREIRA et al., 2012). As plantas adequadas para fitoestabilização devem ser tolerantes às condições de solo, crescer rapidamente, ter sistema radicular bem desenvolvido e fácil estabelecimento para se manterem em condições de campo (SANTIBÁÑEZ et al., 2008).

Apesar dessas informações, pouco se sabe sobre a tolerância de recursos florestais nativos em áreas degradadas pela mineração de carvão

no Sul do Brasil, bem como seu uso para a recuperação e remediação dos metais pesados dessas áreas. Elas têm o potencial de reduzir o risco de contaminação das populações humanas, plantas e outros organismos, o que contribui à finalidade de gradualmente reestabelecer o equilíbrio dos processos ecológicos.

2.5 USO DE ESPÉCIES FLORESTAIS EM SOLOS CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS

As espécies arbóreas são de grande interesse em programas de fitorremediação e recuperação de áreas contaminadas, por produzirem maior biomassa e acumularem maior quantidade de metais pesados, que assim permanecem imobilizados por mais tempo (GRAZZIOTTI et al., 2003). Com maior volume de raízes que as herbáceas, elas exploram maior profundidade do solo. Elas constituem uma solução sustentável de descontaminação, pois em alguns casos, pode-se reutilizar a madeira e outros produtos e subprodutos. As espécies arbóreas ideais devem possuir habilidade de se desenvolver em solos pobres em nutrientes, ter rápida taxa de crescimento e apresentar tolerância a metais pesados (PUNSHON et al., 1996).

Essa tolerância varia conforme a espécie vegetal e o elemento contaminante disponível (SOARES et al., 2001). No cerrado, o Cedro (*Cedrela fissillis*) tem sido empregado em áreas contaminadas por As, mas Santos & Novak (2013) destacam que nenhuma espécie vegetal endêmica desse bioma foi investigada até o momento para essa finalidade, apesar da grande biodiversidade ocorrendo nele.

Em estudo realizado sobre diferentes espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com Zn e Cd, *Machaerium nictidans* (bico-de-pato), *Myroxylon peruiferum* (bálsamo), *Piptadenia gonoacantha* (pau-jacaré), *Senna macranthera* (fedegoso) e *Trema micrantha* (trema) foram as que mais translocaram esses elementos para a parte aérea, com potencial de utilização para a fitoextração, enquanto *Acacia mangium* (acácia), *Copaifera langsdorffi* (copiadeira) e *Cedrella fissilis* (cedro) apresentaram baixo índice de translocação (SOARES et al., 2001), sendo mais indicadas em programas de fitoestabilização desses metais. Contudo, as espécies arbóreas nativas pioneiras possuem um crescimento rápido e por isso são mais interessantes para programas de fitorremediação devido ao fácil cultivo, por serem adaptadas às condições climáticas, possuírem resistência a patógenos e grande produção de biomassa (SHABANI e SAYADI, 2012; BOUKHRIS et al., 2016). Por isso, o cultivo e a conservação do material genético nativo deve ser uma

prioridade no manejo, recuperação e restauração das áreas degradadas (FERNÁNDEZ et al., 2016).

A timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong) é uma árvore nativa da família das Leguminosae, que ocorre em várias regiões do Brasil e tem vários nomes vulgares, dentre eles orelha-de-negro, orelha-de-macaco, timbó ou tamboril (Figura 3). As sementes desenvolvem em vagens de cor escura e geralmente apresentam dormência, podendo haver até 3.700 sementes por quilo.

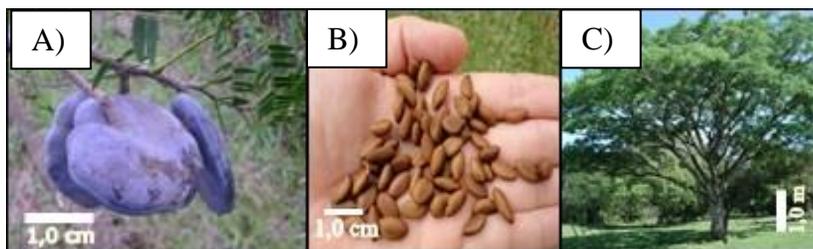


Figura 3. Frutos e folhas (A), sementes (B) e árvore adulta de timbaúva (C). Fonte: Stival, 2009; Grasel, 2013. Disponível em: www.ufrgs.br/fitoecologia/florars.

Por ter um desenvolvimento rápido em diversos tipos de solos, a timbaúva possui grande potencial para utilização em programas de recuperação de áreas degradadas. Alguns estudos foram conduzidos visando elucidar seu potencial fitorremediador de metais pesados (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2015). De acordo com Silva et al. (2011), pequenas doses de Cu no solo podem incrementar o desenvolvimento vegetativo da timbaúva, apesar de haver baixa translocação desse elemento para a parte aérea da planta. Embora esta espécie seja pouco estudada, Trannin et al. (2001) avaliaram o potencial de utilização de *Enterolobium contortisiliquum* (timbaúva), *Acacia mangium* (acácia) e *Sesbania virgata* (sesbânia) em solo contaminado com Pb, Zn, Cd e Cu, e a timbaúva foi mais tolerante e, portanto, a mais promissora para revegetação de solos com excesso desses metais. Sua associação com fungos micorrízicos e bactérias diazotróficas presentes no solo pode trazer benefícios nutricionais importantes para o seu estabelecimento em ambientes degradados e com baixa fertilidade (MOREIRA et al., 2010; COSTA et al., 2012), como os solos das áreas de mineração de carvão.

O angico vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan) é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, com ocorrência acentuada no Sul do Brasil. Ela é conhecida também por angico da mata,

angico de banhado, guaiçara, guarucaia ou piriçá, dependendo da região do país (Figura 4). Além de ser melífera, ter crescimento rápido e desenvolver até 38.000 sementes por quilo, essa espécie é promissora em ambientes degradados, por ser facilitadora de sucessão ecológica (Ávila et al., 2011).

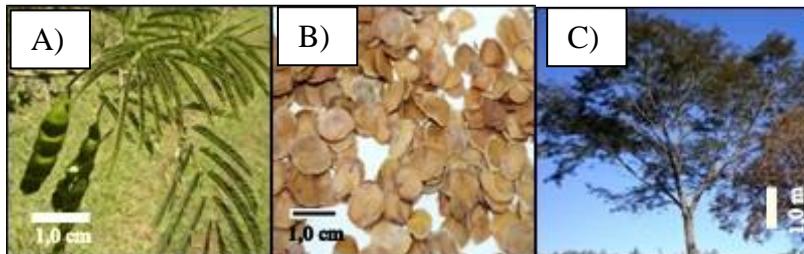


Figura 4. Frutos e folhas (A), sementes (B) e árvore adulta de angico vermelho (C). Fonte: Verdi, 2009; Disponível em: www.ufrgs.br/fitoecologia/florars.

O angico vermelho é uma espécie eficiente em acumular cobre em seus tecidos, principalmente no sistema radicular, reduzindo a disponibilidade desse metal no solo (DELLAI, 2014). Silva et al. (2011) avaliaram o crescimento do angico em doses de 64; 128; 192 e 256 mg de Cu kg^{-1} de solo, concluindo que as plantas não tiveram a massa seca da parte aérea afetada pelas doses aplicadas, o que evidencia grande tolerância ao metal. Essa espécie é recomendada para reflorestamentos mistos de áreas degradadas, podendo ser usada em associações secundárias mais evoluídas (LORENZI, 1992).

Por serem leguminosas, estas espécies podem associar-se com diferentes microrganismos promotores de crescimento identificados em solos degradados e contaminados. Dentre estes, pode-se destacar as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), que podem melhorar o estado nutricional e fisiológico das mudas a campo.

2.6 MICRORGANISMOS SIMBIONTES EM SOLOS CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) têm ocorrência abundante em solos contaminados (STÜRMER & SIQUEIRA, 2006) e diversas espécies de FMAs podem sobreviver nesses ambientes. Isso é relevante, porque, como já explicitado, as áreas contaminadas não

apresentam condições favoráveis ao bom desenvolvimento da maioria das espécies vegetais, o que acaba limitando os processos de recuperação. Esses microrganismos simbiotes podem proporcionar muitos benefícios às plantas que vivem em condições de estresse (FOLLI-PEREIRA et al., 2012) ou em baixos teores de água e nutrientes (BORTOLINI et al., 2011).

Em área de mineração de ouro contaminada com As foram identificadas 23 espécies de FMAs, sendo mais representativos os gêneros *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Glomus*, *Gigaspora* e *Paraglomus* (SCHNEIDER et al., 2013). Dentre estes, os autores destacam que a maior tolerância foi detectada nas espécies *Paraglomus occultum*, *Acaulospora morrowiae* e *Glomus clarum*. Outros autores, avaliando a diversidade de FMAs em solo degradado pela mineração e contaminado com Cd, encontraram plantas com hifas e arbuscúlos, além de esporos de FMAs, principalmente dos gêneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora* e *Acaulospora* (GONZÁLEZ-CHÁVES et al., 2004).

De acordo com Wei et al. (2014), que realizaram um estudo da diversidade molecular de FMAs associados a plantas de *Phytolacca americana* cultivadas em solo de mina e contaminado com Mn, os gêneros de FMAs mais encontrados foram *Glomus* e *Rhizophagus*, os quais proporcionaram melhores condições de desenvolvimento das plantas.

Além da sua contribuição para o crescimento de plantas, os FMAs presentes em áreas contaminadas podem imobilizar os elementos traços em sua biomassa. Cabral et al. (2010) verificaram o potencial de sobrevivência e acúmulo de metais em micélios de fungos *Glomus clarum* e *Gigaspora gigantea* em solo contaminado com Cu, Zn, Cd e Pb, demonstrando que a retenção de metais no micélio desses FMAs é um processo rápido, e que a velocidade de retenção do Cu é 3, 30 e 60 vezes maior que a retenção de Zn, Cd e Pb, respectivamente. Em levantamento da diversidade de FMAs em solos degradados da Mata Atlântica, cujo pH variava de 3,5 a 4,5, encontraram-se predominantemente espécies do gênero *Acaulospora*, seguido de *Glomus* e *Scutellospora*, respectivamente (MAZZONI-VIVEIROS & TRUFEM, 2004).

Apesar dos objetivos específicos da tese estarem relacionados a avaliar os efeitos nutricionais e fisiológicos da inoculação de FMAs em espécies arbóreas nativas do bioma Mata Atlântica visando a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão, diferentes espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) foram identificadas em áreas contaminadas por metais pesados, inclusive em área de mineração de carvão (MOURA et al., 2016) e ouro (RANGEL et al., 2017). Moura et al. (2016) isolaram BFN de área de mineração de carvão e testaram esses

microrganismos em espécies arbóreas nativas. Os autores isolaram bactérias eficientes em promover o crescimento e fixar nitrogênio em bracinga e manacá. Ferreira et al. (2012) concluíram que diferentes estirpes de *Cupriavidus necator* podem formar nódulos e promover o crescimento de *Mimosa pudica* e *Leucaena leucocephala* em solos multicontaminado com Zn, Cd, Cu e Zn.

Deste modo, tanto os FMAs como as BFN podem contribuir para o estabelecimento das mudas em solos contaminados por metais pesados. Contudo, poucos estudos foram conduzidos para avaliar o estado nutricional e fisiológico, além do potencial de fitorremediação de mudas de espécies nativas inoculadas com esses microrganismos em solos contaminados pela mineração de carvão.

2.7 ASSOCIAÇÃO PLANTA-MICRORGANISMOS EM SOLOS CONTAMINADOS

As associações mutualistas entre os fungos e as raízes de plantas surgiram ao longo do processo evolutivo, e sua evolução teria acontecido nos trópicos, sendo os fungos possivelmente parceiros das plantas na evolução do ambiente aquático para o terrestre (SIMON et al., 1993). Esses microrganismos adquiriram características e adaptabilidade para coexistência com diversas espécies vegetais em diferentes condições edáficas, tornando os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) importantes componentes do sistema solo-planta (SMITH & READ, 2008).

A partir da exsudação pelas raízes, na rizosfera, de fitormônios tais como auxina e estrigolactonas (CHENG et al., 2013; HAICHAR et al., 2014), ocorre a sinalização e o estímulo para a associação micorrízica (HAICHAR et al., 2014). Enquanto a planta fornece o meio de desenvolvimento, compostos contendo carbono e nutrientes para a síntese celular dos fungos, estes podem aumentar a área superficial das raízes, maximizando a exploração e absorção de água e nutrientes, além de favorecer o desenvolvimento de microrganismos benéficos como solubilizadores de sulfato e fosfato (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SMITH e READ, 2008).

Hormônios específicos também são responsáveis pelo reconhecimento entre o pêlo radicular e bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN). Dentre os principais benefícios dessa associação está o aporte de nitrogênio (N), um dos nutrientes exigidos em maior quantidade pela maioria das espécies (WU et al., 2014). Desta forma, contribuem para a

formação de proteínas, enzimas e hormônios necessários para o crescimento vegetal (ALVES et al., 2010).

A importância dos FMAs e BFN para as plantas é reconhecida pela comunidade científica, em razão de melhorias na qualidade nutricional, absorção de água, estruturação do solo e adaptação das plantas ao ambiente (COLODETE et al., 2014). Os benefícios dos FMAs para o desenvolvimento das plantas em ambientes contaminados com metais pesados têm sido relatados para diversos grupos de plantas, como pteridófitas (SCHNEIDER et al., 2012), espécies anuais para produção de grãos (GUO et al., 2013), forrageiras (SILVA et al., 2006) e espécies florestais lenhosas (SOUZA et al., 2011). As pesquisas envolvendo a interação entre planta e esses microrganismos geram informações úteis para o desenvolvimento de programas de fitorremediação (LEUNG et al., 2013). Nesses ambientes degradados, a tolerância de plantas pode estar associada à presença de FMAs e BFN, por serem reconhecidamente capazes de melhorar o estado nutricional das plantas e desencadear mecanismos de tolerância ao estresse (SOARES & SIQUEIRA, 2008; LINGUA et al., 2008; ARRIAGADA et al., 2010; FOLLI-PEREIRA et al., 2012).

2.8 MECANISMOS DE FITOPROTEÇÃO A METAIS PESADOS EM PLANTAS INOCULADAS

Os mecanismos de tolerância e adaptação utilizados por plantas podem envolver processos e reações de natureza física, nutricional, fisiológica e bioquímica. Tais processos possibilitam seu cultivo em ambientes extremos, pois levam as plantas a tolerar condições como presença de metais pesados (SCHNEIDER et al., 2012; ALI et al., 2013; PEREIRA et al., 2012), estresse hídrico (BORTOLINI et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011) e salinidade do solo (VERAS et al., 2011).

Os principais mecanismos físicos que podem aumentar a tolerância da planta inoculada em ambiente contaminado com metais pesados parecem estar relacionados a alterações na fisiologia das raízes, aumento da espessura da parede de células corticais, competição física pelo espaço e maior lignificação das raízes (DANTAS et al., 2009). Ao avaliar o efeito no cádmio nas respostas fisiológicas e anatômicas em plantas jovens de eucalipto (*E. camaldulensis*) inoculadas com FMAs, Marques et al. (2011) verificaram que aumentos na espessura da endoderme e epiderme revelaram o potencial de adaptação dessas plantas à exposição do metal. No entanto, estudos mais específicos devem ser realizados para entender

os demais mecanismos protetores que os FMAs promovem nas plantas (ALVES et al., 2010).

Soares et al. (2008) demonstraram que os danos causados pelos metais pesados podem estar relacionados ao desequilíbrio nutricional das plantas, no caso *E. maculata* e *E. urophylla* mostraram-se muito suscetíveis ao Cd, e o aumento das doses desse elemento em solução diminuiu a translocação de Fe e Mg, principalmente. De acordo com Soares et al. (2007), uma contribuição importante dos FMAs em solos contaminados é que, ao aumentar a absorção de P pela planta inoculada, o fungo promove maior tolerância por reduzir a translocação dos elementos metálicos das raízes para a parte aérea. Esse resultado pode ser explicado pela formação de compostos insolúveis entre os íons fosfato e os metais pesados nas raízes (VAN STEVENINCK et al., 1994), evitando os danos celulares e mitocondriais, conferindo efeito fitoprotetor às plantas cultivadas em solos contaminados.

Outro efeito fitoprotetor mediado pelos FMAs pode estar relacionado à presença de glomalina no solo. A glomalina é uma glicoproteína estável e persistente, exsudada pelos FMAs, que pode contribuir para a redução da toxicidade das plantas, uma vez que retém em sua estrutura parte dos metais pesados, como Pb, Cd, Cu e Zn, que estão na solução do solo (WU et al., 2014). No entanto, a capacidade de sequestro desses elementos pela molécula da glomalina é variável entre os metais. Vodnik et al. (2008) verificaram, em um solo com altas concentrações de Pb (5900 mg kg^{-1}) e Zn (1300 mg kg^{-1}), que 15,5% e 20,5%, respectivamente, do teor total desses metais estavam ligados a moléculas da glomalina. Essa proteína pode adsorver 1,6-4,3 mg de Cu (GONZÁLEZ-CHÁVEZ et al. 2004), 3,3-4,8 mg de Zn (CORNEJO et al. 2008), 2,23-784,42 mg de Mn (CHERN et al. 2007) por grama, contribuindo para o crescimento inicial de plantas cultivadas no solo contaminado com metais pesados. A fração total da glomalina é mais estável no ambiente do que a fração facilmente extraível, por isso sua importância em estudos sobre fitorremediação e recuperação de solos contaminados (VODNIK et al., 2008; WU et al. 2014).

As causas do estresse resultante da disponibilidade, absorção e consequente metabolização de metais por plantas, estão sendo elucidadas por pesquisas desenvolvidas no mundo todo. Barbosa et al. (2014) sugerem que a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir do O_2 oriundo da respiração seja a principal causa de injúria celular e morte de plantas em condições de estresse metálico. Folli-Pereira et al (2012) corroboram esses resultados, afirmando que o estresse oxidativo pode ser um dos principais mecanismos da toxidez de vários metais

pesados. Esses eventos metabólicos ocorrem principalmente nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011), e podem ser considerados processos de sinalização de plantas em condições de estresse (BARBOSA et al., 2014). Espécies como *Kandelia candel* e *Bruguiera gymnorrhiza* expostas a Cd, Pb e Hg apresentam diferentes níveis de estresse oxidativo das membranas celulares, com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^\cdot) (ZHANG et al., 2007). As ROS podem destruir distintos tipos de biomoléculas, causar oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, inibição de enzimas e danos ao DNA e RNA (MITTLER, 2002).

Segundo Ye et al. (2008), os carotenoides são moléculas responsáveis pela proteção fotossintética, pois ajudam a eliminar os radicais superóxidos. Na maior dose de Cd, mudas de eucalipto sintetizaram 129% mais carotenoides em relação ao controle sem contaminação (MARQUES et al., 2011), o que demonstrou que plantas com maior teor dessas moléculas são menos vulneráveis a danos por estresse oxidativo, por sua vez um mecanismo de defesa ao estresse (SINGH et al., 2006; MARQUES et al., 2011; GIULIANO et al. 2014; HRISTOZKOVA et al., 2016). Foi verificado que a associação de plantas com FMAs pode aumentar ainda mais a concentração de diferentes metabólitos secundários nas folhas de plantas, dentre eles os carotenoides, aumentando a tolerância de plantas em condições de estresse metálico (HRISTOZKOVA et al., 2016).

Em condições de estresse, as plantas desenvolvem outro sistema de defesa para amenizar a toxicidade do elemento e, desta forma, sobreviver nesses ambientes, que é um complexo enzimático capaz de eliminar as ROS. Dentre as principais enzimas nesse aparato de defesa podem ser citadas a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona redutase (GR).

A catalase é uma enzima encontrada em todos os organismos vivos, e em eucariontes está presente preferencialmente no peroxissomo celular. Ela catalisa a dismutação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), transformando-o em água e oxigênio (AHMAD, 2014). Estudos sugerem que a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares em plantas submetidas a estresse pode resultar no aumento da produção desta enzima, e com isso favorecer o desenvolvimento de plantas cultivadas em solo contaminado com metais pesados (ABDEL & LATEF, 2011; FERREIRA et al., 2015), solos salinos (BORDE et al., 2011) ou sob estresse hídrico (AGUACIL et al., 2003). Houve correlação positiva entre a inoculação de *Rhizophagus clarus* e doses de fósforo na proteção de

Crotalaria juncea, quando cultivada em altos níveis de Cu no solo (FERREIRA et al., 2015). Segundo esses autores, a ação do fungo micorrízico e o aumento da disponibilidade de P podem ter propiciado o melhor estabelecimento das plantas, uma vez que aumentaram as atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), que agem na remoção da ROS em diferentes compartimentos celulares (MISHRA et al., 2006). A superóxido dismutase (SOD) e a glutathione redutase (GR) são enzimas que atuam no sistema de defesa de plantas submetidas a estresse. São também chamadas de metaloproteínas que catalisam a dismutação do radical livre superóxido para as formas de oxigênio molecular e água (GIANOPOLITIS & RIES, 1977). Em trabalho com inoculação de três espécies de fungos micorrízicos em *Phaseolus vulgaris* e diferentes doses de P disponíveis no solo, Lambais et al. (2003) concluíram que a atividade da SOD está mais relacionada ao teor de P disponível no solo que à presença do fungo micorrízico, pois menores teores de P podem ter resultado em estresse às plantas, gerando radicais superóxidos e, desta forma, no aumento da atividade da enzima SOD.

A glutathione redutase (GR) tem sido observada em plantas sob estresse hídrico e metálico (MITTLER, 2002), sendo considerada uma das mais importantes enzimas antioxidantes na desintoxicação do H₂O₂, reduzindo-o a água, com a utilização do ascorbato como doador de elétrons específico (LAWLOR & CORNIC, 2002). Segundo Ferreira et al. (2015), plantas que aumentam a produção de enzimas antioxidantes são mais tolerantes e possuem um grande potencial de crescimento em áreas contaminadas com metais pesados.

Além desses mecanismos, pode ocorrer a produção de fitoquelatinas (PCs), que são tripeptídeos de ligação (γ -Glu-Cys)n-Gly (n=1-12), e cuja formação ocorre a partir da glutathione em sua forma reduzida, pela ação da enzima γ -glutamylcisteina-dipeptidil-transpeptidase ou também reconhecida como fitoquelatina sintase (PCS).



Essa formação pode ser induzida por diversos metais pesados como Cd ou As (MISHRA et al., 2006), sendo este último também responsável por induzir a formação da GSH (SNELLER et al., 1999). Depois de sintetizadas, as fitoquelatinas são capazes de se ligar ao metal com posterior compartimentalização no vacúolo celular (MOHAMED et al.,

2012; TESTIATI et al., 2013; HAWRYLAK-NOWAK et al., 2014), fazendo com que o elemento não participe do metabolismo da planta, evitando sua contaminação. Pallara et al. (2013), ao estudar os mecanismos de defesa de álamo-branco em solo contaminado com metais pesados, concluíram que a interação entre *Glomus mosseae* e a planta induziu o gene que codifica a síntese de fitoquelatinas nas folhas, tornando a planta mais tolerante ao meio contaminado, em comparação com aquelas sem FMAs. Em plantas de feijão cultivadas em solo com altas concentrações de Cu e inoculadas com *Glomus etunicatum*, o conteúdo de glutatona das folhas não apresentou diferenças, mas a quantidade de fitoquelatinas (PCs) foi maior nos tratamentos com inoculação do FMA (ANDRADE et al., 2010). Isso indica que o fungo pode ter contribuído para maior síntese de PCs nas folhas e com isso, proporcionado às plantas maior proteção a toxidez por Cu.

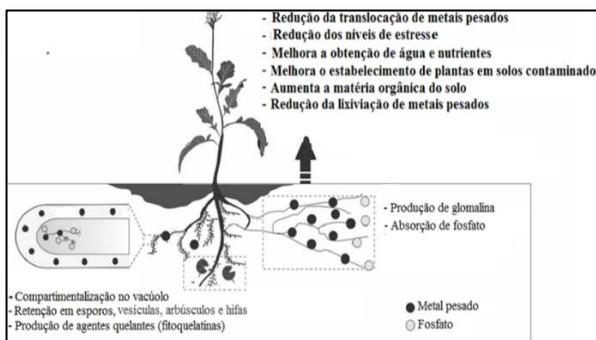


Figura 5. Mecanismos de proteção desencadeados pelos FMAs em plantas cultivadas em solos contaminados por metais pesados. Fonte: Modificado de Cabral et al., 2015.

Poucos estudos foram conduzidos visando elucidar os benefícios nutricionais e os mecanismos fisiológicos envolvidos na tolerância de plantas nativas associadas a BFN para uso em programas de fitorremediação.

Diante da complexidade morfológica e fisiológica da planta, dos FMA e da associação planta-FMA a serem analisados, a análise multivariada pode trazer maior entendimento das relações existentes entre os componentes e melhor discriminar esses dados. Dentre as análises multivariadas, a análise de componentes principais (PCA) tem sido utilizada em estudos biológicos (SANTANA et al., 2014; FERREIRA et al., 2015), pois trata-se de uma ordenação de dados, através da qual

poderá ser selecionado o fator que mais influenciou no desempenho das mudas de cada espécie cultivada em solo contaminado. Como pouco se conhece sobre o metabolismo de espécies arbóreas nativas associadas à FMAs com potencial de utilização na recuperação de áreas degradadas, uma análise integradora pode apontar mecanismos envolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho na fitorremediação e o estresse fisiológico de espécies florestais leguminosas nativas associadas com fungos micorrízicos arbusculares em solo degradado pela mineração de carvão.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o desenvolvimento de mudas de espécies nativas arbóreas inoculadas com FMAs e BFN em solo contendo rejeito de mineração de carvão;
- b) Conhecer o potencial de extração de metais pesados do solo por espécies nativas arbóreas inoculadas com FMAs e BFN;
- c) Avaliar os níveis de estresse abiótico, indicado por espécies reativas ao oxigênio (ROS), de plantas nativas arbóreas associadas com FMAs e BFN em solos contendo rejeito da mineração de carvão;
- d) Identificar mecanismos de proteção em espécies nativas arbóreas inoculadas com FMAs e BFN cultivadas em solo contendo rejeito da mineração de carvão.

4 HIPÓTESES

- a) A adição de rejeito oriundo da extração de carvão mineral ao solo prejudica o desenvolvimento de plantas;
- b) A inoculação micorrízica de espécies arbóreas aumenta o potencial de fitorremediação de metais pesados do solo contaminado;
- c) A inoculação de FMAs e BFN favorece, pelo aumento do paorte de nutrientes, o desenvolvimento de mudas de espécies arbóreas em solo contendo rejeito de mineração de carvão;
- d) A inoculação com FMA ou BFN reduz os teores de espécies reativas ao oxigênio (ROS) em plantas cultivadas em solo contaminado;
- e) O FMA aumenta os teores de glomalina no solo e os teores de enzimas antioxidantes e fitoquelatinas em plantas cultivadas em solo contendo rejeito de mineração de carvão.

5 DESENVOLVIMENTO

5.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos para a avaliação de espécies arbóreas cultivadas em solo contendo rejeito de mineração de carvão e contaminado com metais pesados foram conduzidos na casa de vegetação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) e no fitotron do Departamento de Engenharia Rural, ambos na UFSC, Florianópolis, Santa Catarina. Foram testadas as diferentes interações entre espécies de fungos e plantas cultivadas em solo contaminado com diferentes doses de rejeito de carvão mineral. Para testar as hipóteses, o trabalho foi dividido em três ensaios principais:

- 1) No primeiro estudo buscou-se entender os efeitos de fungos micorrízicos arbusculares em promover fitoproteção de *Enterolobium contorsiliquum* (Vell.) Morong em solo contendo rejeito da mineração de carvão. (publicado na International Journal of Phytoremediation, doi: 10.1080/15226514.2017.1328390).
- 2) No segundo trabalho buscou-se quantificar a contribuição de fungos micorrízicos arbusculares para a fitorremediação de metais pesados por *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan em solo contendo rejeito da mineração de carvão.
- 3) Na terceira etapa do trabalho, foram investigados os mecanismos pelos quais fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas promovem fitoproteção de *Enterolobium contorsiliquum* (Vell.) Morong em solo contendo rejeito da mineração de carvão.

5.2 DEFINIÇÃO DA DOSE DE REJEITO A SER UTILIZADA

No primeiro ano do doutorado foi realizado um ensaio preliminar para avaliar a tolerância das espécies arbóreas com doses crescentes do rejeito de mineração de carvão. Os ensaios preliminares com solo e rejeito para o cultivo de bracatinga (*Mimosa scabrella*) indicaram que 30% foi a maior dose de rejeito tolerada por esta espécie (dados não publicados). Com base nisso, foram definidas as proporções de 0; 15; 30 e 45% de rejeito adicionado ao solo não autoclavado para o cultivo de angico (*P. rigida*) e timbaúva (*E. contortisiliquum*). O experimento foi conduzido em tubetes de polipropileno com capacidade de 300 cm³ cada, mantidos durante quatro meses em condições controladas (fitotron), com

temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas ($150 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com quatro repetições.

Antes da semeadura, a quebra da dormência das sementes de timbaúva foi realizada colocando-as 15 minutos em ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 P.A.) e posteriormente lavadas em água destilada. A semeadura do angico foi realizada diretamente porque as sementes desta espécie não necessitam de quebra da dormência.

Após o tempo de condução do experimento, as mudas foram avaliadas quanto a seu desenvolvimento e qualidade por meio de medições de altura, diâmetro do caule, comprimento radicular, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e número de nódulos. Com esses dados calculou-se o Índice de Qualidade de Dickson (IQD) para definição da dose de rejeito a ser utilizada nos próximos experimentos.

As mudas de timbaúva apresentaram diferenças apenas no acúmulo de MSPA. Para essa espécie, quanto maior a dose de rejeito adicionada ao solo, menor foi a MSPA. Nas doses de 15 e 30% a MSPA das mudas foram iguais, mas menores do que na dose 0. Por isso, foi selecionada a dose de 30%, por ser a maior dose de rejeito na qual começaram a reduzir os parâmetros de crescimento das mudas, embora o IQD não tenha diferido. No angico, o aumento das doses de rejeito reduziu a altura e o diâmetro do caule das mudas. Na dose de 30% a diferença passou a ser significativa, por isso, foi utilizada como a maior dose com rejeito a ser comparada com o substrato sem rejeito.

**6 CAPÍTULO I – EFEITO FITOPROTETOR DE FUNGOS
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM *Enterolobium
contortisiliquum* (Vell.) Morong EM SOLO CONTENDO
REJEITO DE MINERAÇÃO DE CARVÃO**

(Artigo publicado no periódico International Journal of Phytoremediation, v. 19, n. 12, p. 1100-1108, 2017. doi:10.1080/15226514.2017.1328390).

6 EFEITO FITOPROTETOR DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong EM SOLO CONTENDO REJEITO DE MINERAÇÃO DE CARVÃO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento da timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) na absorção e fitoproteção no solo com resíduos de mineração de carvão contaminado por metais. Um experimento em casa de vegetação foi realizado em fatorial 3 x 2 (não inoculados, inoculados com *Rhizophagus clarus* ou inoculados com *Acaulospora colombiana*) e dois substratos (0 ou 30% de rejeito de mineração). Após 90 dias, as mudas foram coletadas para quantificar parâmetros de crescimento, qualidade, taxa de colonização micorrízica da raiz e conteúdo foliar de clorofilas e carotenóides. Os macronutrientes foram quantificados na parte aérea e os teores de Cu, Zn e Mn foram avaliados na parte aérea e raízes. Além disso, o teor de glomalina foi quantificado na rizosfera. O substrato contendo rejeito apresentou menor pH, porém maior teor de matéria orgânica e Cu, Zn e Mn extraíveis. A colonização das raízes por *A. colombiana* (40%) promoveu o acúmulo de P e N, necessários para a síntese de corofilas e carotenóides, além de maior produção de glomalina na rizosfera (2,9 mg g de solo⁻¹), o que contribuiu para a fitoproteção e um melhor crescimento das plantas cultivadas em substrato com rejeito. Neste substrato, as mudas obtiveram maior diâmetro do caule e produção de massa seca da parte aérea e raízes, o que conferiu a melhor qualidade de mudas se comparada aos demais tratamentos. Verificou-se também que essas plantas absorveram e translocaram menos Cu (1,04 mg kg⁻¹) e Zn (13,4 mg kg⁻¹) para a parte aérea, por conter cerca de 72 e 50% menos Cu e Zn nas raízes, respectivamente, se comparadas aquelas inoculadas com *R. clarus*. As plantas cultivadas no substrato com rejeito e inoculadas com *R. clarus* obtiveram maior taxa de colonização das raízes (81%) e translocaram aproximadamente 50% mais Zn das raízes para a parte aérea, o que contribuiu para a redução do crescimento e qualidade de mudas inoculadas com esse fungo. Por isso, considera-se que a colonização por *R. clarus* não produziu efeitos fitoprotetores.

**7 CAPÍTULO II - FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES
NA EFICIÊNCIA DA REMEDIAÇÃO POR *Parapiptadenia rigida*
(Benth.) Brenan EM SOLO COM REJEITO DE MINERAÇÃO DE
CARVÃO**

(Este trabalho segue a formatação do periódico International Journal of Phytoremediation)

7 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA EFICIÊNCIA DA REMEDIAÇÃO POR *Parapitadenia rigida* EM SOLO COM REJEITO DE MINERAÇÃO DE CARVÃO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no crescimento de mudas de angico (*Parapitadenia rigida* (Benth.) Brenan) e na eficiência de remediação em solo contendo rejeito de mineração de carvão. Um experimento em estufa foi realizado com três tratamentos de inoculação (não inoculados, inoculados com *Rhizophagus clarus* ou inoculados com *Acaulospora colombiana*) em dois substratos (0 ou 30% de rejeito). Após 90 dias, as mudas foram coletadas para quantificar os parâmetros de crescimento, a qualidade, a taxa de colonização da raiz micorrízica e os níveis de clorofila foliar e carotenóides. O fósforo foi quantificado na parte aérea, enquanto Cu, Zn e Mn foram quantificados na parte aérea e raiz. O teor de glomalina foi quantificado na rizosfera. Tanto *R. clarus* quanto *A. colombiana* aumentaram o acúmulo de P, a glomalina do solo e o crescimento de plantas em solo de mineração de carvão. A colonização por *R. clarus* (81%) aumentou a eficiência de remediação (0,06) e o fator de biacumulação de Cu (0,21), em comparação com as plantas inoculadas com *A. colombiana* (0,03 e 0,13) e não inoculadas (0,02 e 0,11), respectivamente. A colonização por *A. colombiana* (48%) promoveu menor translocação de Zn para a parte aérea, aumentou a eficiência de remediação (0,16) e o fator de bioacumulação (0,51) de Mn, em comparação com as plantas inoculadas com *R. Clarus* (0,12 e 0,38) e não inoculadas (0,08 e 0,34), respectivamente. *P. rigida* inoculada com *R. clarus* mostrou potencial de uso na fitoextração de Cu, enquanto a inoculação com *A. colombiana* pode ser utilizada na fitoextração de Mn e na fitostabilização de Zn em solos degradados pela mineração de carvão.

7.1 INTRODUÇÃO

A mineração de carvão a céu aberto consiste na retirada da vegetação e da camada superficial do solo, que é utilizado como depósitos de rejeitos. Estes resíduos ao permanecer no local, resultam em um solo com baixos teores de nutrientes e pH, além da contaminação por metais pesados (Meyer et al., 2016; Santos et al. 2017).

Diferentes espécies têm demonstrado tolerância a esses tipos de solos, inclusive nativas (Stoffel et al., 2016), por isso a utilização e conservação desse material genético deve ser prioridade no manejo, recuperação e restauração de áreas degradadas (Fernández et al., 2016). O angico-vermelho (*Parapitadenia rigida* (Benth.) Brenan), Fabaceae, é uma espécie arbórea nativa do Brasil que ocorre também em florestas pluviais da América Latina e Central. Além de tolerar, sobreviver e se reproduzir em solo com baixa fertilidade (Gonçalves et al., 2012), essa espécie acumula metais pesados nos tecidos, mostrando ser promissora para programas de fitorremediação (Ali et al., 2013).

Algumas espécies de FMAs (fungos micorrízicos arbusculares) são capazes de melhorar o estado nutricional e fisiológico das plantas em solos contaminados (Smith e Read, 2008; Santos et al., 2017), desencadear mecanismos de fitoproteção a metais pesados (Santos et al., 2017) e promover a complexação desses elementos na molécula de proteína relacionada à glomalina (Wu et al. 2014), processos que podem favorecer o crescimento vegetal. Outras espécies podem aumentar a absorção de metais pesados, o que pode aumentar a eficiência da remediação do solo por espécies vegetais tolerantes (Mani et al., 2016).

Estudos recentes mostram a alta especificidade das associações micorrízicas no crescimento de plantas em solos contaminados por metais pesados (He et al., 2014; Yu et al., 2017). Schweiger et al. (2014) sugerem que os metabólitos produzidos nas folhas das plantas são altamente específicos, e tal especificidade depende da interação planta - FMA. Uma meta-análise revelou que Glomeraceae podem aumentar o crescimento de leguminosas em solo com altos teores de metais pesados, enquanto não-Glomeraceae o fazem em solo com teores médios e baixos de metais (He et al., 2014). A inoculação de *R. clarus* (Glomeaceae) em espécies arbóreas pode aumentar a fitoextração de Cu e Zn do solo, enquanto a inoculação com *A. colombiana* (não-Glomeraceae) aumenta a fitoextração de As, Cd e Mn (Stoffel et al., 2016; Santos et al., 2017).

Devido a complexidade e das diferenças nas respostas das interações planta-FMA a solos contaminados, poucos estudos

objetivaram a seleção de associações específicas para fitoremediar metais pesados do solo. O objetivo deste estudo foi avaliar a inoculação de *Parapatadenia rigida* (Benth.) Brenan com *R. clarus* ou *A. colombiana* para verificar seus efeitos no crescimento das mudas e eficiência na fitoremediação de Cu, Zn e Mn em solo de área de mineração de carvão.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Desenho experimental

O experimento foi conduzido por 90 dias em casa de vegetação em Florianópolis (27°35'54.21" S e 48°30'56.40" W) usando tubetes de polipropileno com 300 cm³ de substrato. O experimento foi conduzido em fatorial (3 x 2) de inoculação (não inoculado, inoculado com *Rhizophagus clarus* ou inoculado com *Acaulospora colombiana*) e dois níveis de rejeito (0 e 30% adicionado ao solo a partir de experimento prévio), com 12 repetições em delineamento inteiramente casualizado.

7.2.2 Coleta e caracterização dos substratos

O solo (solo construído, portanto sem perfil definido) e o rejeito (depositado há aproximadamente cinco anos) foram coletados na camada de 0-20 cm em área de mineração de carvão próxima a Criciúma, Santa Catarina (28°35'16.21" S e 49°26'48.43" W). Os materiais foram peneirados (4,0 mm), misturados e fertilizado com 150 mg de P kg de solo (como superfosfato triplo). O substrato foi colocado em tubetes e autoclavado duas vezes por uma hora. Depois de 30 dias, o substrato foi caracterizado, conforme Tedesco et al. (1995). A textura do solo foi avaliada pelo método da pipeta (Embrapa, 1997). Teores extraíveis de Cu, Zn, Mn, P e K foram quantificados após extração por Mehlich-1. O carbono orgânico total foi determinado pelo método Walkley-Black e o N total foi extraído por digestão sulfúrica (peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico 1:2, v:v) a 360 °C. A digestão nitroperclórica (ácido nítrico e ácido perclórico 6:1, v:v) a 180 °C foi usada para extração total de Cu, Zn e Mn.

7.2.3 Inóculos micorrízicos e sementes

Os inóculos de *Rhizophagus clarus* e *Acaulospora colombiana* foram fornecidos pela Coleção Internacional de Cultura Glomeromycota (www.furb.br/cicg/index.php?lang=EN). Os FMAs foram multiplicados com *Brachiaria decumbens* como planta hospedeira em uma mistura de solo, areia e substrato comercial autoclavada (1:3:1; v:v:v). A contagem de esporos foi de 8,0 esporos/mL para *Rhizophagus clarus* e 3,0 esporos/mL para *Acaulospora colombiana*.

Uma vez que as normas ambientais exigem espécies nativas para revegetação de áreas degradadas, sementes de angico (*Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan) foram adquiridas da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (www.fepagro.rs.gov.br). Essa instituição fornece regularmente sementes a instituições de pesquisa para o desenvolvimento de trabalhos referentes a recuperação e restauração de solos degradados.

7.2.4 Semeadura e condições de crescimento

Na semeadura, o inóculo de FMA foi adicionado a 2,0 cm de profundidade, em quantidades de aproximadamente 200 esporos por tubete (Santos et al., 2017). Os controles não inoculados receberam 50 mL de uma suspensão filtrada de cada inóculo. Foi conduzido uma planta por tubete, constituindo a unidade experimental.

Uma solução nutritiva sem P foi adicionada semanalmente (20 mL) (Hoagland e Arnon, 1950). O solo foi mantido em cerca de 70% da capacidade de campo, adicionando água destilada. A temperatura média do ar na estufa foi de 27,7 °C durante todo o experimento.

7.2.5 Variáveis quantificadas

O índice SPAD (soil plant analysis development) foi obtido a partir de três folhas do terço médio de cada planta com um clorofilômetro digital (Minolta SPAD modelo 502). Para quantificar as clorofilas (a, b, total) e carotenóides, foram coletadas amostras de 100 mg de folhas da parte central das plantas e incubadas durante 2 horas a 65 °C com 7,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). O volume total foi ajustado para 10 mL e a absorbância foi medida por espectrofotometria (Pro-análise, modelo V1600) (Hiscox e Israelstam, 1979). As clorofilas foram quantificadas usando as equações de Wellburn (1994).

Após 90 dias, a altura das plantas (H) e o diâmetro do caule (DC) foram medidos e a parte aérea foi separada da raiz. As raízes foram lavadas sequencialmente com água da torneira, solução de ácido

etilenodiamina tetracético (EDTA 0,02 mol L⁻¹) e água destilada. A colonização micorrízica foi realizada em microscópio de luz (McGonigle et al., 1990) após o clareamento e coloração (Koske e Gemma, 1989). A parte aérea e raízes das plantas foram secos e pesados. Foram determinadas a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e massa seca total (MST), que foram utilizados para calcular o índice de qualidade Dickson (IQD) (Dickson et al., 1960), da seguinte forma:

$$IQD = MST(g) / [(H (cm) / DC (mm)) + (MSPA (g) / MSR (g))] \quad (1)$$

O material seco foi submetido à digestão nitroperclórica para determinar Cu, Zn e Mn totais, ou a digestão sulfúrica para quantificar macronutrientes totais na parte aérea conforme descrito acima (Tedesco et al., 1995).

O potencial de fitorremediação foi representado pelo acúmulo total (A_T), eficiência na remediação (ER) e pelo fator de bioacumulação (FB) de Cu, Zn e Mn utilizando as seguintes equações (Mani et al., 2016):

$$A_T = (\text{Metal}_{MS} \times MS) \quad (2)$$

$$ER = ((\text{Metal}_{MSPA} \times MSPA) / (\text{Metal}_{\text{solo}} \times \text{Peso}_{\text{solo}})) \quad (3)$$

$$FB = (\text{Metal}_{MSPA} / \text{Metal}_{\text{solo}}) \quad (4)$$

Onde Metal_{MSPA}: metal na massa seca da parte aérea (mg kg⁻¹); MS: massa seca da parte aérea (g); Metal_{solo}: metal no solo (mg kg⁻¹) e Peso_{solo}: peso do solo por tubete (g).

A proteína total relacionada à glomalina (PSRG-T) foi medida com o ensaio de Bradford (Bradford, 1976), modificado de acordo com Wright e Upadhyaya (1998). Resumidamente, foram removidos 1,0 g de solo rizósferico (solo em contato com raízes) com pincel e colocados em um tubo falcon (15 mL) com 8,0 mL de citrato de sódio (50 µmol), que foi autoclavado durante 1 hora a 121 °C, com centrifugação subsequente a 1,888 x g. O processo foi repetido até o sobrenadante apresentar coloração amarelo claro (Wu et al., 2014).

7.2.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando diferenças significativas foram detectadas, as médias foram

separadas com o teste de Tukey ($p < 0,05$). Utilizou-se o software SISVAR (Ferreira et al, 2000), e os gráficos foram gerados com SigmaPlot, versão 12.5. Quando necessário, os resultados foram transformados para atender aos pressupostos ANOVA.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Caracterização dos substratos

A adição de rejeito ao solo de área de mineração aumentou o teor de areia do substrato (Tabela 1).

Tabela 1. Frações granulométricas e atributos químicos de solo sem (-rejeito) e com adição de rejeito de mineração de carvão (+rejeito), 30 dias após a adubação fosfatada e esterilizado em autoclave.

Atributo	Unidade	- rejeito	+ rejeito
Areia	g kg ⁻¹	268 ±1,1 ⁽¹⁾	354 ±4,2
Silte	g kg ⁻¹	454 ±2,9	389 ±7,2
Argila	g kg ⁻¹	278 ±1,5	257 ±3,0
pH _{H2O}	-	4,4 ±0,05	4,1 ±0,04
Al	cmol _c kg ⁻¹	6,2 ±0,1	5,6 ±0,3
COT	g kg ⁻¹	19,6 ±1,1	25,8 ±0,13
N _{total}	g kg ⁻¹	0,5 ±0,03	0,4 ±0,01
P _{resina}	mg kg ⁻¹	77 ±3,7	82 ±5,3
P _{extraível}	mg kg ⁻¹	132 ±9,9	134 ±3,61
K _{extraível}	mg kg ⁻¹	60 ±2,1	44 ±0,4
Cu _{extraível}	mg kg ⁻¹	7,1 ±0,3	11,1 ±0,36
Mn _{extraível}	mg kg ⁻¹	58 ±1,1	64 ±2,2
Zn _{extraível}	mg kg ⁻¹	34 ±2,3	42,1 ±2,49
Cu _{total}	mg kg ⁻¹	50 ±7,1	51 ±3,2
Mn _{total}	mg kg ⁻¹	411 ±8,5	419 ±9,2
Zn _{total}	mg kg ⁻¹	256 ±9,2	242 ±9,3

COT= carbono orgânico total.

⁽¹⁾Desvio médio padrão, n = 3,0.

A textura do solo pode influenciar direta e indiretamente nos processos fisiológicos e bioquímicos de multiplicação celular (Letey, 1985). A menor resistência mecânica em solos arenosos está relacionada com maior disponibilidade de oxigênio, água e nutrientes, o que resulta em melhor crescimento das plantas (Gubiani et al., 2013). A adição de rejeito ao solo diminuiu o pH e o K extraível e aumentou os teores de

metais pesados (Tabela 1), que estavam acima dos valores de referência estabelecidos pela legislação (CETESB, 2016). Desta forma, apesar de aumentar os teores de metais pesados e reduzir o pH do meio, a adição de rejeito melhorou a textura para o adequado crescimento das raízes e maior crescimento das plantas.

7.3.2 Colonização micorrízica e glomalina total

Mesmo com número similar de esporos fornecidos em todos os tratamentos inoculados (200 esporos), a colonização das raízes de plantas inoculadas com *R. clarus* (~80%) foi duas vezes maior que aquela das mudas inoculadas com *A. colombiana* (~40%). O inóculo de *R. Clarus*, comparado ao de *A. colombiana*, pode ter contido maior quantidade de micélio extra-radicular e fragmentos de raízes colonizadas, que promovem maior potencial de inóculo micorrízico (PIM) (Rubin e Stürmer, 2015). A adição do rejeito ao solo não afetou a colonização por *R. clarus*, por outro lado reduziu em 6% a colonização por *A. colombiana* (Figura 1A).

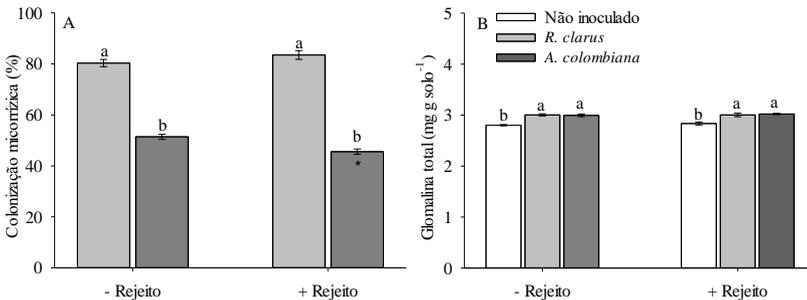


Figura 1. Colonização micorrízica (A), glomalina total (B) e peso de nódulos secos (D) em mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com *Rhizophagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*.

¹Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo efeito da inoculação (Teste tukey, $p < 0,05$, $n = 12$). *Efeito significativo do rejeito dentro de cada nível de inoculação (teste *F*, $p < 0,05$, $n = 12$).

Ao comparar o efeito destes FMAs no crescimento de videiras jovens em solo com altos níveis de Cu, Ambrosini et al. (2015) também observaram maior colonização das raízes com *R. clarus*, em comparação

a *A. colombiana*. Patreze e Cordeiro (2004) verificaram que 60% das raízes de *P. rigida* foram colonizadas com FMAs nativos em solos do Cerrado brasileiro com baixa fertilidade. Esses resultados permitem inferir que *P. rigida* possui alta associação micorrízica, e que o *R. clarus* é mais tolerante a altos teores de metais pesados que *A. colombiana* (Meyer et al., 2016). Portanto, a associação com esses dois fungos pode ser promissora para ser utilizada em programas de recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão (Stoffel et al., 2016).

A presença de PSRG-T nos tratamentos sem inoculação de FMAs (Figura 1B) pode ser devida ao método utilizado. Janos et al. (2008) sugerem que o método para determinação da glomalina do solo proposto por Wright e Upadhyaya (1998) e utilizado neste trabalho, é capaz de extrair um “pool” de proteínas relacionadas à glomalina (PSRG-T), inferindo que nem toda a proteína extraída por este método seja glomalina. No entanto, ficou demonstrado o efeito da inoculação, pois os maiores teores de PSRG-T foram encontrados na rizosfera das plantas inoculadas, e os teores não diferiram entre as espécies de FMAs, independentemente da adição do rejeito (Figura 1B). A proteína total do solo relacionada à glomalina (PSRG-T) pode adsorver e reduzir a disponibilidade desses metais na solução do solo e sua absorção pelas plantas, fato que também pode ter contribuído para o crescimento de mudas inoculadas (Cornejo et al., 2008).

7.3.3 Crescimento de plantas e qualidade de mudas

A inoculação micorrízica favoreceu o crescimento das plantas em ambos os substratos (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E). O aumento da biomassa radicular promovida pelos FMAs é de grande importância para mudas destinadas à revegetação de áreas degradadas. Nesses solos de baixa fertilidade, o incremento do volume radicular aumenta a absorção de água e nutrientes, o que pode favorecer a sobrevivência das plantas em campo. Sugai et al. (2011) também verificaram incremento no sistema radicular de mudas de angico inoculadas com FMAs, o que resultou em aumento da área foliar. Deste modo, a colonização por fungos micorrízicos ($r=0,298$, $P<0,05$) e a produção de glomalina na rizosfera ($r=0,369$, $P<0,05$) tiveram correlação positiva com o índice de Dickson, que estima a qualidade das mudas (Figura 2F).

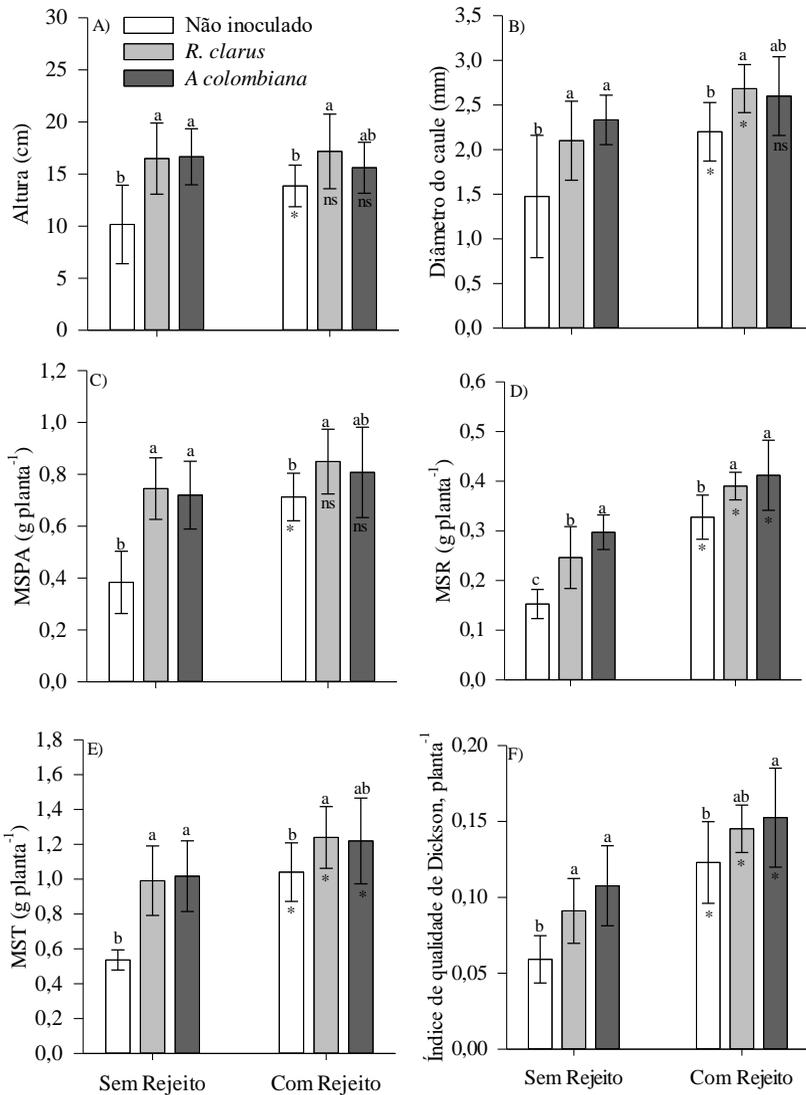


Figura 2. Altura (A), diâmetro do caule (B), massa seca da parte aérea - MSPA (C), massa seca da raiz - MSR (D), massa seca total - MST (E) e Índice de qualidade de Dickson (F) de mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com *Rhizopagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*.

¹Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo efeito da inoculação (Teste tukey, $p < 0,05$, $n=12$). *Efeito significativo do rejeito dentro de cada nível de inoculação (teste F , $p < 0,05$, $n=12$).

O índice de Dickson foi maior em plantas inoculadas com *A. colombiana*, as quais apresentaram qualidade cerca de 10% superior, mas não diferiram daquelas cultivadas com *R. clarus* em substrato com rejeito (Figura 2F). Além de exsudar glomalina na rizosfera (Figura 1 B), a colonização micorrízica pode favorecer o crescimento das mudas em solo contaminado por desencadear diferentes mecanismos e processos metabólicos de fitoproteção. Estudos sugerem que a inoculação de FMAs pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes em plantas submetidas a condições de estresse (Andrade et al., 2010; Tisserant et al., 2013). Esse complexo enzimático é produzido para degradar as espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 e OH) e evitar a peroxidação das membranas dos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (Ahmad, 2014). Um estudo sobre o genoma de *R. irregularis* identificou mais de 30 genes potencialmente codificadores de enzimas antioxidantes (Tisserant et al., 2013). Os genes *GintSOD1* e *GintSOD2*, podem codificar a síntese da superóxido dismutase (SOD), que são reconhecidamente responsáveis por aliviar o estresse de plantas cultivadas em solo contaminado. Andrade et al. (2010) verificaram que a inoculação de *G. etunicatum* (Glomeraceae) aumentou os teores de catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase nas folhas de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. (Leguminosae), o que contribuiu para o crescimento das plantas em solo contendo altos teores de Cu.

7.3.4 Índice SPAD, clorofilas e carotenóides

A colonização micorrízica aumentou o índice SPAD nas mudas em substrato sem rejeito (Tabela 2). Por outro lado, a inoculação não teve efeito significativo sobre a produção de pigmentos fotossintéticos ($P < 0,05$), exceto para plantas inoculadas com *R. clarus* em substrato sem rejeito, cujos teores foram menores que os demais tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Índice SPAD, clorofila (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl Total), e carotenóides (Carot.) em mudas de angico cultivadas em casa de vegetação, em solo com ou sem rejeito de mineração de carvão, e não inoculado ou inoculado com *Rhizophagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*

	Ni-R	Rc-R	Ac-R	Ni+R	Rc+R	Ac+R
SPAD	19,7 b ¹	22,7 ab	25,8 a	24,8 a*	22,9 a	23,5 a

Cv=21,5%							
	µg mL						
Chl a	15,8 a	17,4 a	18,1 a	19,8 ab*	17,1 b	20,5 a	
Cv=17,9%							
Chl b	5,77 a	5,99 a	6,28 a	6,82 a*	6,12 a	7,08 a	
Cv=16,6							
Chl total	21,6 a	23,4 a	24,3 a	26,6 a*	23,3 a	27,5 a	
Cv=18,5							
Carot.	3,69 a	3,89 a	3,80 a	4,43 a*	4,00 a	4,53 a*	
Cv=17,3							

Ni= Não inoculado; Rc= *Rhizophagus clarus*; Ac= *Acaulospora colombiana*; -R= sem rejeito; +R= com rejeito; Cv= coeficiente de variação.

¹Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo efeito da inoculação (Teste tukey, $p < 0.05$, $n = 12$). *Efeito significativo do rejeito dentro de cada nível de inoculação (teste F , $p < 0.05$, $n = 12$).

A colonização favoreceu a produção de carotenoides em plantas cultivadas no substrato com rejeito (Tabela 2). As correlações positivas do teor de carotenoides com o acúmulo de Zn e Mn na parte aérea e raízes contribuem para explicar a melhor qualidade de mudas (Figura 2F).

Além dos mecanismos já citados de fitoproteção, carotenóides são metabólitos secundários associados a mecanismos de tolerância das plantas e possuem um papel fitoprotetor contra espécies reativas de oxigênio (ROS). Moléculas como β -caroteno, luteína e neoxantina foram identificadas por extinguir o ânion superóxido, evitando a peroxidação de lipídeos na membrana celular em folhas de plantas sob condições de estresse metálico (Artetxe et al., 2002). Hristozkova et al. (2016) demonstraram que a colonização por *Claroideoglosum claroideum* aumentou os teores de carotenóides em *Calendula officinalis* L. Neste trabalho, as maiores concentrações destas moléculas foram verificadas em plantas inoculadas com *A. colombiana* em substrato com rejeito, o que pode ter prevenido a peroxidação de lipídeos e melhorado a qualidade das mudas (Figura 2F).

7.3.5 Acúmulo de Cu, Zn e Mn na parte aérea e raiz

A adição de rejeito ao solo aumentou o acúmulo de Cu, Zn e Mn nos tecidos das plantas (Figura 3), o que indica maior disponibilidade desses elementos no substrato com rejeito (Tabela 1). O acúmulo de Cu na parte aérea do angico teve correlação positiva com a colonização micorrízica ($r = 0,701$, $P < 0,05$), e as plantas inoculadas com *R. clarus* acumularam cerca de 68% mais Cu do que os demais tratamentos (Figura

3). Esse resultado mostra que a associação entre *P. rigida* e *R. clarus* pode ser promissora para programas de fitoextração de Cu.

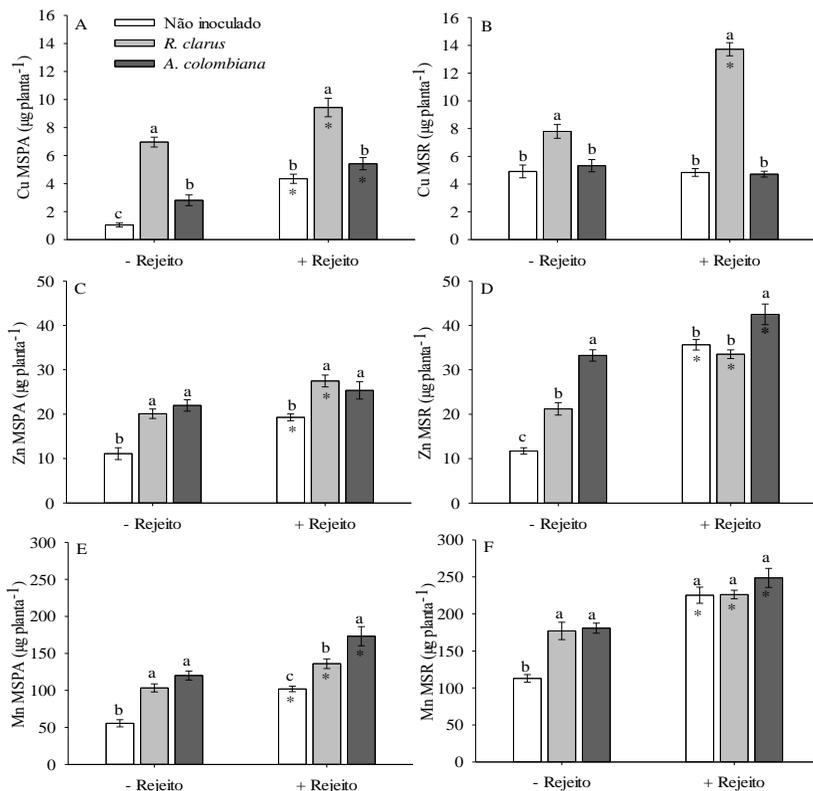


Figura 3. Acúmulo de Cu na massa seca da parte aérea - MSPA (A), Cu na massa seca da raiz - MSR (B), Zn na MSPA (C), Zn na MSR (D), Mn na MSPA (E) e Mn na MSR (F) de mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com *Rhizophagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*.

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo efeito da inoculação (Teste tukey, $p < 0,05$, $n = 12$). *Efeito significativo do rejeito dentro de cada nível de inoculação (teste F, $p < 0,05$, $n = 12$).

Teores acima de 20 mg kg^{-1} no tecido vegetal podem causar toxidez para algumas espécies (Kabata-Pendias, 2011). Apesar de as plantas inoculadas com *R. clarus* terem absorvido até 35 mg kg^{-1} de Cu, esse FMA pode ter desencadeado mecanismos de tolerância, como a

complexação deste elemento na molécula de glomalina (Figura 1B), além do sistema de enzimas antioxidantes (Andrade et al., 2010; Tisserant et al., 2013; Ahmad, 2014) que reduzem estresse. Andrade et al. (2010) sugerem que FMAs como *Glomus etunicatum* (Glomeraceae) podem induzir a produção de moléculas de fitoquelatinas, capazes de complexar e compartimentalizar o Cu no vacúolo celular. Esse aparato fitoprotetor desencadeado pelo *R. clarus* pode ter garantido a qualidade das mudas, apesar de terem acumulado mais Cu do que aquelas inoculadas com *A. colombiana* ou não inoculadas (Figura 3A).

A colonização micorrízica aumentou a absorção e acúmulo de Zn nos tecidos das plantas (Figuras 3B e C), mas os teores não ultrapassaram 100 mg kg⁻¹, nível considerado fitotóxico para a maioria das espécies vegetais (Kabata-Pendias, 2011). Apesar de a inoculação com *A. colombiana* ter aumentado o acúmulo de Zn nas raízes em média 36 e 66% no substrato sem rejeito, e 21 e 16% no substrato com rejeito em relação aos tratamentos *R. clarus* e controle, respectivamente, a maior parte desse elemento permaneceu nas raízes e não foi translocado para a parte aérea (Figuras 3B e C). Santos et al. (2017) obtiveram dados semelhantes em *E. contortisiliquum* inoculadas com esse FMA. Esse resultado indica um possível mecanismo específico desencadeado por *A. colombiana*, o qual regula a translocação do Zn da raiz para a parte aérea das plantas. Os resultados sugerem que a inoculação de *P. rigida* com a espécie *A. colombiana* pode ser uma alternativa promissora para programas de fitoestabilização de Zn.

A colonização micorrízica correlacionou-se positivamente com o acúmulo de Mn na parte aérea ($r=0,419$, $P<0,05$) e nas raízes ($r=0,250$, $P<0,05$) das plantas (Figuras 3D e E). No substrato com rejeito, plantas inoculadas com *A. colombiana* acumularam 21 e 41% mais Mn na parte aérea do que as plantas inoculadas com *R. clarus* e controle, respectivamente. Apesar da maior absorção, os teores desse elemento não foram superiores àqueles considerados fitotóxicos (>400 mg kg⁻¹) para a maioria das plantas (Kabata-Pendias, 2011), o que não comprometeu o crescimento das mudas.

7.3.6 Acúmulo de fósforo

As mudas inoculadas com FMAs absorveram e acumularam mais fósforo na parte aérea em relação às plantas do tratamento controle (Figura 4). Esse acúmulo foi significativamente maior no tratamento sem rejeito, esses resultados demonstram que a inoculação pode favorecer a

absorção de P, principalmente em substratos compactados e com baixa fertilidade (Figura 4).

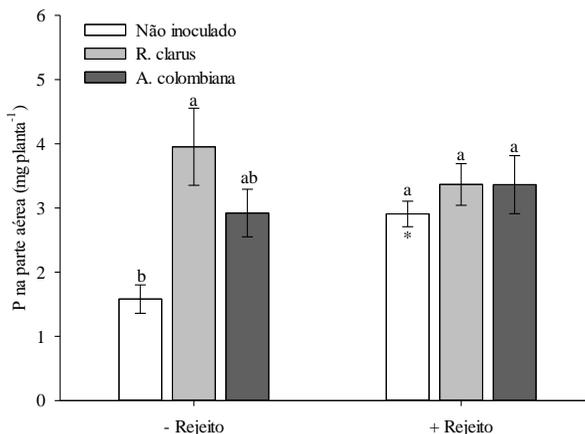


Figura 4. Acúmulo de P na massa seca da parte aérea de mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com *Rhizophagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*.

¹Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo efeito da inoculação (Teste tukey, $p < 0,05$, $n = 12$). *Efeito significativo do rejeito dentro de cada nível de inoculação (teste F , $p < 0,05$, $n = 12$).

Esse benefício desencadeado pelos FMAs pode ser considerado um mecanismo de fitoproteção, tendo em vista que íon fosfato pode formar complexos com elementos traço nas raízes, evitando a translocação (Santos et al., 2017). De acordo com Gonçalves et al. (2012), o P é o nutriente que mais limita o crescimento de *P. rigida*, cujos teores adequados nos tecidos variam de 1 a 2,8 g kg⁻¹, que são inferiores aos valores quantificados neste estudo, os quais variaram de 3,75 a 4,61 g kg⁻¹.

7.3.7 Eficiência na remediação e fator de bioacumulação

A inoculação micorrízica teve correlação positiva com a eficiência da remediação ($r = 0,486$, $P < 0,05$) e com o fator de bioacumulação de Cu ($r = 0,342$, $P < 0,05$) (Figura 5A). Plantas inoculadas com *R. clarus* apresentaram maior eficiência da remediação e fator de bioacumulação de Cu, superando em 42 e 55% os valores encontrados em plantas

inoculadas com *A. colombiana* e não inoculadas, respectivamente. A alta colonização por *R. clarus* pode ter levado a um aumento da superfície de absorção de P e Cu (Figura 1A). O *R. clarus* já se mostrou eficiente em aumentar absorção e acúmulo de Cu na parte aérea de plantas (Ambrosini et al., 2015; Stoffel et al., 2016; Santos et al., 2017). Esses resultados indicam que esse FMA possui potencial para a fitoextração de Cu em solos contaminados.

A inoculação das plantas afetou os índices de eficiência de remediação e de bioacumulação de metais. A colonização micorrízica teve correlação positiva com a eficiência da remediação e fator de bioacumulação de Zn ($r=0,586$, $P<0,05$ e $r=0,557$, $P<0,05$) (Figuras 5B e C).

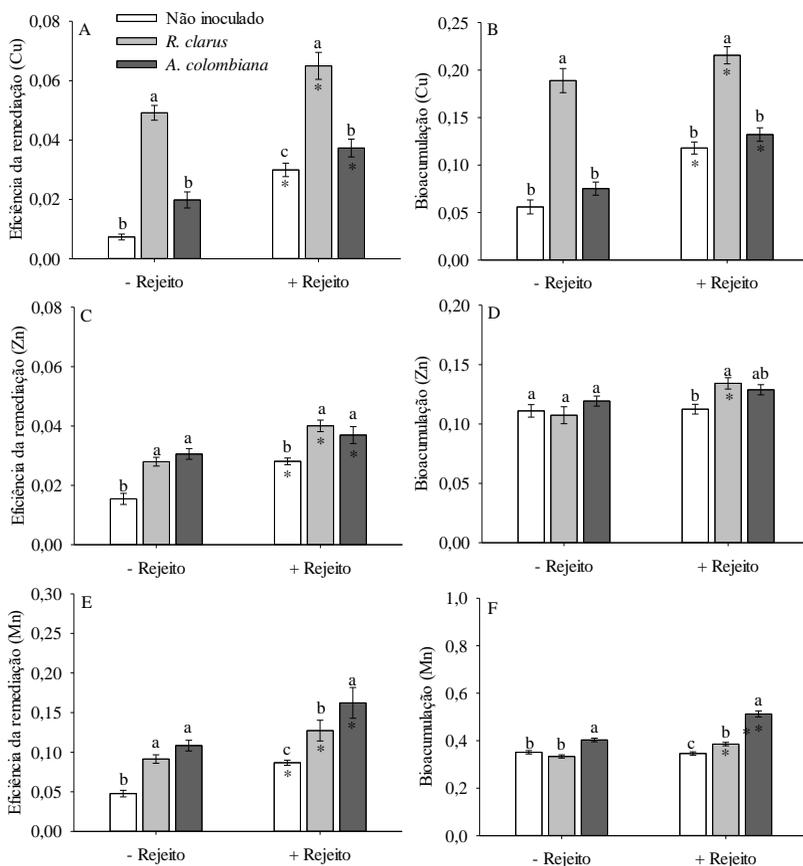


Figura 5. Eficiência na remediação do Cu (A), bioacumulação de Cu (B), eficiência da remediação do Zn (C), bioacumulação do Zn (D), eficiência na remediação de Mn (E) e bioacumulação de Mn (F) em mudas de angico, cultivadas em casa de vegetação, em solo sem e com rejeito de mineração de carvão e não inoculado ou inoculado com *Rhizophagus clarus* ou *Acaulospora colombiana*.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo efeito da inoculação (Teste tukey, $p < 0,05$, $n = 12$). *Efeito significativo do rejeito dentro de cada nível de inoculação (teste F , $p < 0,05$, $n = 12$).

Em substrato com rejeito, houve aumentos de 30 e 20% na eficiência da remediação e 16 e 12% no fator de bioacumulação de Zn em plantas inoculadas com *R. clarus* ou *A. colombiana*, respectivamente, em

relação ao controle. De fato, as plantas inoculadas com *A. colombiana* translocaram menos Zn da raiz para a parte aérea (Figura 3C). Santos et al. (2017) encontraram índice de translocação de Zn de 0,48 e 0,15 em plantas de *E. contortisiliquum* inoculadas com *R. clarus* e *A. colombiana*, respectivamente. Neste trabalho este índice foi de 1,08 e 0,78 em plantas inoculadas com *R. clarus* e *A. colombiana*, respectivamente. Por isso, a inoculação de *P. rigida* com *A. colombiana* deve ser preferencialmente indicada em programas de fitoestabilização de Zn, pois retém esse elemento nas raízes, e previne a translocação para a parte aérea.

Plantas inoculadas com FMAs tiveram maiores eficiências da remediação e fator de bioacumulação de Mn em relação ao controle (Figuras 5E e F). No substrato com rejeito as plantas inoculadas com *A. colombiana* apresentaram valores 21 e 47%, e 24 e 32% maiores de eficiência na remediação e fator de bioacumulação que aquelas inoculadas com *R. clarus* e controle, respectivamente.

Os valores da eficiência na remediação e do fator de bioacumulação de Cd podem chegar a 8,10 e 49,7 em solo fortemente contaminado por este metal (Mani et al., 2016). Considerando que o solo deste estudo é moderadamente contaminado (Tabela 1), os valores encontrados foram maiores que os descritos por Fuksova et al. (2009), que relataram valores de eficiência de remediação e fator de bioacumulação de Pb em *Thlaspi caerulescens* (0,01 e 0,06) e em *Salix dasyclados* (0,012 e 0,011) em solo com o mesmo nível de contaminação. Os resultados deste estudo indicam que a eficiência da remediação depende da associação planta-FMA e do nível de contaminação do metal a ser remediado no solo.

Os resultados indicam que o angico vermelho tem potencial para uso em programas de fitorremediação e revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão. A colonização micorrízica aumenta o acúmulo de fósforo e também os teores de proteínas do solo relacionadas à glomalina, havendo ainda aumento de pigmentos fotossintéticos e de crescimento de plantas em solo contaminado. A inoculação com *R. clarus* ou *A. colombiana* promove maior acúmulo de Zn e Mn, e houve maior acúmulo e eficiência na remediação de Cu em plantas inoculadas com *R. Clarus*. Isso demonstra que este fungo possui potencial para uso em programas de fitoextração desse metal. Por outro lado, plantas inoculadas com *A. colombiana* acumularam mais Zn nas raízes, evidenciando seu potencial de uso para a fitoestabilização. Plantas inoculadas com *A. colombiana* obtiveram maior acúmulo e eficiência na remediação de Mn, evidenciando seu potencial de uso em programas de fitoextração de Mn.

7.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹British Petroleum - BP statistical review of world energy: 2016; 2016 Jun 5 [accessed 2016 Oct 21]. <https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2016/bp-statistical-review-of-world-energy-2016-full-report.pdf>>.
- ²Meyer E, Londoño DMM, Armas RD, Giachini AJ, Rossi MJ, Stoffel SCG, Soares CRFS. Arbuscular mycorrhizal fungi in the growth and extraction of trace elements by *Chrysopogon zizanioides* (vetiver) in substrate containing coal mining wastes. *Int J Phytoremediation*. 2016;19(2):113-120. doi: 10.1080/15226514.2016.1207596.
- ³Santos ML, Soares CRFS, Comin, JJ, Lovato, PE. The phytoprotective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong in soil containing coal-mine tailings. *Int J Phytoremediation*. 2017;19(12):1100-1108. doi: 10.1080/15226514.2017.1328390.
- ⁴Stoffel SCG, Armas RD, Giachini AJ, Rossi MJ, Gonzalez D, Meyer E, Nicoleite CH, Rocha-Nicoleite E, Soares CRFS. Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas contendo rejeito de mineração de carvão. *Cerne*. 2016;22(2):181-188. doi: 10.1590/01047760201622021969
- ⁵Fernández S, Poschenrieder C, Marcenò C, Gallego JR, Jiménez-Gámez D, Bueno A, Afif E. Phytoremediation capability of native plant species living on Pb-Zn and Hg-As mining wastes in the Cantabrian range, north of Spain. *J Geochem Explor*. 2016;xx(x):xxx-xxx. doi: 10.1016/j.gexplo.2016.05.015.
- ⁶Gonçalves EO, Paiva, HN, Neves JCL, Gomes JM. Nutrição de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan submetidas a doses de N, P, K, Ca e Mg. *Revista Árvore*. 2012;36(2):219-228.
- ⁷Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and application. *Chemosphere*. 2013;91(1):869-881. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.075.
- ⁸Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal symbiosis*. New York (NY): Elsevier; 2008.
- ⁹Wu Z, McGrouther K, Huang J, Wu P, Wu W, Wang H. Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration: Field experiment. *Soil Biol Biochem*. 2014;68(1):283-290. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.10.010.

- ¹⁰Mani D, Kumar C, Patel NK. Integrated micro-biochemical approach for phytoremediation of cadmium and lead contaminated soils using *Gladiolus grandiflorus* L cut flower. *Ecotox Environ Safe*. 2016;124(1):435-446. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.016.
- ¹¹He L, Yang H, Yu Z, Tang J, Xu L, Chen X. Arbuscular mycorrhizal fungal phylogenetic groups differ in affecting host plants along heavy metal levels. *J Environ Sci*. 2014;26(2):2034-2040. doi: 10.1016/j.jes.2014.07.013.
- ¹²Yu J, Xue Z, He X, Liu C, Steinberger Y. Shifts in composition and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin contents during revegetation of desertified semiarid grassland. *Appl Soil Ecol*. 2017;115(1):60-67. doi: 10.1016/j.apsoil.2017.03.015.
- ¹³Schweiger R, Baier MC, Persicke M, Müller C. High specificity in plant leaf metabolic responses to arbuscular mycorrhiza. *Nat Commun*. 2014;5(1):1-11. doi: 10.1038/ncomms4886.
- ¹⁴Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre (RS): UFRGS; 1995.
- ¹⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Rio De Janeiro (RJ): Embrapa Solos; 1997.
- ¹⁶Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. Decisão de Diretoria n 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016: Valores Orientadores para Solos e Aguas Subterraneas no Estado de São Paulo – 2016; 2016 Nov 22. [accessed 2017 Mar 22]. <http://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/11/2014/12/DD-256-2016-E-Valores-Orientadores-Dioxinas-e-Furanos-2016-Intranet.pdf>.
- ¹⁷Hoagland DR, Arnon DI. The water culture method for growing plants without soil. California (CA): California Agricultural Experimental Station; 1950.
- ¹⁸Hiscox JD, Israelstam GF. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot*. 1979;57(12):1332-1334. doi: 10.1139/cjfr-2015-0106.
- ¹⁹Wellburn A R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*. 1994;144(3):307-313. doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
- ²⁰McGonigle TP, Miller, MH, Evans DG, Fairchild GL. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol*. 1990;115(3):127-133. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x.

- ²¹Koske RE, Gemma JN. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res.* 1989;92(4):486-505. doi: 10.1016/S0953-7562(89)80195-9.
- ²²Dickson A, Leaf AL, Hosner JF. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *Forestry Chron.* 1960;36(1):10-13. doi:10.5558/tfc36010-1.
- ²³Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- ²⁴Wright SF, Upadhyaya AA. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* 1998; 198(1):97-107. doi: 10.1023/A:1004347701584.
- ²⁵Ferreira DF. *Sistemas de análise estatística para dados balanceados: DEX: Sisvar.* Lavras (MG): UFLA; 1998.
- ²⁶Ter Braak CJF, Smilauer P. *Canoco reference manual and user's guide to Canoco for Windows: Software for canonical community ordination (version 4.5).* New York (NY): Elsevier; 1998.
- ²⁷Letey J. *Advances in soil science: Relationship between soil physical properties and crop production.* New York (NY): Springer-Verlag; 1985.
- ²⁸Gubiani PI, Reichert JM, Reinert DJ. Indicadores hídrico-mecânicos de compactação do solo e crescimento de plantas. *R Bras Ci Solo.* 2013;37(2):1-10.
- ²⁹Rubin JGKR, Stürmer SL. Potencial de inóculo micorrízico e importância do comprimento do micélio para a agregação do solo de ambiente fluvial. *R Bras Ci Solo.* 2015;39(1):59-68. doi: 10.1590/01000683rbc20150466.
- ³⁰Ambrosini VG, Voges JG, Canton L, Couto RR, Ferreira PAA, Comin JJ, Melo GWB, Brunetto G, Soares CRFS. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on young vines in copper-contaminated soil. *Braz J Microbiol.* 2015;46(4):1045-1052. doi: 10.1590/S1517-838246420140622.
- ³¹Patrzeze CM, Cordeiro L. Nitrogen-fixing and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. *Forest Ecol Manag.* 2004;196(1):275-285. doi: 10.1016/j.foreco.2004.03.034.
- ³²Janos DP, Garamszegi S, Beltran B. Glomalin extraction and measurement. *Soil Biol Biochem.* 2008;40(3):728-739. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.10.007.

- ³³González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA. The role of glomalin, a protein produced by mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ Pollut.* 2004;130(3):317–323. doi: 10.1016/j.envpol.2004.01.004.
- ³⁴Cornejo P, Meier S, Borie G, Rilling MC, Borie F. Glomalin related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci Total Environ.* 2008;15(1-2):154–160. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.07.045.
- ³⁵Chern ECW, Tsai DW, Gunseitan OA. Deposition of glomalin related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environ Sci Technol.* 2007;41(10):3566–3572. doi: 10.1021/es0628598.
- ³⁶Sugai MAA, Collier LS, Saggin-Júnior OJ. Inoculação micorrízica no crescimento de mudas de angico em solo do cerrado. *Bragantia.* 2011;70(2):416-423. doi: 10.1590/S0006-87052011000200024.
- ³⁷Andrade SAL, Gratão PL, Azevedo RA, Silveira APD, Schiavinato MA, Mazzafera P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environ Exp Bot.* 2010;68(1):198-207. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.11.009.
- ³⁸Ahmad P. *Oxidative Damage to Plants*. California (CA): Elsevier; 2014.
- ³⁹Tisserant, E et al. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *P Natl Acad Sci USA.* 2013;110(50):20117-20122. doi: 10.1073/pnas.1313452110.
- ⁴⁰Artetxe U, Garcia-Plazoala JL, Hernández A, Becerril JM. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiol Bioch.* 2002;40(10):859-863. doi: 10.1016/S0981-9428(02)01446-8.
- ⁴¹Hristozkova M, Geneva M, Stancheva I, Boychinova M, Djonova E. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in attenuation of heavy metal impact on *Calendula officinalis* development. *App Soil Ecol.* 2016;101(1):57-63. doi: 10.1016/j.apsoil.2016.01.008.
- ⁴²Kabata-Pendias A. *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton (FL): CRC; 2011.
- ⁴³Fuksova Z, Szakova J, Tlustos P. Effects of co-cropping on bioaccumulation of trace elements in *Thlaspi caerulescens* and *Salix dasyclados*. *Plant Soil Environ.* 2009;55 (11):461–467.

**8 CAPÍTULO III - MECANISMOS DE FITOPROTEÇÃO
LIGADOS A MICORRÍZAS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS EM *E. contortisiliquum* EM SOLO
CONTAMINADO**

8 MECANISMOS DE FITOPROTEÇÃO LIGADOS A MICORRÍZAS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM *E. contortisiliquum* EM SOLO CONTAMINADO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e bactéria fixadora de nitrogênio (BFN) no crescimento da timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*) e nos mecanismos fisiológicos de fitoproteção em solo contendo rejeito de mineração de carvão. Um experimento em câmara de crescimento foi realizado com quatro tratamentos de inoculação: não inoculado, inoculado com FMAs (*Rhizophagus clarus* + *Acaulospora colombiana*), bactéria fixadora de nitrogênio (BFN) ou FMAs + BFN em quatro substratos contendo 0, 15, 30 e 60% de rejeito. Após 45 dias, as mudas foram coletadas para quantificar a produção de massa seca, a taxa de colonização micorrízica e o acúmulo de P e N na parte aérea. No material fresco foram quantificadas as atividades de catalase, superóxido dismutase e glutatona redutase, além dos teores de fitoquelatinas (PC2, PC3 e PC4) nas raízes e parte aérea. A adição de 60% de rejeito ao substrato aumentou 20 e 80% a colonização por FMAs e BFN respectivamente, que por sua vez aumentam a biomassa de *Enterolobium contortisiliquum*, devido ao aumento dos teores de P e N na parte aérea, em solo contaminado com metais pesados. A inoculação conjunta de *R. clarus* e *A. colombiana* aumenta a fitoextração de Cu e a fitoestabilização de Zn e Mn do solo. A inoculação de *R. clarus* + *A. colombiana*, associada ou não com BFN, aumenta os teores de proteínas solúveis totais e as atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona. Os FMAs aumentam a concentração das fitoquelatinas PC3 e PC4 nos tecidos, complexando principalmente o Zn e Mn nas raízes, evitando a translocação e a toxidez das mudas. A inoculação de *R. clarus* e *A. colombiana* em *E. contortisiliquum* associada ou não com BFN, possui potencial de uso em programas de fitorremediação e revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão e contaminados com metais pesados, pois além de tolerar os solos contaminados, retém parte desses elementos nos tecidos.

8.1 INTRODUÇÃO

A fitorremediação é uma técnica viável, ambiental e economicamente, para remediar e recuperar os solos contaminados por metais pesados (Wan et al., 2016). Em tais solos, as plantas podem acumular teores de metais pesados acima daqueles considerados normais para a maioria das espécies (Kabata-Pendias, 2011). Isso pode gerar altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em mitocôndrias (respiração), cloroplastos (fotossíntese) e peroxissomas (Mittler, 2002), o que leva ao estresse oxidativo de membranas, desencadeando distúrbios bioquímicos e moleculares irreversíveis, danos às células e mesmo sua morte (Mittler, 2002; Demidchik, 2015; Mittler, 2016).

Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong (timbaúva) é uma espécie arbórea leguminosa nativa do Brasil que tolera solos com altos teores de metais pesados, o que lhe confere potencial para utilização em programas de fitorremediação. Essa espécie apresenta associação com diferentes microrganismos promotores de crescimento (Moura et al., 2015; Hernandez et al., 2017; Santos et al., 2017), que favorecem o crescimento dessa espécie em solos contaminados (Santos et al., 2017).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são responsáveis por aumentar a absorção de fósforo (P), nitrogênio (N) e outros nutrientes essenciais para o crescimento das plantas em solos degradados, com baixa fertilidade e contaminados. O P faz parte da estrutura da parede celular, ácidos nucleicos e é fundamental no processo bioquímico de fosforilação para armazenamento de energia (ATP) a partir da fotossíntese (fosforilação fotossintética) e respiração (fosforilação oxidativa) (Rodak et al., 2016).

Os benefícios das bactérias fixadoras de nitrogênio (BFNs) estão principalmente relacionados com o acúmulo de nitrogênio na biomassa vegetal (N). Uma vez que o N é o principal componente de proteínas, hormônios, ácidos nucleicos, cisteína, glutatona e enzimas antioxidantes (Etesami, 2018), os benefícios da inoculação conjunta de diferentes microrganismos simbioses vão além da melhoria do estado nutricional. Dentre os mecanismos envolvidos pode-se citar a síntese de enzimas antioxidantes e fitoquelatinas (Tisserant et al., 2013; Armada et al., 2016).

Enzimas antioxidantes aumentam a tolerância das plantas em solos contaminados por acelerar a degradação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e reduzir os danos celulares (Lateff, 2011). Além de aumentar o acúmulo de nutrientes, a inoculação pode estimular a síntese de enzimas

responsáveis pela degradação de EROs e aumentar a tolerância das plantas ao estresse. Mais de 30 genes com potencial de induzir a síntese desse complexo enzimático foram identificados em plantas inoculadas com FMAs (Tisserant et al., 2013). Dentre essas enzimas destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona redutase (GR) (Armada et al., 2016). Espécie como *G. mosseae* induziram a formação de enzimas antioxidantes em plantas de pimenta (Latef, 2011) e *R. clarus* teve efeito similar em crotalária (Ferreira et al., 2015), em ambos os casos em solo contaminado por Cu.

A síntese de fitoquelatinas (PCs) é outro mecanismo de fitoproteção desencadeado pelos microrganismos em plantas cultivadas em solos contaminados (Andrade et al., 2010). Elas são sintetizadas a partir da glutatona reduzida (GSH), através da enzima fitoquelatina sintase que promove a ligação entre glutamato-cisteína-glicina - (γ -Glu-Cis)_n-Gly – sendo _n tipicamente variável de 2-4 (Aborode et al., 2016). As PCs são reconhecidamente capazes de se ligar a cátions metálicos no citosol e transportá-los para o vacúolo (Meharg, 2003), o que ameniza a toxidez e o estresse. A inoculação com *G. etunicatum* aumentou a produção de PC2 e PC3 em feijão-de-porco cultivado em solo contaminado com Cu (Andrade et al., 2010). Apesar dessas informações, poucos estudos foram conduzidos visando elucidar a capacidade de FMAs e BFN em aumentar a tolerância em plantas submetidas ao estresse metálico.

O objetivo deste estudo foi avaliar como a inoculação com FMAs e BFN afeta o crescimento vegetal e a produção de moléculas responsáveis pelo alívio do estresse em *E. contortisiliquum* cultivada em solo de área de mineração de carvão contaminado com metais pesados.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Desenho experimental

O estudo foi conduzido durante 45 dias em sala de cultivo com temperatura de 25 ± 2 °C e radiação fotossinteticamente ativa de $150 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Usaram-se tubetes de polipropileno com capacidade de 300 cm^3 de substrato para o cultivo. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado com 8 repetições, constituindo um fatorial 4x4, sendo quatro tratamentos de inoculação (controle não inoculado; inoculado com bactéria; com fungos micorrízicos; ou com bactéria + fungos micorrízicos) e quatro níveis de rejeito de mineração adicionado ao solo (0, 15, 30 e 60%).

8.2.2 Substratos utilizados

O solo e o rejeito foram coletados em uma área de mineração na Região Carbonífera de Criciúma – Santa Catarina - Brasil (28°35'16.21”S e 49°26'48.43”O), na camada 0-20 cm de profundidade e peneirados em malha de 4,0 mm.

Após a adição da dose de P na forma de superfosfato triplo equivalente a 150 mg kg de P, os substratos foram homogeneizados, adicionados aos tubetes e autoclavados duas vezes com intervalos de 48 h. No momento da semeadura foram coletadas três amostras aleatórias de cada substrato para caracterização físico-química. A distribuição granulométrica foi feita pelo método da pipeta (EMBRAPA, 1997). As frações Cu, Zn e Mn foram extraídas por HCl 0,1 mol L⁻¹ e o carbono orgânico total foi determinado pelo método Walkley-Black (Tedesco et al., 1995). A digestão sulfúrica do solo foi realizada para quantificação dos teores totais de P e N, enquanto a digestão nitroperclórica foi adotada para a determinação dos teores totais de Cu, Zn e Mn, conforme Tedesco et al. (1995).

8.2.3 Material biológico

Os isolados de *Rhizopagus clarus* (SCT720A) e *Acaulospora colombiana* (SCT115A) foram obtidos junto à Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota da Universidade Regional de Blumenau (FURB). Amostras do inóculo (mistura de 1:1) foram utilizadas para quantificação de esporos, que foi de 13/mL.

A bactéria diazotrófica utilizada foi *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 6159 – BR 4406), recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011), e fornecida pela EMBRAPA AGROBIOLOGIA. O inóculo foi multiplicado em meio extrato de levedura e manitol líquido (Vincent, 1970).

As sementes de timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.), adquiridas na FEPAGRO – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Estação Experimental de Santa Maria-RS, foram submetidas a quebra de dormência por imersão em ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄ P.A., 15 minutos), seguida de duas lavagens em água destilada (Fowler e Bianchetti, 2000).

8.2.4 Semeadura e crescimento

No momento da sementeira, foi adicionado a cada tubete, a 2,0 cm de profundidade, um volume do inóculo de FMA contendo esporos (200 por vaso) e pedaços de hifas (Santos et al. 2017). Aproximadamente 50 mL do filtrado de cada inóculo foram aplicados nos tratamentos sem FMA, com a finalidade de manter o balanço microbiano em todos os tratamentos. Em seguida, foram colocadas três sementes de timbaúva por tubete. Aos quinze dias após a emergência foi realizado o raleio, permanecendo uma plântula por tubete e foi adicionado 1,0 mL do inóculo de rizóbio por planta. Semanalmente foram adicionados 20 mL por tubete de solução Hoagland e Arnon (1950) sem P e sem N. O solo foi mantido a aproximadamente 70% da capacidade de campo com adição de água destilada.

8.2.5 Coleta das plantas

Aos 45 dias, quatro repetições de cada tratamento foram avaliadas quanto à altura (H) e diâmetro do caule (DC). As raízes foram lavadas em água de torneira, solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e água destilada. O material vegetal foi colocado em estufa (60°C) até massa constante para pesagem da parte aérea (MSPA) e raiz (MSR). Quatro repetições de cada tratamento foram imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e colocadas em ultracongelador a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

8.2.6 Nódulos e colonização micorrízica

Os nódulos foram contados, secos em estufa (60°C) e pesados. A colonização micorrízica foi quantificada pelo método descrito por McGonigle et al. (1990) após clareamento e coloração com azul de tripano (Koske e Gemma, 1989).

8.2.7 Nutrientes e metais no tecido

O tecido seco foi submetido a digestão sulfúrica (1:2; peróxido de hidrogênio:ácido sulfúrico) para determinação de Ca, Mg, N, P e K na MSPA e digestão nitroperclórica (1:6; ácido perclórico:ácido nítrico) para determinação de Cu, Zn e Mn na MSPA e na MSR (Tedesco et al., 1995). Os teores de Ca, Mg, Cu, Zn e Mn foram quantificados em espectrofotômetro de absorção atômica, enquanto os teores de P e K foram determinados em espectrofotômetro e fotômetro de chama,

respectivamente. O N na MSPA foi quantificado pelo método micro-Kjedahl (Tedesco et al., 1995).

8.2.8 Proteínas totais e estresse oxidativo nas folhas

A quantificação de peróxido de hidrogênio nas folhas foi feita como descrito por Alexieva et al. (2001). Resumidamente, uma amostra de 200 mg de material vegetal foi macerado com nitrogênio líquido e homogeneizado em 2,0 mL de 0,1% de ácido tricloroacético. O material foi centrifugado a 15.000 x g (15 min, 4 °C). Para a análise as amostras receberam uma solução de 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) contendo 1M de KI. Após 10 minutos no escuro as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm. A concentração de peróxido de hidrogênio foi calculada a partir de curva padrão com concentrações conhecidas de H₂O₂.

Para extração das proteínas totais e enzimas antioxidantes, amostra de 200 mg de material vegetal de cada unidade experimental foi macerada com nitrogênio líquido e homogeneizado em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA), 3 mM DL-dithiothreitol (DTT) e 2% de polivinilpirrolidona (PVP) (Azevedo et al., 1998). O material foi centrifugado a 15.000 x g (30 min, 4 °C). A quantificação das proteínas totais foi realizada em espectrofotômetro a 590 nm, usando soro albumina bovina (BSA) como padrão (Bradford, 1976). O restante do sobrenadante foi coletado e armazenado para a análise de enzimas antioxidantes.

A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada a partir da capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (azul de nitrotetrazólio cloreto) descrito por Giannopolitis e Reis (1977). Adicionaram-se 50 µL de extrato bruto em 2,95 mL de solução fosfato de potássio (50 mM; pH 7,8) contendo 13 mM de metionina, 75 µM de NBT, 100 nM EDTA e 2 µM de riboflavina. Após 15 minutos a 10 centímetros da luz fluorescente de 15W (25 °C), a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a atividade da enzima necessária para a inibição de 50 % da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em U mg⁻¹ proteína.

A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada a partir de uma mistura de 50 µL de extrato bruto e 2,95 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,5) contendo 2,5 µL de H₂O₂ (30%) à 25 °C (Azevedo et al., 1998). A atividade foi monitorada durante 2,0 minutos em espectrofotômetro a 240 nm, utilizando o coeficiente de extinção

molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ prot.

A glutationa redutase (GR; EC 1.6.4.2) foi determinada adicionando 50 μL de extrato bruto em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,5) contendo 1 mM de 5'5 dithiobis, 1 mM de glutationa oxidada e 0,1 mM de NADPH (Azevedo et al., 1998). A absorbância foi monitorada durante 2,0 minutos em espectrofotômetro a 412 nm, utilizando um coeficiente de extinção molar de $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

8.2.9 Fitoquelatinas

Para extração e determinação das fitoquelatinas (PCs) foram utilizados os métodos descritos por Hunaiti et al. (2003) com modificações. Resumidamente, uma amostra de 500 mg de tecido fresco foi macerada com nitrogênio líquido, homogeneizada em 1,0 mL de ácido perclórico (60%) e agitada em vortex (1,0 minuto). O material foi centrifugado a $15,000 \times g$ (20 min, 4°C). O sobrenadante foi filtrado duas vezes (25 μm) e 10 μL do extrato injetado em HPLC (Shmadzu HPLC System, Kyoto, Japan). Para separação das fitoquelatinas PC2, PC3 e PC4 utilizou-se a coluna C_{18} octadecyl-3 (ODS-3, Phenomenex, 250 X 4,6 mm, 30°C) e o detector com absorbância de 214 nm. A fase móvel constou de 0,1% ácido trifluoracético (TFA) (solvente A) e 80% acetonitrila em 0,1% TFA (v:v) (solvente B) em gradiente linear com fluxo de 1,0 mL por minuto. Moléculas sintéticas de PC2, PC3 e PC4 (AnaSpec, Fremont, CA, USA) foram utilizadas como padrão para curva e tempo de retenção na coluna.

8.2.10 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando detectadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$) utilizando-se o software SISVAR (Ferreira, 2000). Os gráficos foram gerados utilizando o software SigmaPlot versão 12.5.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Caracterização dos substratos

A adição de 60% de rejeito aumentou em 30, 80 e 15% os teores de areia, carbono e fósforo extraível no substrato, respectivamente,

comparado ao tratamento controle (sem rejeito), (Tabela 1). Essas mudanças podem ter propiciado melhor colonização das raízes e crescimento das plantas, mas por outro lado, aumentaram em 70, 55 e 45% os teores de Cu; Zn e Mn extraíveis, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição granulométrica e atributos químicos do substrato com 0; 15; 30 e 60% de rejeito de mineração de carvão, 24 horas após a fertilização de 150 mg kg⁻¹ de P (como superfosfato triplo) e esterilização em autoclave.

Parâmetro		0	15	30	60
Areia	g kg ⁻¹	350±7,9 ⁽¹⁾	361±1,9	429±6,9	527±3,8
Silte	g kg ⁻¹	507±6,0	477±1,9	394±7,6	303±2,5
Argila	g kg ⁻¹	143±2,1	162±3,9	177±0,7	170±1,3
pH _{H2O}	-	4,10±0,5	4,28±0,3	3,96±0,1	3,72±0,4
COT	g kg ⁻¹	8,79±1,2	19,8±1,7	25,7±1,2	44,1±3,1
Nitrogênio _{tot}	g kg ⁻¹	0,49±0,1	0,93±0,1	0,77±0,2	1,19±0,1
Alumínio	cmol _c kg ⁻¹	4,20±0,1	3,27±0,3	3,53±0,1	3,63±0,3
Fósforo _{Mehlich-1}	mg kg ⁻¹	36,4±1,9	42,5±1,7	40,7±1,1	42,9±0,4
Fósforo _{total}	mg kg ⁻¹	79,0±2,9	86,1±3,7	95,8±7,2	116,9±4
Potássio	mg kg ⁻¹	13,5±0,5	14,0±0,8	18,5±2,5	25,0±1,0
Cobre _{HCl}	mg kg ⁻¹	8,61±1,3	13,5±2,8	28,4±1,9	30,9±2,6
Zinco _{HCl}	mg kg ⁻¹	23,1±1,1	25,6±2,4	32,6±0,4	49,1±1,9
Manganês _{HCl}	mg kg ⁻¹	61,2±4,6	79,0±3,1	95,1±5,5	107±11
Cobre _{total}	mg kg ⁻¹	27,6±0,6	40,7±5,5	50,6±2,5	54,6±3,7
Zinco _{total}	mg kg ⁻¹	49,3±1,7	60,1±2,4	63,8±2,5	79,9±3,4
Manganês _{total}	mg kg ⁻¹	86,1±1,5	98,2±3,9	126±3,1	183±3,6

COT: Carbono orgânico total.

⁽¹⁾Desvio médio padrão.

8.3.2 Crescimento

De maneira geral a inoculação com BFN, FMA ou com ambos incrementou a biomassa das plantas em todas as doses de rejeito testadas (Figuras 1A e B).

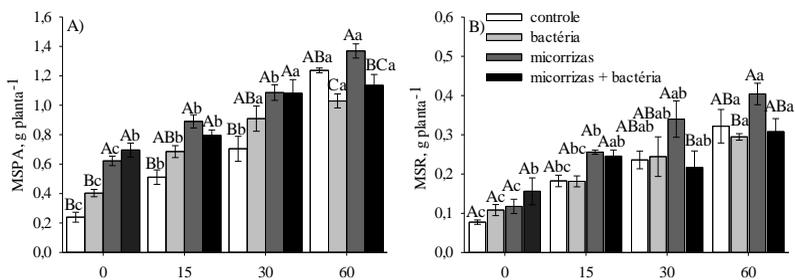


Figura 1. Massa seca da parte aérea (A) e massa seca da raiz (B) de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) ou BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si no efeito da inoculação e minúsculas não diferem no efeito do rejeito. (Teste Tukey; $p < 0,05$; $n = 4$).

A maior produção de massa seca foi obtida com mudas cultivadas no substrato com 60% de rejeito e inoculadas com FMAs (Figuras 1A e B). Portanto, mesmo contendo maior teor de metais pesados, o substrato com maior teor de rejeito pode ter propiciado maior absorção de água e nutrientes pelas plantas, o que levou a maior crescimento.

8.3.3 Colonização micorrízica e nodulação

A adição de rejeito esteve ligada a aumentos na colonização micorrízica e na nodulação (Figuras 2A e 2B), exceto para o peso de nódulos quando inoculado conjuntamente com FMAs (Figura 2B).

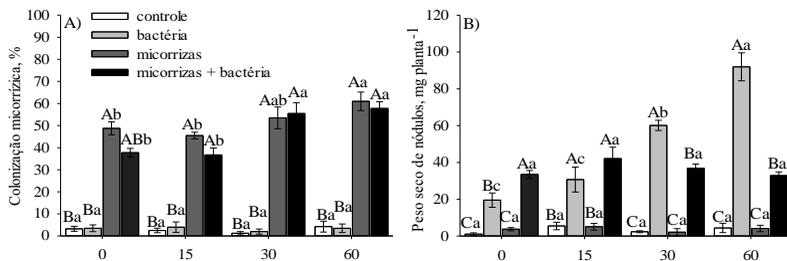


Figura 2. Colonização micorrízica (A) e peso seco de nódulos (B) em raízes de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) ou BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.

timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si no efeito da inoculação e minúsculas não diferem no efeito do rejeito. (Teste Tukey; $p < 0,05$; $n = 4$).

A colonização por FMAs e a massa de nódulos nas raízes de plantas cultivadas no substrato contendo 60% de rejeito foram cerca de 20 e 80%, maiores, respectivamente, em comparação aos valores observados no substrato sem rejeito (Figura 2).

De maneira geral a colonização micorrízica foi favorecida quando os FMA foram inoculados separadamente, embora esse efeito somente tenha sido significativo no substrato sem rejeito (Figura 2A). Por outro lado, a inoculação conjunta favoreceu a colonização por bactérias nos substratos contendo 0 e 15% de rejeito, enquanto a inoculação isolada resultou em maior peso de nódulos nas doses de 30 e 60% deste material no substrato.

8.3.4 Acúmulo de fósforo e nitrogênio nas plantas

Os FMAs favoreceram o acúmulo de P, mas esse efeito somente foi significativo no substrato sem rejeito (Figura 3A), o que pode estar relacionado ao menor crescimento de raízes e maior dependência micorrízica para a absorção desse nutriente.

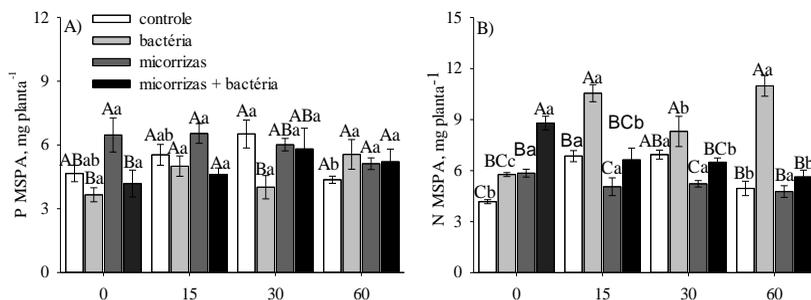


Figura 3. Acúmulo de fósforo (A) e nitrogênio (B) na parte aérea de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si no efeito da inoculação e minúsculas não diferem no efeito do rejeito. (Teste Tukey; $p < 0,05$; $n = 4$).

Plantas inoculadas com BFN acumularam mais N nas folhas das mudas se comparadas àquelas não inoculadas (Figura 3B). O tratamento em que as plantas mais acumularam esse nutriente foi com 60% de rejeito inoculado com BFN ($10,98 \text{ mg kg}^{-1}$), e esses dados relacionam-se ao maior peso de nódulos (Figura 2B).

8.3.5 Teores de metais pesados nos tecidos

A absorção de Cu pelas plantas aumentou com o aumento de rejeito no substrato, principalmente pelo aumento do teor desse elemento nas raízes, que foram cerca de seis vezes superiores àqueles quantificados na parte aérea (Tabela 1, Figuras 4A e 4B).

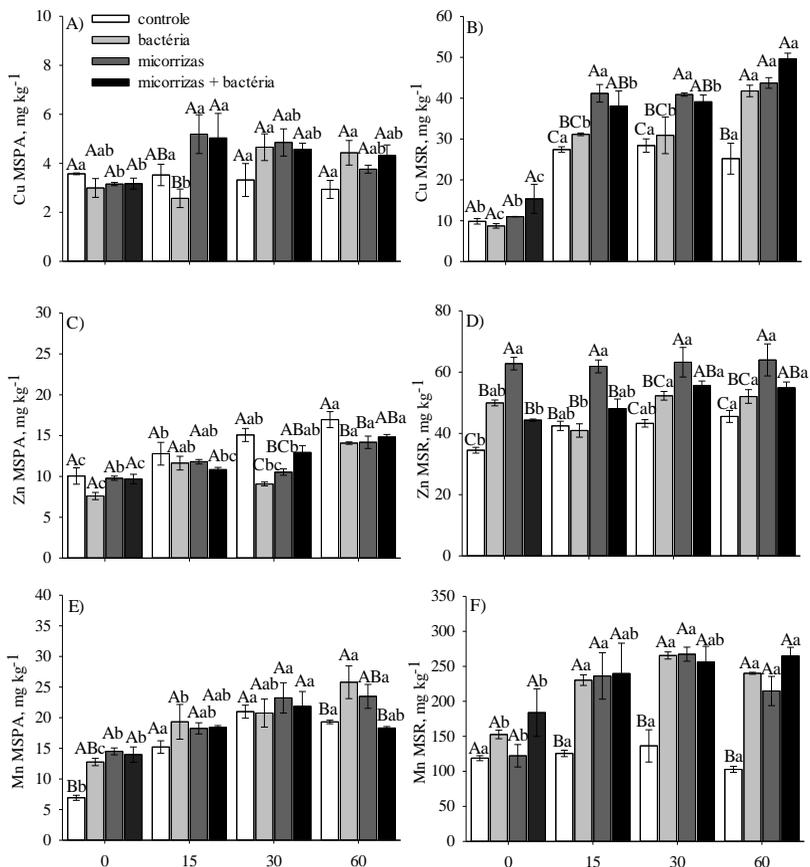


Figura 4. Cu na massa seca na parte aérea - MSPA (A), Cu na massa seca da raiz - MSR (B), Zn na MSPA (C), Zn na MSR (D), Mn na MSPA (E) e na Mn na MSR (F) em timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si no efeito da inoculação e minúsculas não diferem no efeito do rejeito. (Teste Tukey; $p < 0,05$; $n = 4$).

No substrato sem rejeito as plantas inoculadas com FMA obtiveram um índice de translocação (razão entre o teor na parte aérea e na raiz) de Cu de 0,28, enquanto no substrato contendo 60% de rejeito

esse valor foi de 0,08 (Tabela 2). Isso indica que em solos fortemente contaminados por Cu, principalmente quando inoculada com FMA, a timbaúva tende a desenvolver mecanismos para acumular mais Cu nas raízes, reduzindo o estresse e aumentando a tolerância das plantas.

Comparados com as mudas do tratamento sem rejeito, os teores de Zn na parte aérea das mudas aumentaram à medida que aumentou a dose de rejeito adicionada ao substrato. No substrato com 30 e 60% de rejeito as plantas não inoculadas acumularam mais Zn na parte aérea que aquelas inoculadas (Figuras 4C). Nas raízes, os maiores teores desse elemento foram encontrados nas plantas inoculadas com FMA, mas elas translocaram menos Zn das raízes para a parte aérea que aquelas não inoculadas (Tabela 2). Por exemplo, com 60% de rejeito o índice de translocação de Zn em plantas não inoculadas foi de 0,37, enquanto que naquelas inoculadas com FMA esse índice foi de 0,22 (Tabela 2). Tais dados indicam que a inoculação dos FMAs reduz a translocação de Zn e pode amenizar o estresse das plantas.

Tabela 2. Índice de translocação de Cu, Zn e Mn em mudas de timbaúva cultivadas em casa de vegetação, com ou sem inoculação de FMAs e BFN, em substrato com 0; 15; 30 e 60% de rejeito de mineração de carvão.

	0 %	15 %	30 %	60 %
Cu				
controle	0,36 Aa	0,12 Ab	0,11 Ab	0,11 Ab
bactéria	0,30 Aa	0,08 Ab	0,15 Ab	0,10 Ab
micorrizas	0,28 ABa	0,12 Ab	0,11 Ab	0,08 Ab
micorrizas + bactéria	0,20 Ba	0,13 Aab	0,11 Ab	0,08 Ab
Cv%	27,86			
Zn				
controle	0,29 Ab	0,30 Aab	0,34 Aab	0,37 Aa
bactéria	0,15 BCb	0,28 ABa	0,17 BCb	0,27 Bab
micorrizas	0,15 Cb	0,19 Cab	0,16 Cb	0,22 Ba
micorrizas + bactéria	0,21 ABa	0,22 BCa	0,23 Ba	0,27 Ba
Cv%	16,54			
Mn				
controle	0,05 Bc	0,12 Ab	0,15 Aab	0,18 Aa
bactéria	0,08 ABa	0,08 Aa	0,07 Ba	0,10 Ba
micorrizas	0,11 Aa	0,07 Aa	0,08 Ba	0,10 Ba
micorrizas + bactéria	0,07 ABa	0,07 Aa	0,08 Ba	0,06 Ba
Cv%	26,28			

FMA: fungos micorrízicos arbusculares (*R. clarus* + *A. colombiana*); BFN: bactéria fixadora de nitrogênio (*B. elkanii*). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si no efeito da inoculação e minúsculas na linha não diferem no efeito do rejeito. (Teste Tukey; $p < 0,05$; $n = 4$).

Houve maior concentração de Mn na parte aérea nas maiores doses de rejeito, mas o efeito da inoculação foi observado principalmente no substrato sem rejeito (Figuras 4E). As mudas inoculadas tenderam a apresentarem maiores teores de Mn nas raízes, porém houve menor translocação desse metal para a parte aérea, principalmente nas doses 30% e 60% de rejeito no substrato (Tabela 2).

8.3.6 H₂O₂, proteínas e enzimas antioxidantes

As plantas inoculadas produziram mais proteínas solúveis totais (Figura 5A), o que está ligado ao maior teor de N na MSPA (Figura 3B), sendo claro o efeito da inoculação com BFN. O aumento da dose de rejeito está associado a maior formação de H₂O₂ nas folhas de plantas não inoculadas ou inoculadas com a BFN (Figura 5B).

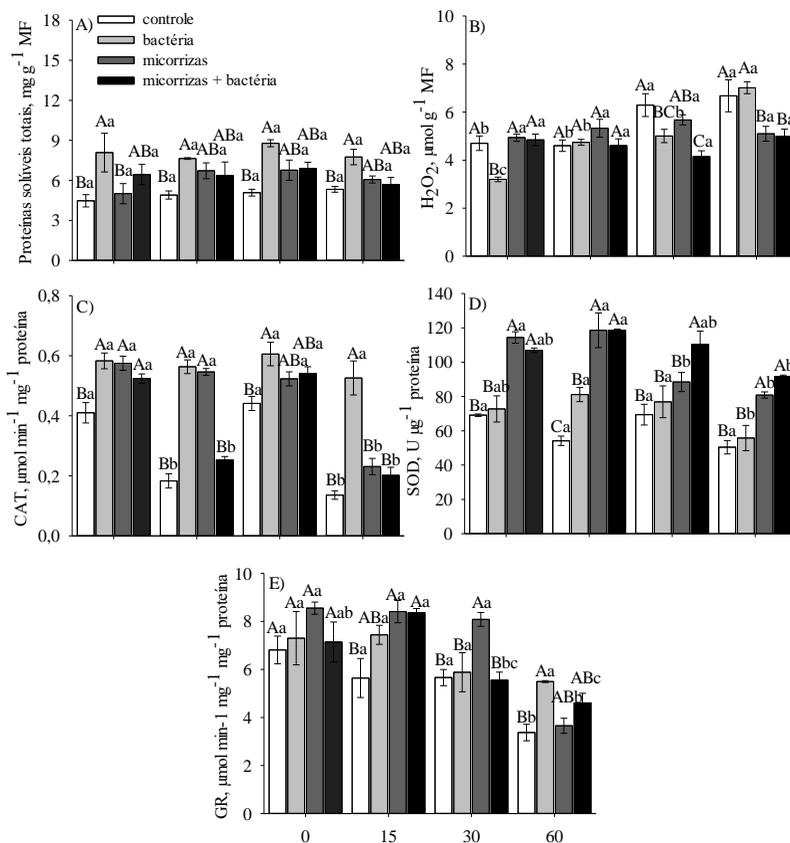


Figura 5. Proteínas solúveis totais nas folhas (A), H₂O₂ nas folhas (B), CAT – catalase (C), SOD – superóxido dismutase (D) e GR – glutationa redutase (GR) na parte aérea de timbáúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMAs (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si no efeito da inoculação e minúsculas não diferem no efeito do rejeito. (Teste Tukey; p < 0,05; n = 4).

O efeito da inoculação sobre a concentração de peróxido de hidrogênio foi significativo nos substratos contendo 30 e 60% de rejeito, concentrações em que o teor de H₂O₂ foi maior. Com 60% de rejeito a menor produção de H₂O₂ foi observada nas folhas das plantas do

tratamento BFN+FMA, sendo 25% inferior do que nas plantas do controle não inoculado (Figura 5B). Esse resultado indica que a inoculação pode amenizar os efeitos do estresse, e isso está ligado ao menor transporte de metais pesados da raiz para parte aérea (Tabela 2).

Houve maior atividade da catalase (CAT) nas folhas das plantas cultivadas no substrato sem rejeito (Figura 5C). Considerando todos os substratos, as plantas inoculadas com BFN apresentaram atividade 25% maior que no tratamento não inoculado. No entanto só houve efeito significativo dos FMAs nas doses de 0 e 15% de rejeito (Figura 5C).

A colonização micorrízica separada ou conjuntamente com BFN aumentou a atividade da superóxido dismutase (SOD) em todas as doses de rejeito (Figura 5D). Considerando todas as doses testadas, o aumento da atividade da SOD em plantas inoculadas com FMAs ou FMA+BFN foi cerca de 60 e 55% maior que nos tratamentos não inoculado e inoculado com BFN, respectivamente. Isso indica que a inoculação dos fungos testados nessa espécie de planta pode aumentar a síntese da SOD e amenizar o estresse oxidativo.

As mudas inoculadas produziram mais glutathione redutase (GR) se comparadas às mudas do tratamento controle (Figura 5E) nos tratamentos com os diferentes níveis de rejeito. Nas folhas de plantas inoculadas com FMA, BFN ou FMA+BFN foram quantificadas atividade da GR 25, 18 e 16% maior, respectivamente, que em folhas das plantas não inoculadas.

8.3.7 Fitoquelatinas

De maneira geral os microrganismos testados causaram aumentos na síntese de PCs nas folhas e raízes de timbaúva (Figuras 6A, B, C, D, E, F).

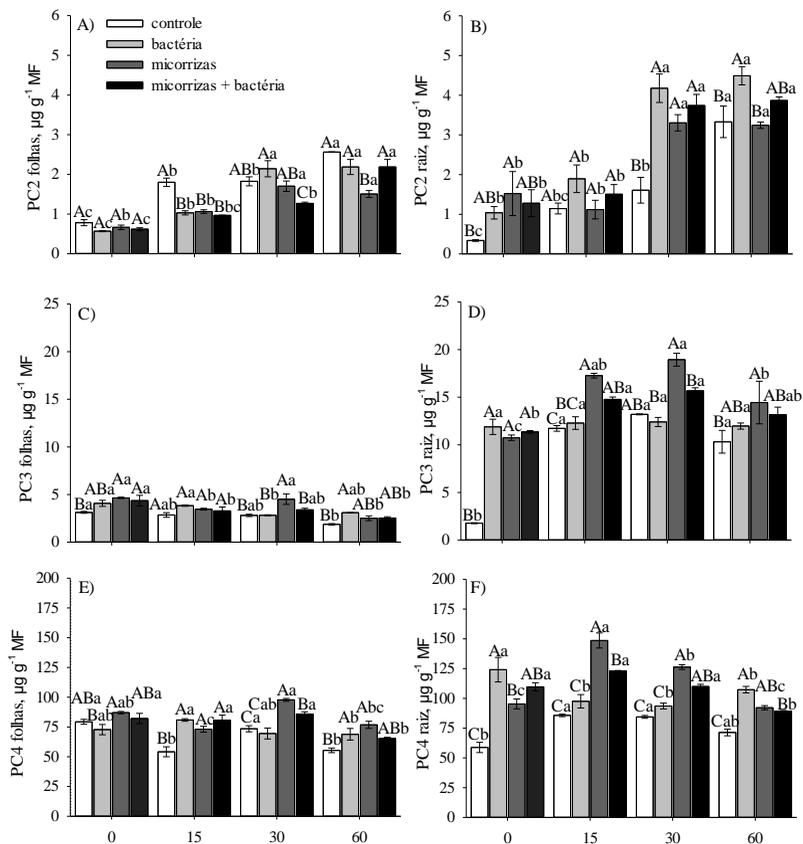


Figura 6. Fitoquelatina (PC) - PC2 na folha (A), PC2 na raiz (B), PC3 na folha (C), PC3 na raiz (D), PC4 na folha (E) e PC4 na raiz (F) de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (controle) ou inoculada com FMA (*R. clarus*+*A. colombiana*) e BFN (*B. elkanii*) ou FMA+BFN.

¹Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si no efeito da inoculação e minúsculas não diferem no efeito do rejeito. (Teste Tukey; $p < 0,05$; $n = 3$).

A síntese de PC2 foi maior nas maiores doses de rejeito, indicando que em maiores concentrações de metais no substrato a planta é induzida a sintetizar essa molécula para amenizar os efeitos do estresse. A

inoculação com FMA, BFN ou FMA+BFN não aumentou a concentração de PC2 nas folhas em relação ao tratamento controle (Figura 5A). No entanto, a inoculação com FMA ou BFN aumentou os teores de PC3 nas folhas (Figura 5C). Esse incremento foi mais marcado nas maiores doses de rejeito, principalmente quando inoculadas com FMA, que tiveram 40% mais PC3 que as plantas não inoculadas (Figura 5C). A maior produção de PC4 nas folhas foi encontrada em plantas inoculadas com FMA (115,5 $\mu\text{g g MF}^{-1}$), as quais sintetizaram 35% mais PC4, se comparada às mudas não inoculadas (Figura 5E).

De maneira geral a inoculação das plantas com os microrganismos testados propiciou aumento de 38% na síntese de PC2 nas raízes quando comparadas àquelas plantas do tratamento controle (Figura 5B). Em plantas inoculadas com FMA houve aumentos de 23 e 22%; enquanto a inoculação com BFN o incremento foi de 22 e 10% nos teores de PC3 e PC4 em relação às raízes das plantas do tratamento controle, respectivamente (Figuras 5D e F).

8.4 DISCUSSÃO

A adição de rejeito aumentou o teor de areia do substrato (Tabela 1), o crescimento das plantas (Figura 1) e a colonização das raízes pelos microrganismos (Figura 2). Para Latey (1985), a textura e a densidade do solo são fatores que atuam indiretamente no crescimento das plantas, pois irão influenciar no teor de O_2 disponível, o qual é indispensável aos processos bioquímicos de multiplicação celular e acúmulo de biomassa. O substrato sem rejeito possivelmente estava compactado por causa do alto teor de argila, e isso pode ter inibido a colonização micorrízica e a absorção de nutrientes e, por consequência o crescimento das mudas (Entry et al., 2002; Santos et al., 2017). Substratos compactados induzem a planta a depositar suberina na epiderme das raízes, o que pode aumentar a resistência à colonização por fungos micorrízicos (Wilson & Robards, 1978; Koske e Gemma, 1995). Além disso, solo com baixa disponibilidade de O_2 podem inibir a germinação de esporos e a colonização micorrízica (Gaur e Adholeya, 2000).

De forma similar ao encontrado por Oliveira Junior (2017), não se constatou sinergia entre os efeitos dos dois microssimbiontes, porque a inoculação simultânea reduziu a colonização por FMA ou BFN. Apesar de o P ser um dos nutrientes mais concentrados nos nódulos (Rodak et al., 2016), pode inferir-se que a nodulação não é dependente da micorrização em solos com altos teores de P disponíveis, diferentemente do que foi observado em solos com baixos teores desse nutriente (Jesus et al., 2005).

De maneira geral a interação entre FMA e BFN promoveu o crescimento das plantas de timbaúva em todas as doses de rejeito em comparação com as plantas não inoculadas (Figura 1). Santos et al. (2017) também encontraram efeitos benéficos da interação destes microrganismos com essa espécie. Além de melhorar a capacidade das raízes em absorver P e promover a conversão do N₂ a amônia pela atividade da enzima nitrogenase (Figura 3), respectivamente, a inoculação de FMAs e BFN pode induzir a planta a melhorar aspectos fisiológicos e bioquímicos para o seu estabelecimento em solos contaminados (Glick, 2014; Jiang et al., 2016; Etesami, 2018).

Além da melhoria do estado nutricional, os FMAs aumentam a solubilização de fosfato, exsudam glomalina na rizosfera e ativam o sistema de enzimas antioxidantes (Jiang et al., 2016; Santos et al., 2017); enquanto as BFN produzem sideróforos, antibióticos e controlam a síntese de fitohormônios, como o etileno (Vimal et al., 2017). Plantas em condições de estresse tendem a acumular altas concentrações de etileno nas folhas, o que pode levar a senescência e a morte (Glick, 2014; Vimal et al., 2017). Estebani et al. (2018) observaram que plantas colonizadas por BFN tendem a sintetizar em maior quantidade a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase), responsável pela clivagem do ACC, precursor do etileno, e isso poderia reduzir o estresse em plantas cultivadas em solos contaminados. Dessa forma, a melhoria do estado nutricional das plantas inoculadas, juntamente com os demais mecanismos citados, pode ter contribuído para a maior tolerância e crescimento das mudas associadas aos microrganismos testados em solo contendo rejeito de mineração de carvão (Figura 1).

A interação tripartite também pode afetar a absorção de metais pesados e os efeitos destes na fisiologia das plantas (Huang et al., 2017; Etesami, 2018). Santos et al. (2017) concluíram que mudas de timbaúva inoculadas com *R. clarus* tem potencial para fitoextração de Cu; enquanto a associação com *A. colombiana* possibilita a fitoestabilização desse metal nas raízes, demonstrando diferentes efeitos das espécies de FMAs na fitoproteção ao metal pesado. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo (Tabela 2 e Figura 4). Apesar de não reduzir a translocação de Cu da raiz para a parte aérea (fitoextração), a inoculação com *R. clarus* + *A. Colombiana*, associada ou não à aplicação de *B. Elkanii*, induziu a produção de proteínas específicas para a síntese de enzimas antioxidantes nas folhas (Figura 5), o que está ligado à diminuição do estresse das plantas (Leonir et al., 2016; Etesami, 2018). *GmarCuZn-SOD1*, *GintSOD1* e *GintSOD2* são genes induzidos em

plantas inoculadas com FMAs, capazes de codificar proteínas envolvidas na síntese da SOD (Leonir et al., 2016). Outro FMA, o *G. Mosseae*, foi considerado responsável por induzir a codificação da SOD e CAT nas folhas de *P. alba* (Pallara et al., 2013). No presente trabalho, as plantas inoculadas com FMAs, BFN ou ambos aumentaram a produção de CAT, SOD e GR nas folhas (Figura 5C, D e F). Isso reduziu o teor de H_2O_2 (Figura 5B) e aumentou a tolerância para o crescimento das mudas (Figura 1), mesmo com teores de Cu nas raízes em níveis considerados fitotóxicos (Kabata-Pedias, 2011).

Houve menor índice de translocação de Zn e Mn que de Cu das raízes para a parte aérea (Tabela 2). Esse efeito já foi verificado para esta espécie em condições de crescimento similares. Santos et al. (2017) isolaram o fator inoculação em casa de vegetação e concluíram que a fitoproteção ao Zn pode estar associada à ação de fungos específicos, naquele caso a *A. colombiana*. Estudos recentes demonstraram que a absorção e a translocação de metais pesados dependem das espécies de plantas, dos FMAs e do elemento analisado (Merlos et al., 2016; Santos et al., 2017, Chaturvedi et al., 2018). Diferentemente do que foi verificado neste estudo, Gu et al. (2017) relataram que plantas de *Festuca arundinacea* inoculadas com *Funelliforme mosseae* apresentaram maior concentração de Zn na parte aérea, mas a inoculação com esse FMA reduziu a translocação de Pb, Cu e Cd, confirmando a hipótese de que a absorção e a translocação de metais pesados variam conforme a interação planta-FMAs utilizada.

Além de melhorar o estado nutricional (Figura 3) e induzir a síntese de enzimas antioxidantes (Figuras 5C, D e F), outros mecanismos de fitoproteção podem prevenir a translocação de Zn e Mn nas mudas de timbaúva. As inoculações com FMAs (Meharg, 2003; Ouziad et al., 2005; Andrade et al., 2010; Pallara et al., 2013; Leonir et al., 2016) e BFN (Etesami, 2018) podem aumentar a síntese de fitoquelatinas (PCs) nos tecidos das plantas inoculadas. Os FMAs e BFN podem ser a chave para a transcrição da fitoquelatina sintase, enzima responsável pela síntese das PCs nas folhas e raízes de plantas cultivadas em solos contaminados por metais pesados (Ouziad et al., 2005).

Neste estudo houve maior produção de fitoquelatinas nas raízes (Figura 6), o que pode estar associado à exposição direta e maior concentração de metais pesados nesse órgão do que na parte aérea da planta (Figura 3). Esse fato pode ter contribuído para a menor translocação, principalmente de Zn e Mn (Tabela 2), o que aumentou a tolerância e o crescimento das plantas em solo contaminado com rejeito de mineração (Tabela 1 e Figura 1). De acordo com Cobbett (2000) a

ativação dos genes responsáveis pela síntese de fitoquelatinas ocorre poucos minutos após a exposição da planta ao metal. Akhter et al. (2011) verificaram menor translocação de Cd das raízes para a parte aérea em plantas de alface e cevada, e atribuem esse resultado a maior síntese de fitoquelatinas nas raízes, complexação e transporte desse elemento para o vacúolo celular.

Andrade et al. (2010) quantificaram cerca de 35 e 60% mais PC2 e PC3 respectivamente em plantas de feijão inoculadas com *G. etunicatum* em solo contaminado com Cu, em comparação com plantas não inoculadas. Plantas de milho inoculadas com *R. irregularis* sintetizaram mais fitoquelatinas que plantas não colonizadas (Merlos et al., 2016). Neste trabalho, enquanto a adição de rejeito aumentou significativamente os teores de PC2 nas raízes e parte aérea (Figuras 6A e B); PC3 e PC4 aumentaram principalmente com a inoculação simultânea dos dois microrganismos testados (Figuras 6C, D, E e F). Para Serrano et al. (2015), enquanto a PC2 tende a complexar o Cu, PC3 e PC4 possuem afinidade com o Zn. Dessa forma, PC3 e PC4 nas raízes podem ter complexado parte do Zn e Mn absorvido pela planta, atuando como um mecanismo de fitoproteção desencadeado principalmente pelo *A. colombiana*, conforme previamente descrito por Santos et al. (2017) com os mesmos solo e rejeito.

Além dos benefícios nutricionais que a inoculação com FMAs e/ou BFN podem proporcionar às plantas em solos contaminados, existem outros mecanismos desencadeados pela inoculação que podem favorecer o crescimento das plantas em tais condições. No presente estudo, podem ser citados o aumento da concentração de nutrientes (Figura 3), a maior atividade de enzimas antioxidantes (Figura 5) e a menor translocação de metais pesados (Tabela 2) que está associada à produção de fitoquelatinas (Figura 6). Esses são processos que podem ter contribuído para melhor crescimento das mudas em solo contendo rejeito mineração de carvão (Figura 1).

8.5 CONCLUSÕES

A colonização das raízes pelos microrganismos testados aumenta a biomassa de *Enterolobium contortisiliquum*, devido ao aumento dos teores de P e N na parte aérea, em solo contaminado com metais.

A inoculação conjunta de *R. clarus* e *A. colombiana* aumenta a fitoextração de Cu e a fitoestabilização de Zn e Mn do solo.

A inoculação de *R. clarus* + *A. colombiana* aumenta os teores de proteínas solúveis totais e as atividades das enzimas CAT, SOD e GR, o que ameniza o efeito do estresse nas folhas devido a translocação de Cu.

Os FMAs aumentam a concentração das fitoquelatinas PC3 e PC4, complexando principalmente o Zn e Mn nas raízes, evitando a translocação e a toxidez das mudas.

E. contortisiliquum associada a *R. clarus* e *A. colombiana* possui potencial de uso em programas de fitoremediação e revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão e contaminados com metais.

8.6 REFERÊNCIAS

- Aborode FA, Raab A, Voigt M, Costa LM, Krupp EM, Feldmann J. The importance of glutathione and phytochelatin on the selenite and arsenate detoxification in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Environmental Science. 2016;xx(xx):xxx-xxx. doi: 10.1016/j.jes.2016.08.009.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S and Karanov E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell Environ 2001(24):1337-1344.
- Akhter F, McGarvey B, Macfie SM. Reduced translocation of cadmium from roots is associated with increased production of phytochelatin and their precursors. Journal of Plant Physiology. 2012;169(4):1821-1829. doi: 10.1016/j.jplph.2012.07.011.
- Andrade SAL, Gratão PL, Azevedo RA, Silveira APD, Schiavinato MA, Mazzafera P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. Environmental and Experimental Botany. 2010; 68(2):198-207. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.11.009.
- Armada E, Probanza A, Roldán A, Azcón R. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. Journal of Plant Physiology. 2016;192(xx):1-12. doi: 10.1016/j.jplph.2015.11.007.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in the leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. Physiol. Plant. 1998;104(xx):280–292. doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040217.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72(1-2):248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Chaturvedi R, Favas P, Pratas J, Varun M, Paul MS. Assessment of edibility and effect of arbuscular mycorrhizal fungi on *Solanum melongena* L. grown under heavy metal(loid) contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2018;148(xx):318-326. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.048.
- Cobbett CS. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology.* 2000;xx(x):211-216.
- Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. Decisão de Diretoria n 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016: Valores Orientadores para Solos e Aguas Subterraneas no Estado de São Paulo – 2016; 2016 Nov 22. [accessed 2017 Mar 22]. <http://www.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/11/2014/12/DD-256-2016-E-Valores-Orientadores-Dioxinas-e-Furanos2016-Intranet.pdf>.
- Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany.* 2015;109(2):212-228. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.021.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA. Manual de métodos de análise de solo. Rio De Janeiro (RJ): Embrapa Solos; 1997.
- Entry JA, Rygielwicz PT, Watrud LS, Donnelly PK. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of *Arbuscular mycorrhizas*. *Advances in Environmental Research.* 2002;7(1):123-138.
- Etsevani H. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2018;147(xx):175-191. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.08.032.
- Ferreira PAA, Ceretta CA, Soriani HH, Tiecher TL, Soares CRFS, Rossato LV, Nicolosso 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 (1):37–47. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.02.008.
- Ferreira DF. Sistemas de análise estatística para dados balanceados: DEX: Sisvar. Lavras (MG): UFLA; 1998.

- Fowler JAP, Bianchetti A. Dormência em sementes florestais. Colombo (PR): Embrapa Florestas; 2000.
- Gaur A, Adholeya A. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza*. 2000;10(2):43-48.
- Giannopolitis CN, Reis SK. Superóxido dismutase: occurrence in higher plants. *Plant physiology*. 1977;59(2):309-314.
- Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 2013;xx(xx):1-10. doi: 10.1016/j.micres.2013.09.009.
- Gu H, Zhou Z, Gao Y, Yuan X, Ai Y, Zhang Y, Zuo W, Taylor AA, Nan S, Li F. The influences of arbuscular mycorrhizal fungus on phytostabilization of lead/zinc tailings using of four plant species. *International Journal of Phytoremediation*. 2017;xx(xx):1-35. doi: 10.1080/15226514.2017.1284751.
- Hernandez AG, Moura GD, Binati RL, Nascimento FXI, Landolfo DM, Mamede ACP, Silva EP, Armas RD, Giachini AJ, Rossi MJ, Soares CRFS. Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. *Archives of Microbiology*. 2017;17(xx):1-11. doi: 10.1007/s00203-017-1373-2.
- Huang X, Zhu S, Ho S, Wang L, Ma F. Arbuscular mycorrhizal fungus modulates the phytotoxicity of Cd via combined responses of enzymes, thiolic compounds, and essential elements in the roots of *Phragmites australis*. *Chemosphere*. 2017;xx(xx):1-37. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.021.
- Hunaiti AA, Abukhalaf IK, Silvestrov N, Bayork M. Rapid HPLC procedure for the quantitation of phytochelatins in plant tissue extracts. *Journal of liquid chromatography & related technology*. 2003;26(20):3463-3473. doi: 10.1081=JLC-120025602.
- Hoagland DR, Arnon DI. The water culture method for growing plants without soil. California (CA): California Agricultural Experimental Station; 1950.
- Jesus EC, Schiavo JA, Faria SM. Dependências de micorrizas para nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. *Revista Árvore*. 2005;29(4):545-552. doi: 10.1590/S0100-67622005000400006.
- Jiang Q, Tan S, Zhuo F, Yang D, Ye Z, Jing Y. Effect of *Funneliformis mosseae* on the growth, cadmium accumulation and antioxidant activities of *Solanum nigrum*. 2016;98(2):112-120. doi:10.1016/j.apsoil.2015.10.003.
- Kabata-Pendias A. 2011. Trace elements in soils and plants. Boca Raton (FL): CRC.

- Koske RE, Gemma JN. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res.* 1989;92(4):486-505. doi:10.1016/S0953-7562(89)80195-9.
- Lateff, AAHA. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mycorrhiza.* 2011;21(xx):495-503. doi: 10.1007/s00572-010-0360-0.
- Leonir I, Fontaine J, Sahraoui AL. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry.* 2016;xx(xx):1-12. doi: 10.1016/j.phytochem.2016.01.002.
- McGonigle TP, Miller, MH, Evans DG, Fairchild GL. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 1990;115(3):127-133. doi: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x.
- Meharg AA. The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol. Res.* 2003;107(11):1253-1265. doi: 10.1017/S0953756203008608.
- Merlos MA, Zitza O, Vojtech A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N. The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differentially regulates the copper response of two maize cultivars differing in copper tolerance. *Plant Science.* 2016;253(2):68-76. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.09.010.
- Mittler, R. ROS are good. *Trends in plant Science.* 2016; xx(xx):1-9. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants stress and stress tolerance. 2002;7(9):405-410.
- Moura GGD, Armas RD, Meyer E, Giachini AJ, Rossi MJ, Soares CRFS. Rhizobia Isolated from Coal Mining Areas in the Nodulation and Growth of Leguminous Trees. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.* 2016;40(2):1-10. doi: 10.1590/18069657rbc20150091.
- Oliveira Júnior JQ, Jesus EC, Lisboa FJ, Berbara RLL, Faria SM. Nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2017;48(2):95-100. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.013.
- Ouziad F, Hildebrandt U, Schmetzer E, Bothe H. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology.* 2005;162(xx):634-649. doi: 10.1016/j.jplph.2004.09.014.
- Pallara G, Todeschini V, Lingua G, Camussi A, Racchi ML. Transcript analysis of stress defence genes in a white poplar clone inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and grown

- on a polluted soil. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013;63(2):131-139. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.11.016.
- Rodak BW, Freitas DS, Bamberg SM, Carneiro MAC, Guilherme LRG. X-ray microanalytical studies of mineral elements in the tripartite symbiosis between lima bean, N₂-fixing bacteria and mycorrhizal fungi. *Journal of Microbiological Methods*. 2016;16(2):1-21. doi: 10.1016/j.mimet.2016.11.006.
- Santos ML, Soares CRFS, Comin JJ, Lovato PE. The phytoprotective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong in soil containing coal-mine tailings. *International Journal of Phytoremediation*. 2017;0(0):1-9. doi: 10.1080/15226514.2017.1328390.
- Serrano N, Díaz-Cruz JM, Ariño C, Esteban M. Recent contributions to the study of phytochelatins with an analytical approach. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015;73(1):129-145. doi: 10.1016/j.trac.2015.04.031.
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre (RS): UFRGS; 1995.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., et al. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2013(110)xx(xx):20117–20122. doi: 10.1073/pnas.1313452110.
- Vimal SR, Singh JS, Arora NK, Singh S. *Soil-Plant-Microbe Interactions in Stressed Agriculture Management: A Review*. *Pedosphere*. 2017;27(2):177-192. doi: 10.1016/S1002-0160(17)60309-6.
- Vincent JM. *A manual for the practical study of root-nodule bacterial*. Edinburg (EDI): Oxford, International Biological Programme; 1970.
- Wan X, Lei M, Chen T. Cost-benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Science of the Total Environment*. 2015;xx(x):xx-xx. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.080.
- Wilson AJ, Robards AW. Some Observations of the Effects of Mechanical Impedance Upon the Ultrastructure of the Root Caps of Barley. *Protoplasma*. 1979;101(1):61-72.
- Wright SF, Upadhyaya AA. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 1998;198(1):97-107. doi: 10.1023/A:1004347701584.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os microorganismos do solo têm papel fundamental nos processos de fitorremediação e recuperação de solos contaminados com metais pesados. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são microrganismos mutualistas presentes em tais solos que promovem o crescimento das plantas, principalmente por melhorar a arquitetura das raízes e promover a absorção de água e nutrientes. As bactérias fixadoras de nitrogênio (BFNs) são responsáveis por fixar N_2 atmosférico e disponibilizá-lo às plantas leguminosas. Por isso, as associações desses microrganismos às plantas destinadas a programas de fitorremediação e recuperação de solos degradados constituem opções ambientalmente corretas e economicamente viáveis para melhorar seu estado nutricional.

Atualmente predominam estudos que visam elucidar o comportamento e potencial de uso de FMAs e BFNs com espécies vegetais exóticas e herbáceas para programas de fitorremediação, sendo menos frequentes estudos envolvendo plantas nativas. Nos dois primeiros estudos apresentados nesta tese foi demonstrado que existem espécies arbóreas nativas do Bioma Mata Atlântica com potencial de uso para esse fim. Além de melhorar a qualidade das mudas com intensa colonização por *R. clarus* e *A. colombiana*, ficou evidenciado que existem diferenças na absorção e translocação de metais pesados do solo pelas espécies *E. contortisiliquum* e *P. rigida* inoculadas com estes FMAs. Estes resultados demonstraram que a resposta da associação micorrízica com as plantas cultivadas em solos contaminados por metais pesados vai depender do FMA inoculado, da espécie vegetal e do elemento metálico disponível.

Considerando esses trabalhos e a variedade de espécies de FMAs, são necessários estudos sobre o potencial de uso de outras associações desses microrganismos em plantas nativas. A seleção dessas associações específicas e a compreensão de seu comportamento para determinado metal são fundamentais para futura utilização em programas de fitorremediação. Apesar dos experimentos da tese terem sido conduzidos em ambiente controlado e com substrato esterilizado, principalmente com a finalidade de isolar os fatores e entender os mecanismos pontuais da associação, deve-se considerar que os FMAs são simbiotes e possuem relações com os demais microrganismos do sistema edáfico.

No terceiro trabalho, de caracterização de mecanismos de defesa da planta ao estresse metálico, foi verificado que são necessários estudos moleculares para conhecer e avaliar a expressão de genes responsáveis pela tolerância das plantas após a associação com os microrganismos do solo.

Os resultados da tese evidenciaram que, os FMAs e a BFN utilizada aumentam a síntese de moléculas ligadas a mecanismos fisiológicos e bioquímicos de fitoproteção. Eles são extracelulares, exsudados da rizosfera (glomalina), ou intracelulares (enzimas antioxidantes e fitoquelatinas), e permitem aumentar a tolerância das plantas submetidas às condições de estresse metálico. No entanto, são necessárias atualizações e adaptações das metodologias de extração e determinação dessas moléculas, e sobretudo estudos específicos relacionados à dinâmica da molécula de glomalina no solo.

A literatura da área necessita de estudos maiores, principalmente em condições de campo, levando em consideração a variedade e variabilidade dos organismos envolvidos, tanto plantas como microrganismos, de clima, de tipo de solo e de nível de contaminação. Isso é consequência de esta e outras pesquisas terem apontado que podem existir comportamentos diferentes em condições adversas.

10 REFERÊNCIAS CONSULTADAS

- Abdel Latef, A.A., Chaoxing, H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth mineral nutrition, antioxidante enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Science Horticulture*, v. 127, n. 3, p. 228–233, jan. 2011.
- Aguacil, M.M.; Hernández, J.A.; Caravaca, F.; Portillo, B.; Roldón, A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiologia Plantarum*, v. 118, n. 4, p. 562-570, jul. 2003.
- Ahmad, P. *Oxidative Damage to plants: Antioxidant Networks and Signaling*. 1ª ed. London: Elsevier, 2014. 641p.
- Ali, H.; Khan, E.; Sajad, M.A. Phytoremediation of heavy metals— Concepts and application. *Chemosphere*, v. 91, n. 7, p. 869-881, may. 2013.
- Alves, M. C.; Nascimento, V.; Souza, Z.. M. Recuperação em área de empréstimo usada para construção de usina hidrelétrica. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, n. 8, p. 887-893, mai. 2012.
- Alves, L.; Oliveira, V. L.; Silva Filho, G. N. Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 676-684, oct. 2010.
- Amaral Filho, J. R. A.; Schneider, I. A. H.; Brum, I. A. S.; Sampaio, C. A.; Miltzarek, G.; Schneider, C. Caracterização de um depósito de rejeitos para o gerenciamento integrado dos resíduos de mineração na região carbonífera de Santa Catarina, Brasil. *REM: Revista Escola de Minas*, v. 66, p. 347-353, jul./set. 2013.
- Andrade, S. A. L., Gratão, P.L.; Azevedo, R.A.; Silveira, A.P.D.; Schiavinato, M.A.; Mazzafera, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental & Experimental Botany*, v. 68, n. 2, p. 198-207, apr. 2010.
- Arriagada, C., Pereira, G.; Garcia-Romera, I.; Ocampo, J.A. Improved zinc tolerance in *Eucalyptus globulus* inoculated with *Glomus deserticola* and *Trametes versicolor* or *Coriolopsis rígida*. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 42, n. 1, p. 118-124, jan. 2010.
- Ávila, A.L.; Araújo, M.M.; Longhi, S.J.; Gasparin, E. Caracterização da vegetação e espécies para recuperação de mata ciliar, Ijuí, RS. *Ciência Florestal*, v. 21, n. 2, p. 251-260, abr./jun. 2011.

- Barbosa, M.R.; Silva, M.M.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.
- Bonfante, P.; Genre, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature*, v. 48, n. 1, p. 1-8, jul. 2010.
- Borba, R. F. Carvão mineral. In: Balanço mineral brasileiro Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), 2001.
- Borde, M.; Dudhane, M.; Jite, P. Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and nonmycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. *Crop Protection*, v. 30, n. 3, p. 265-271, mar. 2011.
- Bortolini, F.; Dal’Agnol, M.; Bissani, C.A. Características morfofisiológicas associadas à tolerância à seca em sete genótipos da coleção nuclear de trevo branco. *Ciência Rural*, v. 41, n. 9, p. 1632-1638, sep. 2011.
- Boukhris, A.; Laffont-Schwob, I.; Mezghani, I.; El Kadri, L.; Prudent, P.; Pricop, A.; Taton, T.; Chaieb, M. Screening biological traits and fluoride contents of native vegetations in arid environments to select efficiently fluoride-tolerant native plant species for in-situ phytoremediation. *Chemosphere*, v. 119, p. 217-223, jan. 2014.
- BP Statistical Review of World Energy (2014) 64th. ed. Disponível em: http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical84_review-2015/bp-statistical-review-of-world-energy-2015-full-report.pdf. Acessado em: 09/07/2016.
- Brunetto, G.; Miotto, A.; Ceretta, C.A.; Schmitt, D.E.; Heizen, J.; Moraes, M.P.; Canton, L.; Tiecher, T.L.; Comin, J.J.; Giroto, E. Mobility of copper and zinc fractions in fungicide-amended vineyard sandy soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v. 60, n. 5, p. 609-624, sep. 2014.
- Byczkowski, J.Z.; Sorenson, J.R.J. Effects of metal compounds on mitochondrial function: a review. *The Science of the total environment*, v. 37, p. 133-162, 1984.
- 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, nov. 2010.
- Campos, M.L.; Almeida, J.A.; Silveira, C.B.; Gatiboni, L.C.; Albuquerque, J.A.; Mafra, A.L.; Miquelluti, D.J.; Klauber Filho, O.; Santos, J.C.P. Impactos no solo provocados pela mineração e depósitos de rejeitos de carvão mineral. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 9, n. 2, p. 198-205, set. 2010.

- Chern, E.C.W.; Tsai, D.W.; Gunseitan, O.A. Deposition of glomalin related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environmental Science Technology*, v. 41, n. 10, p. 3566–3572, may. 2007.
- Colodete, C.M.; Dobbss, L.B.; Ramos, A.G. Aplicação de micorrizas arbusculares na recuperação de áreas impactadas. *Natureza on line*, v. 12, n. 1, p. 31-37, jan. 2014.
- 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 Total Environmental*, v. 406, n. 2, p. 154–160, nov. 2008.
- Costa, M.S.; Alves, S.M.C.; Ferreira Neto, M.; Batista, R.O.; Costa, L.L.B.; Oliveira, W.M. Produção de mudas de timbaúva sob diferentes concentrações de efluente domestic tratado. *Irriga, edição especial*, p. 408-422, 2012.
- Dantas, J. S.; Souza, A.P.; Farias, M.F.; Nogueira, V.F.B. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, v. 2, n. 2, p. 213-218, may. 2009.
- Dellai, A.; Silva, R.F.; Perrando, E.R.; Jacques, R.J.S.; Grolli, A.L.; Marco, R.D. Óleo de eucalipto e *Pisolithus microcarpus* no crescimento de bracinga em solo contaminado por cobre. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, n. 9, p. 927-933, apr. 2014.
- Doubková, P.; Sudová, R. Limited impact of arbuscular mycorrhizal fungi on clones of *Agrostis capillaris* whit diferente heavy metal tolerance. *Applied Soil Ecology*, v. 99, n. 4, p. 78-88, apr. 2016.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE- BRASIL) Balanço Energético Nacional 2015: Ano base 2014. Rio de Janeiro Empresa de Pesquisa Energética–: EPE, 2015.
- Fernández, S.; Poscherieder, C.; Marcndò, C.; Gallego, J.R.; Jiménez-Gámez, D.; Bueno, A.; Afif, E. Phytoremediation capability of native plant species living on Pb-Zn and Hg-As mining wastes in the Cantabrian range, north of Spain. *Journal of Geochemical Exploration (Article In Press)*, 2016.
- Ferreira, P.A.A. Ceretta, C.A.; Soriani, H.H.; Tiecher, T.L.; Soares, C.R.F.S.; Rossato, L.V.; Nicolosso, F.T.; Brunetto, G.; Paranhos, J.T. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. *Appleid Soil Ecology*, v. 91, n. 1, p. 37-47, jul. 2015.
- Folli-Pereira, M.S.; Meira-Haddad, L.S.M.; Bazzolli, D.M.S.; Kasuya, M.C.M. Micorrizas arbusculares e tolerância das plantas ao estresse.

- Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, n. 6, p. 1663-1679, nov./dec. 2012.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. Superoxidedismutase: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v. 59, n. 2, p. 309–314, feb. 1977.
- Giuliano, G. Plant carotenoids: genomics meets multi-gene engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 19, p. 111–117, jun. 2014.
- González-Chávez, M.C.; Carrillo-González, R.; Wright, S.F.; Nichols, K.A., 2004. The role of glomalin, a protein produced by mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, v. 130, n. 3, p. 317–323, aug. 2004.
- Guo, W., Zhao, R.; Zhao, W.; Fu, R.; Guo, J.; Bi, N.; Zhang, J. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grown in rare earth elements of mine tailings. *Applied Soil Ecology*, v. 72, n. 1, p. 85-92, oct. 2013.
- Haichar, F. Z.; Santaella, C.; Heulin, T.; Achouak, W. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 77, p. 69-80, oct. 2014.
- Hawrylak-Nowak, B.; Wójcik, M.; Dresler, S. Selenium affects physiological parameters and phytochelatin accumulation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants grown under cadmium exposure. *Scientia Horticulturae*, v. 172, n. 9, p. 10-18, jun. 2014.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2011. *Trace Elements Soils and Plants*, 4th ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 534.
- Kämpf, N.; Schneider, P.; Giasson, E. Propriedades pedogênese e classificação de solos construídos em áreas de mineração na Bacia Carbonífera do Baixo Jacuí. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, Campinas, v. 21, p. 165-178, 1997.
- Karuppanandian, T.; Moon, J.; Kim, C.; Monoharan, K.; Kim, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, v. 5, n. 6, p. 709-725, jun. 2011.
- Koppe J.C. & Costa J.F.C.L. (2008). A lavra de carvão e o meio ambiente em Santa Catarina. In: *Carvão Brasileiro: tecnologia e meio ambiente* (eds. Soares PSM, Santos MDC & Possa MV). CETEM Rio de Janeiro, pp. 25-35.
- Krebs A.S.J. 2005. Contribuição ao conhecimento dos recursos hídricos subterrâneos da bacia hidrográfica do Rio Araranguá, SC. In: *Geografia*. Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis.
- Lawlor, D.W.; Cornic, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environmental*, v. 25, n. 2, p. 275-294, feb. 2002.

- Leung, S.; Wang, Z.; Ye, Z.; Yung, K.; Peng, X.; Cheung, K. Interactions Between Arbuscular Mycorrhizae and Plants in Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils: A Review. *Pedosphere*, v. 23, n. 5, p. 549-563, oct. 2013.
- Lingua, G.; Franchin, C.; Todeschini, V.; Castiglione, S.; Biondi, S.; Burlando, B.; Parravicini, V.; Torrigiani, P.; Berta, G. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution*, v. 153, n. 1, p. 137-147, may. 2008.
- Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil. 3º ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352p.
- Ludwig, F.; Feranades, D.M.; Guerrero, A.C.; Villas Bôas, R.L. Características dos substratos na absorção de nutrientes e na produção de gerbera de vaso. *Horticultura Brasileira*, v. 32, n. 2, p. 184-189, abr./jun. 2014.
- Marques, M.; Aguiar, C.R.C.; Silva, J.J.L.S. Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, n. 1, p. 1-11, jan./feb. 2011.
- Marques, T.C.L.L.S.M.; Soares, A.M.; Gomes, M.P.; Martins, G. Resposta fisiológica e anatômica de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. *Revista Árvore*, v. 35, n. 5, p. 997-1006, sept./oct. 2011.
- Mazzoni-Viveiros, S.C.; Trufem, S.F.B. Efeitos da poluição aérea e edáfica no sistema radicular de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae) em área de Mata Atlântica: associações micorrízicas e morfologia. *Brazilian Journal of Botany*, v. 27, n. 2, p. 337-348, apr./jun. 2004.
- Metzger, J.P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. *Biological Conservation*, v.142, p.1138-1140, 2009.
- Mishra, S.; Srivastava, S.; Tripathi, R.D.; Kumar, R.; Seth, C.S.; Gupta, D.K. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, v.65, n.6, p.1027-1039, nov. 2006.
- Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant Science*, v.7, n.9, p.405-410, sep. 2002.
- Mohamed, A. A.; Castagna, A.; Ranieri, A.; Toppi, L.S. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by

- antioxidante status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.57, n.2, p.15-22, aug. 2012.
- Mohanpuria, P.; Rana, N.K., Yadav, S. K. Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environmental Toxicology*, v.22, n.4, p.368–374, aug. 2007.
- Moogouei, R.; Borghei, M.; Arjmandi, R. Phytoremediation of stable Cs from solutions by *Calendula alata*, *Amaranthus chlorostachys* and *Chenopodium album*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, n.7, p.2036-2039, oct. 2011.
- Moreira, F.M.S.; Carvalho, T.S.; Siqueira, J.O. Effect of fertilizers, lime, and inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on the growth of four leguminous tree species in a low-fertility soil. *Biology and Fertility of Soils*, v. 46, n.8, p.771-779, oct. 2010.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.729p.
- Myers N, Mittermeier RA, Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v.403, p.853-858, 2000.
- Nascimento, S.P.; Bastos, E.A.; Araújo, E.C.E.; Freire Filho, F.R.; Silva, E.M. Tolerância e déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.15, n.8, p. 853-860, jul. 2011.
- Pallara, G.; Todeschini, V.; Lingua, G.; Camussi, A.; Racchi, M.L. Transcript analysis of stress defence genes in a white poplar clone inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and grown on a polluted soil. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 63, n.3, p.131-139, feb. 2013.
- Pereira, A. C. C.; Rodrigues, A.C.D.; Santos, F.S.; Guedes, J.N.; Amaral Sobrinho, N.M.B.A. Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43, n.4, p. 641-647, oct./dec. 2012.
- Raskin, I.; Kumar, P.B.A. N.; Dushenkov, S.; Salt, D.E. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current opinions in Biotechnology*, v.5, n.3, p.285-290, jun. 1994.
- Roberts, J.A.; Burger, J.A.; Daniels, W.L.; Bell, J.C. Early stages of mines soil genesis in Southwest Virginia spoil lithosequence. *Soil Science Society of America Journal*, v. 52, n.3, p.716-723, 1988.
- Rocha-Nicoleite, E. *Processos iniciais de restauração ecológica em áreas degradadas por mineração de carvão*. 2015. 122 f. Tese (Doutorado em Ecologia) – Universidade Federal do Rio Gran Sul. Porto Alegre, RS. 2015.

- Rocha-Nicoleite E., Campos M.L., Citadini-Zanette V., Santos R., Martins R. & Soares C.R.F.S. (2013). *Mata Ciliar: implicações técnicas sobre a restauração após mineração de carvão*. SATC, Criciúma.
- Rodrigues, G. B.; Maltoni, K. L.; Cassiolato, A. M. R. Dinâmica da regeneração do subsolo de áreas degradadas dentro do bioma Cerrado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.11, n.1, p.73-80, out. 2007.
- Sanità di Toppi, L.; Gabbrielli, R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental Experimental Botany*, v.41, n.2, p.105-130, apr. 1999.
- Santibáñez, C; Verdugo, C.; Ginocchio, R. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. *Science of Total Environment*, v. 395, v.1, n.1, p. 1-10, may. 2008.
- Santos, C.F.; Novak, E. Plantas nativas do cerrado e possibilidades em fitorremediação. *Revista de Ciências Ambientais*, v. 7, n.1, p.1-11, jul. 2013.
- Schneider, J.; Labory, C.R.G.; Rangel, W.M.; Alves, E.; Guilherme, L.R.G. Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. *Journal Hazard Materials*, v.262, n.15, p.1245-1258, out. 2013.
- Schneider, J.; Oliveira, L.M.; Guilherme, L.R.M.; Stürmer, S.L.; Soares, C.R.F.S. Espécies tropicais de pteridófitas em associação com fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio. *Química Nova*, v.35, n.4, p.709-714, jan. 2012.
- Schneider, J.; Stürmer, S.L.; Guilherme, L.R.G.; Moreira, F.M.S.; Soares, C.R.F.S. Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated áreas in Brazil. *Journal Hazard Materials*, v. 262, p.1105-1115, out. 2012.
- Shabani, N.; Sayadi, M. H. Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study. *The Environmentalist*, v.32, n.1, p.91-98, may. 2012.
- Silva, R. F. Tolerância de espécies florestais arbóreas e fungos ectomicorrízicos ao cobre. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS. 2007.
- Silva, L. F. O.; Vallejuelo, S.F.O.; Martinez-Arkarazo, I.; Castro, K.; Oliveira, M.L.S.; Sampaio, C.H.; Brum, I.A.S.; Leão, F.B.; Taffarel, S.R.; Madariaga, J. Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal

- mining acid drainage. *Science of the Total Environment*, v.447, n.1, p.169-178, mar.2013.
- Silva, M.P. Atributos do solo e comunidades microbianas associadas á bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) em áreas de mineração de carvão em recuperação. 2016. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2016.
- Silva, R.F.; Antonioli, Z.I.; Lupatini, M.; Trindade, L.L. Ectomicorrização em quatro espécies florestais nativas do Rio Grande do Sul e sua eficiência em solo contaminado com cobre. *Ciência e Natura*, v.33, n.2, p.99-109, mar. 2011.
- Silva, R.F.; Da Ros, C.O.; Scheid, D.L.; Grolli, A.L.; De Marco, R.; Missio, E.L. Copper translocation and tolerance in seedlings of tree species grown in contaminated soil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 19, n. 11, p. 1093-1099, nov. 2015.
- Silva, R.F.; Eitelwein, M.T.; Cherubin, M.R.; Fabbris, C.; Weirich, S.; Pinheiro, R.R. Produção de mudas de *Eucalyptus grandis* em substratos orgânicos alternativos. *Ciência Florestal*, v. 24, n. 3, p.609-619, set. 2014.
- Simon, Luc.; Busquet, J.; Lèvesque, R.C.; Lalonde, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, v.363, n.1, p.67-69, may. 1993.
- Sindicato da Indústria de Extração de Carvão do Estado de Santa Catarina-SIECESC- Meio ambiente. Disponível em: http://www.siecesc.com.br/meio_ambiente/projeto-educacao-ambiental. Acessado em: 06/09/2016.
- Singh, S.; Eapen, S.; D'souza, S. F. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in na aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, v.62, n.2, p.233-241, jan. 2006.
- Smith, S.E. & Read, D.J. Mycorrhizal symbiosis. 3.ed. London, Academic Press, 2008. 785p.
- Sneller, F.E.C.; Van Heerwaarden, L.M.; Kraaijeveld-Smit, F.J.; Schat, H.; Verkleyj, J.A.C. Toxicity of arsenate in *Silene vulgaris*, accumulation and degradation of arsenate-induced phytochelatins. *New Phitologist*, v.144, n. 2, p.223-232, jan. 1999.
- Soares, C.R.F.S.; Accioly, A.M.A.; Marques, T.C.L.L.S.; Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caules e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 13, n. 3, p. 302-315, 2001.

- Soares, C. R. F. S.; Siqueira, J.O.; Carvalho, J.G.; Guilherme, L.R.G. Nutrição fosfática e micorriza arbuscular na redução da toxicidade de cádmio em trema (*Trema micranta* (L.) Blum. Revista *Árvore*, v. 31, n. 5, p. 783-792, 2007.
- Soares, C. R. F. S.; Siqueira, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass species against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. *Biology and Fertility of Soil*, v. 44, n. 6, p. 833-841, jul. 2008.
- Soares Neto, C.B. Ocorrência, caracterização e identificação de bactérias diazotróficas em simbiose com *Mimosa* spp. em áreas de solo ultramáfico. 2015. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) – Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2015.
- Stümpf, L.; Pauletto, E.A.; Fernandes, F.F.; Suzuki, L.E.A.S.; Silva, T.S.; Pinto, L.F.S.; Lima, C.L.R. Perennial grasses for recovery of the aggregation capacity of a reconstructed soil in a coal minning área in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 38, p. 327-335, mar. 2014.
- Stürmer, S.L. & Siqueira, J.O. Diversidade de fungos micorrizicos arbusculares em ecossistemas brasileiro. 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.
- Tabarelli, M.; Pinto, L.P.; Silva, J.M.; Hirota, M.M.; Bedê, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade. *Megadiversidade*, v. 1, n.1, p. 133-138, jun. 2005.
- Trannin, I.C.B.; Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contorsiliquum* e *Sesbania virgate* em solo contaminado com metais pesados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.25, n.3, p.743-753, jul./sept. 2001.
- UNESCO – Mata Atlântica: Reservas do Sudeste. Disponível em: <http://www.unesco.org/new/pt/brasil/culture/world-heritage/list-of-world-heritage-in-brazil/atlantic-forest-south-east-reserves/#c1465030>. Acesso em: 05/09/2016.
- van Steveninck, R.F.M.; Babare, A.; Fernando, D.R.; van Steveninck, M.E. The binding of zinc, but not cadmium, by phytic acid in roots of crop plants. *Plant and Soil*, v. 167, n. 1, p. 154-164, nov. 1994.
- Veras, R.P.; Laime, E.M.O.; Feranades, P.D.; Soares, F.A.L.; Freire, E.A. Altura de planta, diâmetro caulinar e produção do pinhão-mansão irrigado sob diferentes níveis de salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 15, n. 6, p. 582-587, jun. 2011.

- Viana, V.M.; Tabanez, A.A.J.; Martinez, J.L.A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. *Revista do Instituto Florestal de São Paulo*, v. 4, p. 86-94, 1992.
- Vodnik, D.; Grcman, H.; Macek, I.; van Elteren, J.T.; Kovacevic, M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, v. 392, n. 1, p. 130-136, mar. 2008.
- Zhang, F.; Wang, Y.; Lou, Z.; Dong, J. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere*, v.67, n.1, p.4 50, feb. 2007.
- Yadav, S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, v.76, n.2, p.167-179, apr. 2010.
- Ye, Z.; Jiang, J.; Wu, G. Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 352-360, apr. 2008.
- Wan, X.; Lei, M.; Chen, T., 2016. Cost-benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* xxx, xxx-xxx.
- World Energy Council (WEC) World Energy Resources. World Energy Council. 2013.
https://www.worldenergy.org/wpcontent/uploads/2013/09/Complete_WER_2013_Survey.pdf. Acesso em 04/03/2016.
- Wei, Y.; Hou, H.; Li, J.; ShanGuan, Y.; Zhang, J.; Zhao, L.; Wang, W. Molecular diversity of arbuscular micorrhizal fungi associated with na Mn hiperaccumulator – *Phytolacca americana*, in Mn mining área. *Appleid Soil Ecology*, v. 82, n. 4, p. 11-17, may. 2014.
- Wong, M. W. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, v. 50, n. 6, p. 775-780, feb. 2003.
- Wu, Z.; McGrouther, K.; Huang, J.; Wu, P.; Wu, W.; Wang, H. Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration: Field experiment. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 68, n. 2, p. 283-290, jan. 2014.

11 ANEXOS

11.1 ESTUDO I E II CONDUZIDOS NA CASA DE VEGETAÇÃO

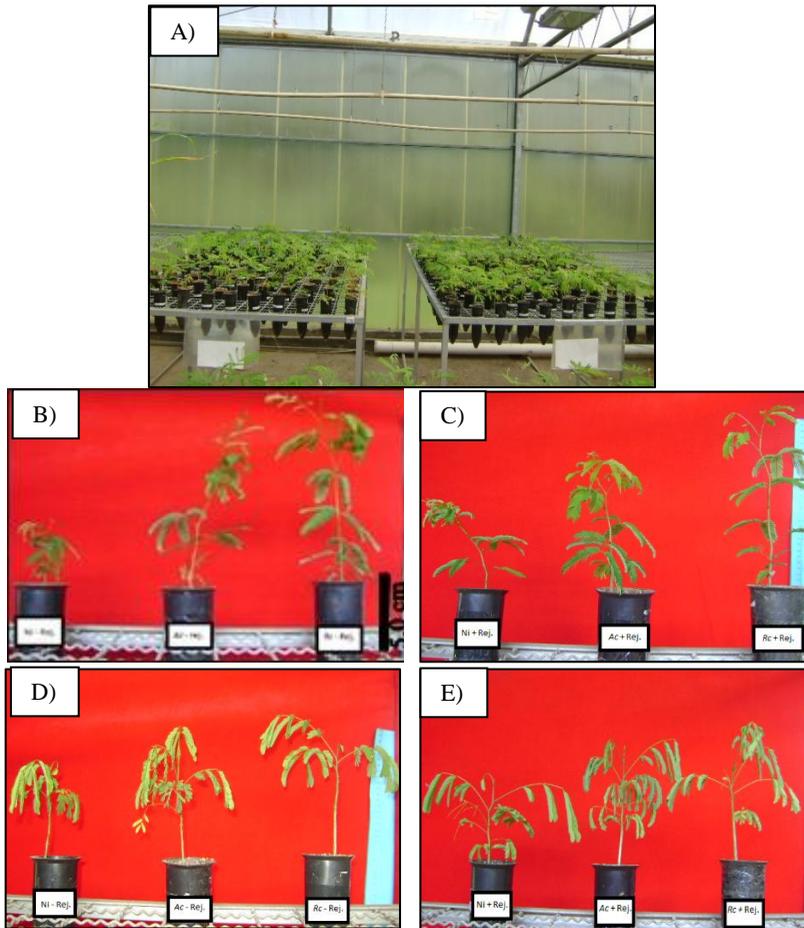


Figura 1. Vista geral dos experimentos (A), estudo com o angico (B e C) e com a timbáúva (D e E), conduzidos casa de vegetação, em substrato sem ou com rejeito de mineração de carvão (-Rej. ou +Rej.), não inoculada (Ni), inoculada com *A. colombiana* (Ac) ou inoculada com *R. clarus* (Rc).

11.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NAS RAÍZES DAS MUDAS DO ESTUDO III

Amostras de raízes foram fixadas em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2) com 2,5% de glutaraldeído durante 3,0 horas, lavadas em tampão fosfato (3 vezes), desidratadas em etanol e armazenadas em álcool 70% (4 °C). No momento da análise as amostras foram dessecadas e receberam um banho de ouro em metalizador Leica EM SCD500. A visualização das estruturas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com filamento de tungstênio, marca JEOL e modelo JSM-6390LV (8 Kv).

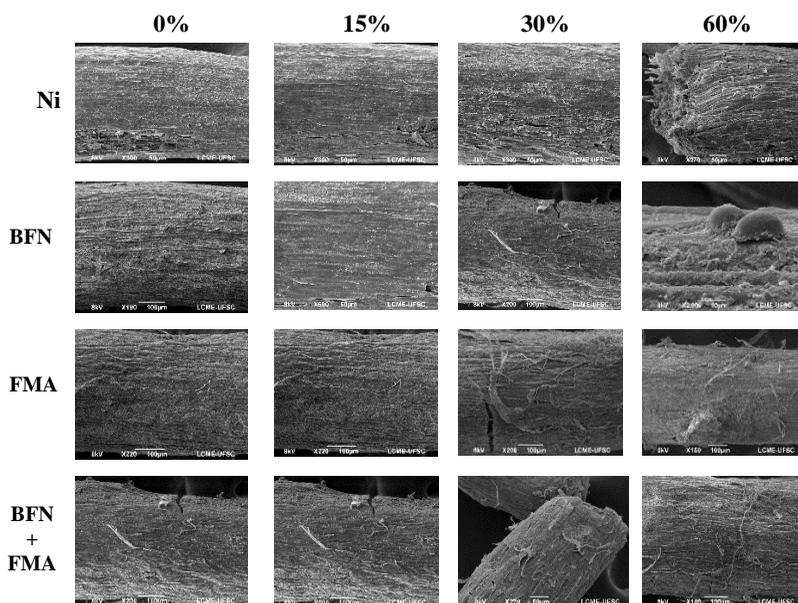


Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de raízes de timbaúva cultivada em câmara de crescimento, em substrato com 0, 15, 30 ou 60% de rejeito de mineração de carvão e não inoculada (Ni), inoculada com BFN (*B. elkanii*) ou FMAs (*R. clarus* + *A. colombiana*) ou BFN + FMAs.