



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

Andressa Danielli Canei

**Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies  
arbóreas em área de mineração de carvão em recuperação**

Florianópolis  
2021

Andressa Danielli Canei

**Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies  
arbóreas em área de mineração de carvão em recuperação**

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

Orientador: Prof. Cláudio R. F. S. Soares, Dr.

Coorientadora: Edilane Rocha-Nicoleite, Dra.

Florianópolis

2021

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

Canei, Andressa Danielli

Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas em área de mineração de carvão em recuperação / Andressa Danielli Canei ; orientador, Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares , coorientadora, Edilane Rocha-Nicoleite, 2021.

193 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Recuperação ambiental . 3. Atributos microbiológicos. 4. Revegetação . I. Fonsêca Sousa Soares , Cláudio Roberto . II. Rocha-Nicoleite, Edilane . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Andressa Danielli Canei

**Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas em área de mineração de carvão em recuperação**

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

Prof. Marco Aurélio Carbone Carneiro, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Lavras

Prof. Paulo Ademar Avelar Ferreira, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Paulo Emilio Lovato, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que lutam e acreditam na existência humana em equilíbrio com o meio ambiente

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer aos meus pais. Obrigada por me ensinarem a dar valor certo ao que é vivo e não as coisas materiais e, por sempre me incentivarem a estudar. Meus pais sempre mostraram para os meus irmãos e eu, que o conhecimento é a única coisa que ninguém pode nos roubar. Sem vocês eu não estaria aqui hoje.

Um agradecimento especial ao meu orientador de longa data, o Professor Dr. Cláudio R. F. S. Soares. Obrigada por abrir as portas do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos para mim lá em 2013 e acreditar na minha capacidade. Muito grata de verdade por todos esses anos de ensinamentos e orientação.

A minha Co-orientadora Edilane Rocha-Nicoleite pela colaboração em especial nas atividades de campo e, por ter compartilhado suas experiências de trabalho comigo.

Ao Prof. Admir José Giachini, por tantas trocas de experiências, apoio no laboratório, por ter sido sempre tão solícito, tirando dúvidas, emprestando material, enfim, obrigada por tudo.

A minha sogra Rita de Cássia Pereira que é uma pessoa muito, muito especial para mim. Sem você eu não teria feito nem metade do meu trabalho de viveiro e de campo. Obrigada por receber a minha equipe de campo na sua casa, por nos alimentar, nos acolher e nos prestar todo tipo de assistência possível. Por todas as vezes que foi visitar o meu experimento e me enviar notícias. Por todas as vezes que abdicou de descansar no fim de semana, seja para plantar mudas, medir altura, diâmetro etc. Muito grata de coração.

Ao meu marido Mauricio Pereira Dal Pont, que além de também estar fazendo doutorado e trabalhando ao mesmo tempo, me acompanhou inúmeras vezes no campo e me ajudou nos experimentos. Obrigada por ser realmente um parceiro de vida, caminhar ao meu lado e sempre me apoiar. Te amo.

A minha cunhada Tainah, pela grande dedicação e ajuda que teve com os meus experimentos no viveiro e no campo.

As minhas amigas do quarteto fantástico: Ana Carolina Peixoto B. Mamede, Anabel G. Hernández e Emanuela Pille da Silva obrigada por todos esses anos de parceria no laboratório, nos experimentos, nas viagens, nas trocas de experiência, nesse apoio mútuo que construímos. Amo vocês, obrigada por tudo!

Um agradecimento especial a Manu, pela paciência em ler o meu trabalho e por todas as contribuições, sem falar que nesse último ano durante a pandemia foi a minha fiel parceira

de laboratório, campo etc. Obrigada por tudo minha amiga, não teria finalizado sem a sua preciosa ajuda!

E um agradecimento especial também a minha amiga Anabel, que embarcou comigo nessa caminhada, ela no doutorado e eu no mestrado lá em 2015. Aprendi muito contigo em todos esses anos, foi muito especial ter você próxima de mim. A gente realmente formou uma equipe de laboratório que se preocupava uma com o trabalho da outra e isso foi muito enriquecedor durante a minha formação. Obrigada pelas leituras, discussões de resultados etc.

A todos os alunos de iniciação científica que de alguma forma fizeram parte dessa tese, em especial ao Luiz F. de Souza, Eloisa Napoleão, Luiza Conceição, Lucas Mendes, Daniele Galvão, Gabriel Cubas e Melina da Silva, por todo o suporte nas análises e por essa troca de experiências diárias. Espero ter colaborado um pouquinho com a formação de vocês, porque eu aprendi muito com cada um.

Aos meus colegas e amigos de laboratório que estiveram presentes em tantos momentos importantes: Edenilson Meyer, Lander de Souza, Antonio Lourenço Pinto e Anna Flávia Neri.

A CPRM, em especial ao Nei por toda colaboração prestada antes e durante a condução dos experimentos à campo.

Ao Alencar e sua equipe pela colaboração na montagem dos experimentos no campo mesmo em dia frio e chuvoso.

A UNESC por ter cedido espaço para a realização dos experimentos no viveiro. A todos os funcionários do Horto Florestal da UNESC que colaboraram com o meu trabalho durante a condução dos ensaios, em especial ao Cristian e ao Jailson.

A UFSC por todos esses 11 anos que foi a minha casa, por ter me proporcionado uma formação completa no ensino superior, por ser gratuita, pública e de qualidade. Tenho muito orgulho de ser UFSC!

A CAPES pela bolsa que me permitiu realizar o meu trabalho de pesquisa em tempo integral.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro que permitiu a realização da minha tese.

Ao RGV pela oportunidade de fazer a minha pós-graduação em um Programa com excelente avaliação na CAPES, profissionais capacitados e de ótima qualidade. Muito obrigada a todos os professores e profissionais do RGV que contribuíram na minha formação, um agradecimento especial a secretária da Pós-Graduação em RGV - Bernadete Ribas, tu és demais!

E por último, mas não menos importante, a todos os membros que fizeram parte da minha banca de qualificação e da banca final da tese que dedicaram um tempo especial para poderem avaliar o meu trabalho. Em especial aos Professores Marco A. C. Carneiro, Paulo A. Avelar Ferreira, Paulo Emílio Lovato, Maurício Sedrez dos Reis e a Sandra Müller. Todas as suas contribuições foram muito importantes para a melhoria do meu trabalho final.



“You cannot get through a single day without having an impact in the world around you. What you do makes a difference, and you have to decide what kind of difference you want to make.” (GOODALL Jane, 2017)

## RESUMO GERAL

A mineração de carvão a céu aberto em Santa Catarina (SC) levou à degradação de extensas áreas. Uma técnica empregada para a recuperação de área degradadas é a revegetação por meio do plantio de espécies arbóreas. Algumas características físicas, químicas e biológicas verificadas em solos degradados podem dificultar o desenvolvimento vegetal. Uma alternativa que pode facilitar a adaptação, crescimento e sobrevivência de espécies vegetais nesses solos, seria a coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV). Desse modo, o presente estudo teve por objetivo principal avaliar a coinoculação de MPCV em espécies arbóreas nativas em solo de área de mineração de carvão em SC em processo inicial de recuperação. No primeiro capítulo foram realizados ensaios com *Citharexylum myrianthum*, *Mimosa scabrella*, *Schinus terebinthifolius* e *Senna multijuga* em condições controladas de casa de vegetação para a avaliação dos efeitos da coinoculação de diferentes combinações de quatro MPCV sobre o crescimento, acúmulo de N e P e colonização micorrízica, testando-se os seguintes tratamentos: R – *Rhizobium* sp., E1 – *Pseudomonas* sp., E2 – *Pantoea* sp. e F – inoculante comercial a base de fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices* (Rotella BR), em solo esterilizado proveniente de uma área de mineração em processo inicial de recuperação. Em *C. myrianthum*, *M. scabrella* e em *S. multijuga* o tratamento R+E1+F foi o mais eficiente para a maioria dos parâmetros avaliados, com incrementos de 254%, 221% e de 445% na massa seca da parte aérea (MSPA), respectivamente, em comparação com o controle sem inoculação (SI). Em *S. terebinthifolius* a inoculação tripla E1+E2+F apresentou um incremento de 93% na MSPA em relação a SI. No segundo capítulo, a fim de investigar os efeitos da coinoculação de MPCV em condições de solo não esterilizado, foram conduzidos ensaios independentes para cada uma das quatro espécies arbóreas testando-se tratamentos de coinoculação compostos pelos mesmos MPCV supracitados, sendo: R+E1+E2 (MIX), inoculante micorrízico (FMA) e MIX+FMA, além de um tratamento não inoculado (SI). Após seis meses, as mudas foram avaliadas quanto ao crescimento e acúmulo de nutrientes. Como principais resultados, a inoculação de FMA em *C. myrianthum* e a coinoculação de MIX+FMA em *S. multijuga* favoreceram o crescimento das mudas dessas espécies arbóreas, com incrementos médios de 87% e 920% na MSPA, 126% e 749% no acúmulo de nitrogênio (AN) e de 135% e 718% no acúmulo de fósforo (AP), respectivamente, em comparação com SI. Parte das mudas produzidas no viveiro foram empregadas em ensaio realizado a campo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação, constituindo-se no terceiro capítulo da Tese. Neste último, avaliou-se os efeitos da coinoculação de MPCV sobre o crescimento e sobrevivência das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga*, bem como a avaliação de atributos químicos e microbiológicos do solo aos 300 e 420 dias após o transplante (DAT) das mudas. Os tratamentos de inoculação FMA e MIX+FMA diminuíram a taxa de mortalidade das mudas de *S. multijuga*. A atividade enzimática da arissulfatase, DAF, fosfatase e a biomassa microbiana do solo demonstraram potencial para serem utilizadas nas avaliações de monitoramento de áreas degradadas pela mineração de carvão em processo de recuperação. De forma geral, os resultados verificados no presente trabalho demonstraram potencial da coinoculação de MPCV na produção de mudas arbóreas em viveiro, especialmente em *C. myrianthum* e em *S. multijuga*, visando a revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão em SC, a fim de acelerar a produção de mudas em viveiro, aumentar a taxa de sobrevivência no transplante para o campo das mudas de *S. multijuga*.

**Palavras-chave:** Espécies pioneiras. Recuperação ambiental. Fungos micorrízicos arbusculares. Bactérias promotoras do crescimento vegetal. Revegetação.

## ABSTRACT

Open pit coal mining in Santa Catarina (SC) led to degradation of large areas. A technique used to recover degraded areas is revegetation. However, physical, chemical and biological characteristics verified in the soils of these areas can hinder plant development. An alternative that can facilitate adaptation, growth and survival of plant species in soils with these characteristics would be the co-inoculation of plant growth-promoting microorganisms (PGPM). The present study aimed to evaluate the co-inoculation of PGPM in native tree species in soil from a coal mining area in SC in initial recovery process. In the first chapter, tests were carried out with *Citharexylum myrianthum*, *Mimosa scabrella*, *Schinus terebinthifolius* and *Senna multijuga* under controlled greenhouse conditions to evaluate the effects of co-inoculation of different combinations of four PGPM on growth, N and P uptake, and mycorrhizal colonization. We tested the following treatments: R – *Rhizobium* sp., E1 – *Pseudomonas* sp., E2 – *Pantoea* sp., and F – commercial inoculant of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus intraradices* (Rotella BR), in sterilized soil from a mining area in initial recovery process. In *C. myrianthum*, *M. scabrella* and *S. multijuga*, R+E1+F treatment was the most efficient for most parameters evaluated, with increments of 254%, 221% and 445% in shoot dry mass (SDM), respectively, compared to the uninoculated control (SI). In *S. terebinthifolius*, the triple inoculation E1+E2+F showed an increase of 93% in SDM compared to SI. In the second chapter, in order to investigate the effects of co-inoculation of PGPM in non-sterile soil conditions, independent tests were conducted for each of the four tree species, testing co-inoculation treatments composed of the same PGPM mentioned above, as follows: R+E1+E2 (MIX), mycorrhizal inoculant (FMA) and MIX+FMA, in addition to an uninoculated treatment (SI). After six months, the seedlings were evaluated on growth and nutrient accumulation. As main results, the inoculation of FMA in *C. myrianthum* and the co-inoculation of MIX+FMA in *S. multijuga* favored the growth of seedlings of these tree species, with average increments of 87% and 920% in SDM, 126% and 749% in the nitrogen accumulation (NA) and 135% and 718% in phosphorus accumulation (PA), respectively, compared to SI. Part of the seedlings produced in the nursery were used in a field trial in a coal mining area in the initial recovery process, constituting the third chapter of the Thesis. In the latter chapter, the effects of co-inoculation of PGPM on the growth and survival of *C. myrianthum* and *S. multijuga* seedlings were evaluated, as well as the evaluation of chemical and microbiological attributes of the soil at 300 and 420 days after transplanting (DAT) of the seedlings. FMA and MIX+FMA inoculation treatments reduced the mortality rate of *S. multijuga* seedlings. The enzymatic activity of arisulfatase, DAF, phosphatase and soil microbial biomass showed potential to be used in monitoring evaluations of areas degraded by coal mining in process of recovery. The results verified in the present study demonstrated the potential of co-inoculation PGPM in the production of tree seedlings in greenhouse and nursery, especially in *C. myrianthum* and *S. multijuga*, aiming at the revegetation of areas degraded by coal mining in SC, in order to accelerate the production of seedlings in nursery, increase the survival rate during transplantation to the field of *S. multijuga* seedlings.

**Keywords:** Pioneer species. Environmental recovery. Arbuscular mycorrhizal fungi. Plant growth promoting bacteria. Revegetation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localização das Bacias Hidrográficas do sul catarinense e delimitação da Bacia Carbonífera de SC. ....21
- Figura 2. Altura (CV=4,34%), diâmetro (CV=13,30%), massa seca da raiz (MSR) (CV=31,49%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=11,88%) das mudas de *C. myrianthum* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). .....66
- Figura 3. Altura (CV=10,86%), diâmetro (CV=13,10%), massa seca da raiz (MSR) (CV=9,74%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=25,44%) das mudas de *M. scabrella* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). .....68
- Figura 4. Altura (CV=9,77%), diâmetro (CV=12,62%), massa seca da raiz (MSR) (CV=25,72%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=21,45%) das mudas de *S. terebinthifolius* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). ..... 70
- Figura 5. Altura (CV=11,61%), diâmetro (CV=10,92%), massa seca da raiz (MSR) (CV=22,10%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=21,99%) das mudas de *S. multijuga*

inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). ..... 72

Figura 6. Nutrição das mudas de *C. myrianthum* (teor de nitrogênio (CV=23,41%) e fósforo (CV=15,63%) e acúmulo de nitrogênio (CV=20,00%) e fósforo (CV=31,45%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). ..... 75

Figura 7. Nutrição das mudas de *M. scabrella* (teor de nitrogênio (CV=16,24%) e fósforo (CV=11,07%) e acúmulo de nitrogênio (CV=27,33%) e fósforo (CV=18,93%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5). ..... 77

Figura 8. Nutrição das mudas de *S. terebinthifolius* (teor de nitrogênio (CV=9,72%) e fósforo (CV=20,89%) e acúmulo de nitrogênio (CV=24,05%) e fósforo (CV=31,05%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de

MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 5$ )...... 79

Figura 9. Nutrição das mudas de *S. multijuga* (teor de nitrogênio (CV=16,39%) e fósforo (CV=21,22%) e acúmulo de nitrogênio (CV=22,85%) e fósforo (CV=12,29%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 5$ )...... 81

Figura 10. a) Mudanças de *Senna multijuga* em bandeja de plástico com 200 células; b) Mudanças de *S. terebinthifolius* recém transferidas para sacos plásticos de 15 x 21 cm. .... 104

Figura 11. Mudanças das espécies arbóreas pioneiras inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal crescidas em substrato não estéril em condições de viveiro por um período de 180 dias ( $n=10$ ). a, c, e) parte aérea das mudanças de *C. myrianthum*, *S. multijuga* e *M. scabrella*, respectivamente; b, d, f) raízes de *C. myrianthum*, *S. multijuga* e *M. scabrella*, respectivamente. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação..... 108

Figura 12. Altura (CV% = 9,72), diâmetro (CV% = 17,88), massa seca da raiz (CV% = 46,35) e massa seca da parte aérea (CV% = 30,73) das mudanças de *C. myrianthum* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro em condições não estéreis. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ )...... 109

Figura 13. Altura (CV% = 18,89), diâmetro (CV% = 21,95), massa seca da raiz (CV% = 52,88) e massa seca da parte aérea (CV% = 37,38) das mudanças de *M. scabrella* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste

SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ ). \*ns = estatística não significativa ( $P > 0,05$ ). ..... 111

Figura 14. Altura ( $CV\% = 12,33$ ), diâmetro ( $CV\% = 23,81$ ), massa seca da raiz ( $CV\% = 20,43$ ) e massa seca da parte aérea ( $CV\% = 18,04$ ) das mudas de *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ )...... 112

Figura 15. Altura ( $CV\% = 7,38$ ), diâmetro ( $CV\% = 12,74$ ), massa seca da raiz ( $CV\% = 32,94$ ) e massa seca da parte aérea ( $CV\% = 7,91$ ) das mudas de *S. terebinthifolius* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ )...... 114

Figura 16. Nutrição das mudas de *C. myrianthum* quanto ao teor de nitrogênio ( $CV\% = 14,96$ ) e fósforo ( $CV\% = 16,64$ ) e acúmulo de nitrogênio ( $CV\% = 31,49$ ) e fósforo ( $CV\% = 23,43$ ) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ ). \*ns = estatística não significativa ( $P > 0,05$ )...... 116

Figura 17. Nutrição das mudas de *M. scabrella* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro quanto ao teor de nitrogênio ( $CV\% = 15,44$ ) e fósforo ( $CV\% = 21,25$ ) e, acúmulo de nitrogênio ( $CV\% = 32,38$ ) e fósforo ( $CV\% = 32,48$ ). MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ ). \*ns = estatística não significativa ( $P > 0,05$ )...... 118

Figura 18. Nutrição das mudas de <i>S. terebinthifolius</i> inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro quanto ao teor de nitrogênio (CV% = 17,75) e fósforo (CV% = 17,36) e, acúmulo de nitrogênio (CV% = 25,46) e fósforo (CV% = 6,01). MIX = UFSC-B8 ( <i>Rhizobium</i> sp.) + SC5 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) + MSR2 ( <i>Pantoea</i> sp.); FMA= inoculante Rootella BR ( <i>R. intraradices</i> ); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK (P < 0,05). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). *ns = estatística não significativa (P > 0,05).....	119
Figura 19. Nutrição das mudas de <i>S. multijuga</i> quanto ao teor de nitrogênio (CV% = 24,47) e fósforo (CV% = 23,24) e, acúmulo de nitrogênio (CV% = 16,04) e fósforo (CV% = 11,95) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 ( <i>Rhizobium</i> sp.) + SC5 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) + MSR2 ( <i>Pantoea</i> sp.); FMA= inoculante Rootella BR ( <i>R. intraradices</i> ); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK (P < 0,05). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10).....	121
Figura 20. Esquema representativo de como é realizada a construção do solo em Áreas de Preservação Permanente (APPs) nos locais onde houve degradação do solo ocasionada pela mineração de carvão em Santa Catarina segundo os critérios técnicos estabelecidos pelo Grupo Técnico de Assessoramento (GTA).....	141
Figura 21. Espécies herbáceas mais observadas na área experimental durante o período de avaliação de agosto de 2019 a outubro de 2020. APP- Área III/Rio Pio, Treviso, SC. ....	142
Figura 22. Croqui do delineamento em blocos casualizados do experimento a campo com introdução de mudas de <i>C. myrianthum</i> e <i>S. multijuga</i> inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em uma APP – Área III/Rio Pio, Treviso-SC.....	143
Figura 23. Área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação – Área III/Rio Pio, Treviso-SC. a) A linha vermelha representa a delimitação da área de APP onde o experimento com mudas de espécies arbóreas pioneiras inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal foi instalado. B) Representação gráfica do delineamento em blocos casualizados dos ensaios com mudas de <i>C. myrianthum</i> e <i>S. multijuga</i> . Coordenadas: 28°31'54.1" S e 49°27'45.8" W.....	144
Figura 24. Representação esquemática da distribuição das mudas (pontos brancos) nas respectivas parcelas do experimento a campo. As avaliações foram realizadas nas mudas centrais de cada parcela (retângulo vermelho).....	145



Figura 25. Representação esquemática de como foi realizada a coleta das subamostras (pontos marrons) de solo para as análises em cada parcela.....	146
Figura 26. Dados meteorológicos de precipitação total e temperatura média no município de Treviso – SC durante o período de um mês antecedente a cada coleta de solo no campo. ....	147
Figura 27. Altura das mudas de <i>C. myrianthum</i> e <i>S. multijuga</i> inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação (n = 4). MIX= UFSC-B8 ( <i>Rhizobium</i> sp.) + SC5 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) + MSR2 ( <i>Pantoea</i> sp.); FMA= inoculante Rootella BR ( <i>R. intraradices</i> ); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. T0= 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); e T1= 300 DAT (maio/2020). Barras de erro indicam o erro padrão da média. * Efeito significativo da inoculação pelo teste SNK 5% de probabilidade entre os diferentes tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK a 5%.....	153
Figura 28. Carbono da biomassa microbiana (CBM) do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação nos com revegetação de mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n=4). a) CBM do solo com mudas de <i>C. myrianthum</i> e b) CBM do solo com mudas de <i>S. multijuga</i> . FMA= inoculante Rootella BR ( <i>R. intraradices</i> ); MIX= UFSC-B8 ( <i>Rhizobium</i> sp.) + SC5 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) + MSR2 ( <i>Pantoea</i> sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + Rootella BR; SI= sem inoculação. 0 DAT= 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). Barras representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos tratamentos de inoculação no mesmo tempo de avaliação. Letras maiúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento de inoculação entre os tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste a 5% de probabilidade. ....	159
Figura 29. Nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação nos com revegetação de mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n=4). a) CBM do solo com mudas de <i>C. myrianthum</i> e b) CBM do solo com mudas de <i>S. multijuga</i> . FMA= inoculante Rootella BR ( <i>R. intraradices</i> ); MIX= UFSC-B8 ( <i>Rhizobium</i> sp.) + SC5 ( <i>Pseudomonas</i> sp.) + MSR2 ( <i>Pantoea</i> sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + Rootella BR; SI= sem inoculação. 0 DAT= 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). Barras representam o erro padrão da média.	

Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos tratamentos de inoculação no mesmo tempo de avaliação. Letras maiúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento de inoculação entre os tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste a 5% de probabilidade. .... 161

Figura 30. Atividade enzimática da arilsulfatase em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n = 16). 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média dos tratamentos em cada tempo de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade. .... 164

Figura 31. Atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de *C. myrianthum* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n = 16). 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média dos tratamentos em cada tempo de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade. .... 165

Figura 32. Atividade enzimática da fosfatase (a) *C. myrianthum* e b) *S. multijuga*) em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n = 16). 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média dos tratamentos em cada tempo de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade. .... 166

Figura 33. Atividade das enzimas envolvidas na hidrólise do diacetato de flouoresceína (DAF) em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas (a) *C. myrianthum* e b) *S. multijuga*) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação. FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + RootellaBR; SI= sem inoculação. 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). a) n= 4; b) n= 16. A barra representa o erro padrão da média. Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos tratamentos

de inoculação no mesmo tempo de avaliação. Letras maiúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento de inoculação entre os tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade. ... 167

Figura 34. Respiração basal (RB) (a e b) e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) (c e d) do solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n=16). FMA= inoculante Rootella BR (*R intraradices*); MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + Rootella BR; SI= sem inoculação. 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média (Área III- Rio Pio), Treviso, SC. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste SNK a 5%. .... 170

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análises químicas do solo usado nos experimentos em casa de vegetação coletado na Área VI-Belluno, Siderópolis, SC. ....	58
Tabela 2. Principais características dos microrganismos promotores do crescimento vegetal selecionados para os experimentos em casa de vegetação na promoção do crescimento vegetal de quatro espécies arbóreas. ....	59
Tabela 3. Porcentagem de colonização micorrízica e número de esporos encontrados nas raízes de espécies arbóreas inoculadas com o inoculante comercial a base de fungo micorrízico arbuscular <i>R. intraradices</i> (F) após 120 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 ( <i>Rhizobium</i> sp.); E1 = SC5 ( <i>Pseudomonas</i> sp.); E2 = MSR2 ( <i>Pantoea</i> sp.); MIX = F+R+E1+E2; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação.....	64
Tabela 4. Composição do substrato utilizado na produção de mudas de <i>C. myrianthum</i> , <i>M. scabrella</i> e <i>S. multijuga</i> em viveiro. ....	104
Tabela 5. Principais análises químicas dos substratos utilizados nos experimentos com espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em viveiro na UNESC, Criciúma, SC. ....	105
Tabela 6. Colonização micorrízica e número de esporos em mudas de <i>C. myrianthum</i> , <i>M. scabrella</i> , <i>S. terebinthifolius</i> e <i>S. multijuga</i> inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro em solo não estéril. ....	107
Tabela 7. Quantitativos de insumos aplicados à Área III (Rio Pio) por hectare. ....	141
Tabela 8. Resumo ANOVA para a altura e diâmetro das mudas de <i>C. myrianthum</i> e <i>S. multijuga</i> inoculadas com MPCV em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. ....	152
Tabela 9. Dados de mortalidade das mudas de <i>C. myrianthum</i> e <i>S. multijuga</i> após 300 DAT da implantação do experimento a campo em Treviso - Área III/Rio Pio.....	154
Tabela 10. Caracterização química do solo de uma área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação com mudas de <i>C. myrianthum</i> inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação. ....	155
Tabela 11. Caracterização química do solo de uma área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação com mudas de <i>S. multijuga</i> inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação. ....	156

Tabela 12. Resumo da ANOVA para o carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) do solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal. ....	158
Tabela 13. Resumo da ANOVA para a atividade enzimática da arilsulfatase, $\beta$ -glicosidase, hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) e fosfatase ácida em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação (Área III/Rio Pio) revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal.....	163
Tabela 14. Resumo da ANOVA para os dados de respiração basal microbiana e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação (Área III/Rio Pio) revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal.....	169

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA Ácido-indol-acético

ACC1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate

ACP Ação Civil Pública

AN Acúmulo de nitrogênio

ANOSIM Analysis Of Similarities

AP Acúmulo de fósforo

APP Área de Preservação Permanente

BFN Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

BPCV Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

CBM Carbono da Biomassa Microbiana

CDB Convenção Sobre Diversidade Biológica

CM Colonização micorrízica

CPRM Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais

CSN Companhia Siderúrgica Nacional

DAF Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína

DAT Dias após o transplante

DAM Drenagem Ácida de Mina

DC Diâmetro do Coleto

DNPM Departamento Nacional de Produção Mineral

DO Densidade Ótica

FBN Fixação Biológica do Nitrogênio

FMA Fungo Micorrizico Arbuscular

GTA Grupo de Estudos Ambientais

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MMA Ministério do Meio Ambiente

MPCV Microrganismos Promotores do Crescimento Vegetal

MSPA Massa Seca da Parte Aérea

MSR Massa Seca das Raízes

NBM Nitrogênio da Biomassa Microbiana

PRAD Plano de Recuperação de Áreas Degradadas

$qCO_2$  Quociente Metabólico

RELARE Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola

RPCV Rizobactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

ROM Run Of Mine

SA Solo sem autoclavar

SI Solo sem inocular

TAE Tris-Acetato-EDTA

TP Teor de fósforo

TN Teor de nitrogênio

TSB Triptona de Soja

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>HIPÓTESE</b> .....	19
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	19
3.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	19
4	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
4.1	MINERAÇÃO DE CARVÃO EM SANTA CATARINA.....	20
4.2	IMPACTOS DA MINERAÇÃO DE CARVÃO EM SANTA CATARINA .....	22
4.3	ESPÉCIES PIONEIRAS COM POTENCIAL DE REVEGETAÇÃO EM ÁREAS DEGRADADAS.....	23
4.4	MICROORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL .....	26
4.4.1	<b>Fungos Micorrizicos Arbusculares (FMA)</b> .....	26
4.4.2	<b>Bactérias endofíticas</b> .....	28
4.4.3	<b>Bactéria fixadoras de nitrogênio (BFN)</b> .....	29
4.4.4	<b>Rizobactérias não formadoras de nódulos</b> .....	31
4.5	ESTUDOS ENVOLVENDO OS MPCV COM AS ESPÉCIES ARBÓREAS SELECIONADAS .....	32
4.5.1	<i>Citharexylum myrianthum</i> .....	32
4.5.2	<i>Mimosa scabrella</i> .....	32
4.5.3	<i>Senna multijuga</i> .....	33
4.5.4	<i>Schinus terebinthifolius</i> .....	33
4.6	BENEFÍCIOS DA COINOCULAÇÃO NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL .....	34
4.7	INDICADORES DE RECUPERAÇÃO AMBIENTAL .....	35
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
5	<b>CAPÍTULO I</b> .....	54
5.1	INTRODUÇÃO.....	55
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	57



<b>5.2.1</b>	<b>Coleta de solo.....</b>	<b>57</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Análise química do solo .....</b>	<b>57</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Material biológico empregado .....</b>	<b>58</b>
5.2.3.1	<i>Espécies arbóreas.....</i>	58
5.2.3.2	<i>Microrganismos utilizados .....</i>	58
<b>5.2.4</b>	<b>Meios de cultura e soluções nutritivas .....</b>	<b>59</b>
5.2.4.1	<i>Preparo dos inoculos bacterianos.....</i>	59
5.2.4.2	<i>Solução nutritiva .....</i>	60
<b>5.2.5</b>	<b>Delineamento experimental .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2.6</b>	<b>Avaliação dos efeitos da inoculação no crescimento das espécies arbóreas ...</b>	<b>62</b>
<b>5.2.7</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>63</b>
5.3	RESULTADOS .....	64
<b>5.3.1</b>	<b>Colonização micorrízica e número de esporos de FMA.....</b>	<b>64</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Avaliação do crescimento das mudas.....</b>	<b>65</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Absorção de N e P pelas mudas .....</b>	<b>73</b>
5.4	DISCUSSÃO .....	83
5.5	CONCLUSÕES .....	90
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>
<b>6. CAPÍTULO II.....</b>		<b>98</b>
6.1	INTRODUÇÃO.....	99
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	102
<b>6.2.1</b>	<b>Local de estudo e Material biológico empregado .....</b>	<b>102</b>
6.2.1.1	<i>Microrganismos selecionados.....</i>	102
6.2.1.2	<i>Espécies arbóreas selecionadas .....</i>	103
<b>6.2.2</b>	<b>Delineamento experimental .....</b>	<b>103</b>
<b>6.2.3</b>	<b>Produção de mudas .....</b>	<b>103</b>
<b>6.2.4</b>	<b>Análises químicas do substrato .....</b>	<b>105</b>

<b>6.2.5 Avaliações das mudas em viveiro .....</b>	<b>105</b>
<b>6.2.6 Análises estatísticas .....</b>	<b>106</b>
<b>6.3 RESULTADOS .....</b>	<b>107</b>
<b>6.3.1 Colonização micorrízica e número de esporos de FMA.....</b>	<b>107</b>
<b>6.3.2 Avaliação do crescimento das mudas.....</b>	<b>108</b>
<b>6.3.3 Absorção de N e P pelas mudas.....</b>	<b>115</b>
<b>6.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>122</b>
<b>6.5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>129</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>130</b>
<b>7. CAPÍTULO III .....</b>	<b>136</b>
<b>7.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>137</b>
<b>7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>140</b>
<b>7.2.1 Área de estudo.....</b>	<b>140</b>
<b>7.2.2 Delineamento experimental .....</b>	<b>142</b>
<b>7.2.3 Avaliações das mudas no campo .....</b>	<b>144</b>
<b>7.2.4 Coleta de solo .....</b>	<b>145</b>
<b>7.2.5 Caracterização química do solo .....</b>	<b>148</b>
<b>7.2.6 Atributos microbiológicos do solo .....</b>	<b>148</b>
<i>7.2.6.1 Biomassa microbiana .....</i>	<i>148</i>
<i>7.2.6.2 Atividade enzimática.....</i>	<i>149</i>
<i>7.2.6.3 Respiração basal e qCO<sub>2</sub>.....</i>	<i>150</i>
<b>7.2.7 Análises estatísticas .....</b>	<b>150</b>
<b>7.3 RESULTADOS .....</b>	<b>152</b>
<b>7.3.1 Avaliação do crescimento das mudas em área de mineração em processo de recuperação .....</b>	<b>152</b>
<b>7.3.2 Caracterização química do solo .....</b>	<b>155</b>
<b>7.3.3 Atributos microbiológicos do solo .....</b>	<b>157</b>
<i>7.3.3.1 Biomassa Microbiana.....</i>	<i>157</i>

7.3.3.2 <i>Atividade enzimática</i> .....	162
7.3.3.3 <i>Respiração basal e quociente metabólico</i> .....	168
7.4 DISCUSSÃO .....	173
7.5 CONCLUSÕES .....	182
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>183</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>191</b>
<b>ANEXO A – Autorização do Ministério Público Federal para a realização de experimento em Área de Preservação Permanente (APP) no município de Treviso – Área III/Rio Pio</b> .....	<b>192</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As principais jazidas de carvão mineral no Brasil se localizam na região Sul, sendo que os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina detêm as mais significativas frações, nessa ordem (ANM, 2019). Em Santa Catarina (SC) o carvão mineral foi descoberto no ano de 1883, e a lavra desse minério vem sendo feita desde o ano 1886 (BELOLLI, QUADROS e GUEDEI, 2002). A Bacia Carbonífera em SC se localizada na região sul do estado, representando um importante setor econômico para essa região. Somente no ano de 2018 o faturamento anual foi de aproximadamente 694 milhões de reais (SIECESC, 2018), e 3,3% da energia elétrica interna gerada no país foi pelo uso do carvão mineral em 2019 (MME, 2020).

Até a década de 80, a extração de carvão mineral era feita de forma rudimentar e sem preocupação com as consequências ambientais que o processo de extração acarretava (BELOLLI, QUADROS e GUIDI, 2002). Somente no ano de 1982 por meio da criação da Portaria 917 pelo Ministério de Minas e Energia foi que as empresas mineradoras passaram a ser cobradas em relação aos impactos ambientais gerados pela mineração de carvão e, exigiu-se projetos que conciliassem a expansão da produção de carvão com a preservação da integridade do meio ambiente (DNPM, 1982). Os rejeitos da mineração, que representam aproximadamente 70% do que é extraído, não tinham uma destinação correta e extensas áreas serviram de depósito desse material que ficou abandonado por décadas a céu aberto. Os rejeitos de mineração contêm alguns minerais como a pirita que apresentam oxidação ao entrar em contato com oxigênio, gerando sérios problemas ambientais como a drenagem ácida de mina (DAM), acarretando acidificação dos recursos hídricos e perda de solos agricultáveis na região. O passivo ambiental gerado, tanto pela extração de carvão a céu aberto, como pela deposição de rejeitos da mineração de carvão, resultou em cerca de 6.500 ha de áreas degradadas na região carbonífera de SC e teve impacto sob as três bacias hidrográficas da região (BRASIL, 2019).

No ano de 1993 foi instaurado pelo Ministério Público Federal uma Ação Civil Pública (ACP nº 93.8000533-4) com o objetivo de tentar reduzir os passivos ambientais ocasionados pela lavra do carvão. A ACP condenou os responsáveis no ano de 2000, sendo que as empresas responsáveis, além da própria União, foram obrigadas a reparar e recuperar as áreas que se encontravam degradadas.

Para a recuperação de uma área degradada é necessário um grande esforço técnico e acadêmico, com a realização de muita pesquisa. De posse destas informações e com extenso

planejamento, a recuperação de áreas degradadas tem maior chance de dar certo, em menor espaço de tempo possível e com melhor alocação de recursos. Dentro deste contexto, inúmeros são os desafios para cada uma das etapas do projeto de recuperação ambiental de áreas com alto impacto ambiental como, por exemplo, a minimização dos efeitos químicos e redução da DAM, conformação topográfica, construção do solo e implementação da cobertura vegetal (ALMEIDA; MOURA; VIEIRA, 2019).

Uma etapa muito importante no processo de recuperação é a escolha das espécies vegetais que serão empregadas na revegetação desses solos. As espécies vegetais além de garantirem uma cobertura vegetal para auxiliar o retorno das características biológicas, também proporcionam melhorias na qualidade física do solo, como maior estabilidade física, evitando que ocorram processos erosivos no solo. Neste sentido, algumas características das espécies vegetais podem acelerar essa etapa, como: crescimento rápido, pioneirismo na sucessão ecológica, nativas da região, que tenham grande produção de frutos e flores melíferas, capacidade de estabelecer associações com microrganismos promotores do crescimento vegetal, entre outras características (NERI et al., 2011).

Nas áreas de preservação permanente (APP) comumente são utilizadas espécies arbóreas para a recomposição vegetal. Dentre as espécies arbóreas com potencial de aplicação em áreas degradadas e que apresentam características desejáveis na etapa inicial de revegetação, temos: *Citharexylum myrianthum* (tucaneira), *Mimosa scabrella* (bracatinga), *Schinus terebinthifolius* (aroeira) e *Senna multijuga* (pau-cigarra) (KNAPIK; MARANHO, 2007; FERREIRA et al., 2013; MARCONATO; MAIMONI-RODELLA; ATTANASIO, 2015; FERREIRA et al., 2016; LORENZI, 2016; CITADINI-ZANETTE et al., 2017). Outra característica interessante nas espécies arbóreas selecionadas, é a capacidade dessas espécies em estabelecer associações com microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV).

Dentre os MPCV, existem os rizóbios, as rizobactérias não formadoras de nódulos, os microrganismos endofíticos e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Esses microrganismos promotores do crescimento vegetal, como serão tratados nesse trabalho, podem atuar por meio de mecanismos diretos ou indiretos na promoção do crescimento vegetal. Dentre os mecanismos atribuídos aos MPCV tem-se: fixação biológica do nitrogênio, produção de sideróforos, produção de enzima ACC deaminase, produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; ABHILASH et al., 2016; BAKHSHANDEH et al., 2020, LI et al., 2019), melhoria na absorção de água e nutrientes do solo, podendo atuar também na defesa da planta contra patógenos, entre outros

mecanismos que estão sendo estudados (BACON; WHITE, 2000; NOGUEIRA; CARDOSO, 2006; REINHARDT, 2007; NOVAIS e SIQUEIRA, 2009; SIKES; COTTENIE; KLIRONOMOS, 2009; BALOTA; MACHINESKI; STENZEL, 2011; LI et al., 2019).

Considerando que os microrganismos não vivem de forma isolada e não habitam um tecido vegetal ou a rizosfera das plantas isoladamente, cada vez mais tem sido realizados ensaios com a inoculação conjunta de vários MPCV. A coinoculação é a inoculação de dois ou mais MPCV, os quais podem atuar de forma sinérgica (TRABELSI; MHAMDI, 2013). Entretanto, efeitos nulos ou negativos também podem ser esperados, sendo esse último devido a competição entre os microorganismos que acarreta de forma indireta o antagonismo no desenvolvimento vegetal (AFKHAMI et al., 2020; LOERA-MURO et al., 2021). Muitos trabalhos vêm demonstrando que é possível obter resultados muito promissores com a técnica de coinoculação (XAVIER; GERMIDA, 2002; ZAIDI; KHAN, 2006; SUBRAMANIAN et al., 2015; MOREL et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016). No entanto, ainda são poucos os trabalhos que utilizam espécies arbóreas e praticamente inexistentes os que empregam as metodologias de inoculação e/ou coinoculação de MPCV na produção de mudas arbóreas pioneiras visando a revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão em SC.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LMPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), tem realizado pesquisas nas áreas de mineração de carvão de SC desde o ano de 2010, envolvendo o isolamento, caracterização e seleção de microrganismos com potencial em promover o crescimento vegetal de espécies arbóreas e herbáceas.

Dentre os trabalhos de isolamento e caracterização de estirpes de rizóbios, cabe aqui destacar os trabalhos realizados por Moura et al. (2016) e Hernández et al. (2017), nos quais por meio de ensaios controlados em casa de vegetação, obtiveram estirpes com potencial em promover o crescimento vegetal em espécies arbóreas e herbáceas, sendo os resultados obtidos promissores para a aplicação em condições de campo na recuperação de áreas degradada pela mineração.

Nascimento (2018) isolou bactérias endofíticas de diferentes espécies vegetais e realizou a caracterização quanto a capacidade de produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal. Várias das estirpes isoladas apresentaram grande potencial de aplicação na promoção do crescimento vegetal, entretanto, ainda não foram realizados estudos com as espécies vegetais arbóreas de interesse na revegetação de áreas degradadas.

Recentemente, o LMPB em parceria com a empresa NovaTero, realizou o primeiro registro de um inculante a base de FMA (*Rhizophagus intraradices*) – Rotella BR, para ser empregado na produção de culturas agrícolas como a soja e o milho no Brasil. Foram alcançados bons resultados com a aplicação desse inoculante à campo, com ganhos de 11% a 38% para o rendimento de grãos de milho (STOFFEL et al., 2020a), e de 11 a 58% para o rendimento de grãos de soja (STOFFEL et al., 2020b). A partir desses resultados, estudos de aplicação desse inoculante em espécies arbóreas de interesse na revegetação de áreas degradadas são importantes para avaliar possíveis benefícios dessa inoculação no crescimento vegetal.

Entender quais os atributos do solo são mais sensíveis no processo de recuperação de uma área degradada é fundamental para melhor monitorar o processo de recuperação desse ambiente. Os atributos microbiológicos do solo como carbono da biomassa microbiana, respiração basal, quociente metabólico, entre outros, são considerados mais sensíveis que os atributos físicos e químicos (GRAZZIOTTI et al., 2017). Os microrganismos no solo exercem um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes. Em trabalho pioneiro em SC realizado por Silva et al. (2019), foram avaliados atributos microbiológicos do solo em áreas de mineração com diferentes tempos de recuperação. Os autores observaram que alguns dos atributos avaliados como o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), respiração basal e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) foram mais sensíveis em detectar mudanças no solo ao longo do tempo de recuperação. No entanto, os atributos microbiológicos do solo ainda não são considerados no monitoramento das áreas degradadas por mineração de carvão em SC.



## **2 HIPÓTESE**

A coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal possibilita maior crescimento e sobrevivência de espécies arbóreas pioneiras em área de mineração em processo inicial de recuperação sob solo construído e, contribui para a melhoria dos atributos microbiológicos desse solo.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficiência da coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas pioneiras na revegetação de solos construídos em área de preservação permanente afetada pela mineração de carvão e que se encontra em processo inicial de recuperação.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o potencial da coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em promover o crescimento, a absorção de N e P e a colonização micorrízica em mudas de espécies arbóreas nativas em casa de vegetação em solo esterilizado proveniente de área de mineração de carvão em processo de recuperação ambiental;
- Avaliar o potencial da coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em promover o crescimento, a absorção de N e P e a colonização micorrízica em mudas de espécies arbóreas nativas produzidas em condições de viveiro;
- Avaliar a sobrevivência e crescimento de mudas de espécies arbóreas nativas coinoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em área de preservação permanente após a mineração de carvão;
- Avaliar a influência da inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal nos atributos microbiológicos do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação após a mineração de carvão.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

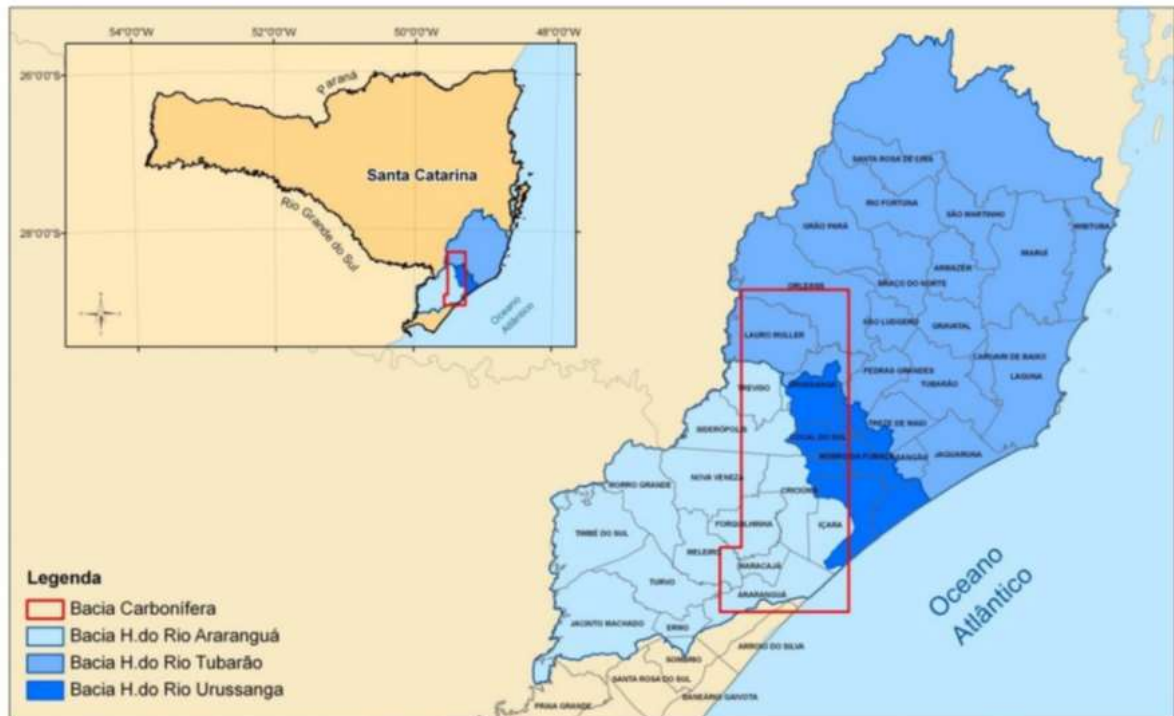
### 4.1 MINERAÇÃO DE CARVÃO EM SANTA CATARINA

O carvão mineral existente formou-se em três períodos geológicos distintos: no Carbonífero, Cretáceo e no Permiano. Aproximadamente 55% do carvão mineral teve sua origem no Cretáceo, 23,74% no Carbonífero e 16,91% no Permiano. O carvão mineral presente no Brasil originou-se no Permiano, há cerca de 260 milhões de anos (GOMES et al., 1998). O carvão mineral no Brasil é a maior fonte de energia não renovável.

No Brasil as reservas de carvão mineral se encontram em depósitos paleontológicos na região sul do país. O estado de SC possui a segunda maior reserva medida de carvão mineral do Brasil com 1.6 bilhões de toneladas, ficando atrás do Rio Grande do Sul com 6.5 bilhões de toneladas, e por último o estado do Paraná que possui uma reserva de 100 milhões de toneladas (ANM, 2019).

O Distrito Carbonífero de Santa Catarina apresenta uma área de 1.850 km<sup>2</sup> abrangendo três Bacias Hidrográficas (Araranguá, Tubarão e Urussanga) englobando os municípios de Orleans, Lauro Müller, Criciúma, Siderópolis, Treviso, Urussanga, Forquilha, Içara, Araranguá e Maracajá (Figura 1) (NASCIMENTO et al., 2002).

Figura 1. Localização das Bacias Hidrográficas do sul catarinense e delimitação da Bacia Carbonífera de SC.



Fonte: BRASIL (2018).

O carvão mineral na Bacia Carbonífera de Santa Catarina foi descoberto no ano de 1883. Desde o ano de 1886 vem sendo feita a extração do carvão em Santa Catarina (BELOLLI, QUADROS e GUEDI, 2002), mas somente na década de 1940 com a criação da Companhia Siderúrgica Nacional (CSN) foi que o estado passou a intervir na exploração efetiva do carvão. A partir de então, a extração em maior escala desse minério tomou grandes proporções em SC, chegando até mesmo a liderar em nível nacional a produção de carvão mineral durante essa época (CASTILHOS e FERNANDES, 2011).

No ano de 2018 a produção bruta de carvão mineral (ROM) no Brasil foi de 10.483.793 toneladas, onde 61,7% da produção foi proveniente do estado de Santa Catarina, 34,6% do Rio Grande do Sul e 3,7% do Paraná. O faturamento total para 2018 foi de R\$ 1.07 bilhões, SC (64%), RS (32%) e PR (4%) (SIESC, 2018). O último Balanço Energético Nacional divulgado em 2020, tendo como ano base 2019, mostrou que o consumo interno de carvão mineral para a geração de energia elétrica representou 3,3% da energia elétrica total gerada no país (MME, 2020). Há uma tendência de queda no consumo mundial de carvão mineral prevista para os próximos anos em decorrência da busca por maior eficiência energética e o uso cada vez maior

de energias renováveis (ANM, 2017). No Brasil no ano de 2019 a queda observada no consumo foi de -5,7% (MME, 2020).

## 4.2 IMPACTOS DA MINERAÇÃO DE CARVÃO EM SANTA CATARINA

Durante a maior parte da história de exploração do minério do carvão em Santa Catarina ocorreu sem nenhuma preocupação com as consequências que tal processo poderia acarretar ao meio ambiente (BELOLLI, QUADROS e GUIDI, 2002). Somente a partir do ano de 1982 por meio da criação da Portaria nº 917 é que vem sendo realizadas regulamentações ambientais visando a minimização, recuperação de áreas degradadas e medidas que freiem os impactos causados pela exploração do carvão mineral em Santa Catarina (DNPM, 1982; NASCIMENTO et al., 2002). As mineradoras precisaram aperfeiçoar os métodos de extração, de tratamento e deposição de resíduos para reduzir os impactos ambientais, entretanto, muitos problemas permanecem ainda sem solução (LOPES, SANTO e GALATTO, 2009).

A extração do carvão mineral pode ser realizada de duas formas: a céu aberto ou subterrânea por meio da abertura de bocas de mina. A extração do carvão mineral a céu aberto era feita quando o carvão se encontrava mais próximo das camadas superiores solo, até 30 m de profundidade. E o carvão mineral localizado numa profundidade maior que 30 m é extraído de forma subterrânea (KOPPE e COSTA, 2008). Atualmente o carvão mineral em SC é extraído apenas de forma subterrânea.

Independentemente do tipo de extração de carvão realizada, seja a céu aberto ou subterrânea, estima-se que de cada 1000 kg minerados cerca de 600 kg são compostos por materiais denominados rejeitos e estéreis (NASCIMENTO et al., 2002). Rejeitos e estéreis contêm normalmente pirita e outros minerais sulfetados, e quando esses minerais são expostos a oxigênio e umidade sofrem oxidação, gerando, por exemplo, ácido sulfúrico, sendo responsável pela drenagem ácida de mina (DAM). Esses rejeitos de mineração foram durante muito tempo depositados em áreas a céu aberto (CAMPOS et al., 2010).

A extração de carvão mineral a céu aberto envolvia a remoção de uma grande quantidade de rochas para se ter acesso às camadas de carvão. Esse processo de extração resultou na formação de cavas, com até 20 m de altura e na inversão dos horizontes do solo, com os estéreis de mineração situados na parte superior e a vegetação e solo depositados na base (KOPPE e COSTA, 2008). A extração de carvão mineral a céu aberto ocasionou a degradação de cerca de 6.500 ha de solos férteis na Bacia Carbonífera de SC (BRASIL, 2018).

Além do impacto visual gerado devido à retirada das camadas superficiais do solo e inversão, podem-se citar outros prejuízos associados, como: desmatamento, alteração da superfície topográfica e da paisagem, perda ou destruição de solos superficiais férteis, desestabilização de encostas e terrenos em geral, alteração de corpos de água e de níveis freáticos, exposição de áreas aos fenômenos de dinâmica superficial (como erosão e assoreamento), contaminação de corpos d'água, entre outros, que por vezes acabam gerando também problemas socioambientais (KOPEZINSKI, 2000; CAROLA, 2002; MENEZES; WATERKEMPER, 2009; CASTILHOS; FERNANDES, 2011; SILVA; FERREIRA, 2015).

Em 1993, o Ministério Público Federal instaurou uma ação civil pública (ACP nº 93.8000533-4) com o objetivo de recuperar os passivos ambientais gerados pela lavra de carvão no período de 1972 a 1989, foram considerados 24 réus entre eles empresas carboníferas, o Estado e a União, sendo de fato condenados somente no ano 2000.

Atualmente, o processo de extração de carvão mineral em Santa Catarina envolve apenas a mineração subterrânea, que embora não apresente um impacto visual tão forte quanto a mineração a céu aberto, causa impactos enormes de contaminação dos recursos hídricos por drenagem ácida de mina (DAM). Dos trechos de rios analisados no último relatório do Grupo de Estudos Ambientais (GTA) (BRASIL, 2018), que se encontram inseridos nas bacias hidrográficas abrangidas pela mineração no sul do estado, cerca de 1240 km de rios estão sob a influência da mineração, e deste montante 40,3% se mostram com elevada acidez indicado a existência de aporte de efluentes ácidos. Embora a deposição de rejeitos seja feita de acordo com as recomendações dos órgãos ambientais, mesmo assim pode ser nociva ao meio ambiente, portanto se faz necessário repensar o modelo de extração atual para garantir menos impactos sob o meio ambiente de forma geral.

#### 4.3 ESPÉCIES PIONEIRAS COM POTENCIAL DE REVEGETAÇÃO EM ÁREAS DEGRADADAS

A recuperação de áreas degradadas por métodos físico-químicos convencionais, normalmente exige um grande investimento financeiro, apresentam eficácia limitada, e podem até mesmo afetar de forma irreversível as propriedades do solo (FRANCO et al., 1992; DELGADILLO et al., 2011).

A revegetação de áreas degradadas consiste na inserção de uma cobertura vegetal visando a recuperação paisagística, assim como o controle dos processos erosivos e a recuperação das propriedades do solo (SIQUEIRA; SOARES; SILVA, 2008), além de trazer outros benefícios, como: proteção contra a radiação solar, que mantém as temperaturas mais baixas e reduz a perda de água por evaporação, maior ciclagem de nutrientes, além de beneficiar as atividades biológicas no solo, amenizando assim, os fatores adversos a sucessão ecológica (BROWN; LUGO, 1994; DA SILVA; SCARANO; CARDEL, 1995).

É importante que as espécies de plantas selecionadas para revegetação se adaptem bem às condições prevalentes de solo e ambiente, sendo ideal que essas espécies formem associação com os simbioses radiculares, especialmente as BFN e os FMA, garantindo capacidade de fixação do N<sub>2</sub> atmosférico em virtude da carência desse nutriente na maioria dos solos degradados e maior absorção de fósforo (SIQUEIRA; SOARES; SILVA, 2008).

Nesse contexto, a adoção de programas de revegetação com espécies arbóreas nativas que possuam características adaptativas a esses ambientes e pioneirismo na sucessão ecológica tendem a facilitar a recuperação desses ambientes. As espécies pioneiras são consideradas espécies chaves para o arranque inicial, pois apresentam crescimento rápido, recobrando rapidamente o solo; podem melhorar as condições físicas e químicas do solo, acumulando matéria orgânica e reciclando nutrientes; a deposição de folhas e o crescimento das raízes das espécies pioneiras estabilizam o solo, aumentam a atividade biológica, criando assim condições favoráveis para o estabelecimento de outras espécies mais exigentes (FRANCO, 1991; FRANCO et al., 1992; CDB, 2008; ALMEIDA, 2016;). Geralmente, quanto maior a degradação da área é recomendada a utilização de uma maior densidade de espécies pioneiras (ALMEIDA, 2016).

Uma espécie que apresenta excelente potencial de aplicação na revegetação de áreas degradadas é *Citharexylum myrianthum* Cham. (MARCONATO; MAIMONI-RODELLA; ATTANASIO, 2015). *C. myrianthum* é conhecida popularmente como tucaneira, pau-viola, tarumã, entre outros nomes populares, é uma espécie nativa, com ocorrência desde a Bahia ao Rio Grande do Sul (nas regiões nordeste, sudeste e sul), em formações de florestas pluviais e semidecíduas da Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (AMARAL; ANTIQUEIRA; HORBACH, 2013; LORENZI, 2016). *C. myrianthum* possui um importante papel ecológico, uma vez que, os frutos são muito apreciados por várias espécies de aves e as flores são melíferas, atraindo muitos insetos. A planta é pioneira, apresenta crescimento rápido, chegando a atingir 3 metros em 18 meses (LEITE, 2017), é adaptada a terrenos muito úmidos e brejosos, sendo considerada

indispensável nos plantios mistos destinados a recomposição de matas ciliares degradadas (LORENZI, 2016).

*Mimosa scabrella* Benth conhecida popularmente como bracatinga é uma espécie pertencente à família Fabaceae. A espécie em questão tem ocorrência nativa no estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, mais precisamente na Floresta Ombrófila Mista (FOM) (LORENZI, 2016; BAGGIO, 1994), mas também ocorre em formações da Floresta Ombrófila Densa (DUTRA; MORIM, 2015). A bracatinga é considerada uma espécie facilitadora na sucessão ecológica por suas características ecológicas como: pioneirismo, rápido crescimento, e, portanto, é bastante indicada para recomposição de áreas degradadas (CALLAWAY, 1995; CITADINI-ZANETTE et al., 2017). Essa espécie pode atingir até 3,5 metros de altura em dois anos, chega a idade reprodutiva aos três anos, vivendo aproximadamente 30 anos, além de incorporar altos níveis de N e P ao solo (LORENZI, 2016; SOBIERAJSKI; KAGEYAMA; SEBBENN, 2006; FERREIRA et al., 2013; FERREIRA et al., 2016).

Outra leguminosa com potencial de uso na recuperação de áreas degradadas é a *Senna multijuga*. *S. multijuga* é conhecida popularmente como pau-cigarra, é uma espécie nativa que ocorre em quase todo o território nacional, principalmente na mata pluvial da encosta atlântica (LORENZI, 2016). Por se tratar de uma espécie pioneira, de crescimento rápido, podendo atingir até 3,5 metros em dois anos no campo, a espécie pode ser recomendada para uso em programas de revegetação de áreas degradadas (LORENZI, 2016).

*Schinus terebinthifolius* é conhecida popularmente como aroeira-vermelha, e pertence à família Anacardiaceae. *S. terebinthifolius* é uma espécie nativa da Mata Atlântica, com ocorrência desde Pernambuco até o Mato Grosso do Sul, e na Região Sul nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, presente em diversas formações vegetais nesses locais. Em Santa Catarina ocorre ao nível do mar até 1.200 m de altitude, podendo ocorrer tanto em solos secos, arenosos e argilosos (LORENZI, 2016). A aroeira-vermelha é uma espécie pioneira, competitiva, apresenta tolerância higromórfica, boa interação biótica, muito procurada pela avifauna, possui flores melíferas, todas essas características aliadas à sua alta plasticidade ecológica, permitem que ela se desenvolva em ambientes profundamente alterados por ações antrópicas, e, portanto, é indicada para a recomposição de áreas degradadas (KAGEYAMA; GANDARA, 2000; LORENZI, 2016; CARVALHO, 1994; SOUZA et al., 2001; KNAPIK; MARANHO, 2007). As mudas se desenvolvem rápido, atingindo até 4,5 metros em dois anos (LORENZI, 2016; KNAPIK; MARANHO, 2007).

#### 4.4 MICRORGANISMOS PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL

O grupo de microrganismos com capacidade de promover o crescimento vegetal é bastante amplo e diverso filogeneticamente (BERG et al., 2014; LI et al., 2019). Podem habitar os tecidos internos vegetais e/ou a rizosfera (LI et al., 2019), sendo que essas características podem ser obrigatórias ou facultativas para os diferentes grupos e inclusive dentro deles, no caso dos FMA, por exemplo, parte do seu ciclo de vida precisa obrigatoriamente de um hospedeiro (MORTON; BENNY, 1990). Esses microrganismos podem ser comumente encontrados na rizosfera das plantas, por ser esta uma região de intensa atividade microbiana promovida principalmente pela grande liberação de exudatos pelas plantas (OLIVEIRA; URQUIAGA; BALDANI, 2003).

Os microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) podem atuar no desenvolvimento e no crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos e/ou mecanismos indiretos. Como mecanismos diretos os MPCV podem atuar na produção de reguladores de crescimento como, por exemplo, os fitohormônios - auxinas, citocininas e giberelinas, podem suprimir a produção do etileno, aumentar a captação de água e nutrientes (com ajuda de fixadores de N<sub>2</sub>, solubilizadores de fosfato, produtores de sideróforos, etc) (ABHILASH et al., 2016; BAKHSHANDEH et al., 2020). Os mecanismos indiretos incluem a inibição de patógenos através da produção de antibióticos ou enzimas líticas da parede celular, como quitinases, e induzindo os mecanismos de defesa das plantas (SARMA et al., 2015; ABHILASH et al., 2016).

Dentre os microrganismos promotores do crescimento vegetal podemos ter os seguintes grupos de microrganismos: rizóbios (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008), rizobactérias não formadoras de nódulos (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001), os microrganismos endofíticos (WILSON, 1995) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (SMITH; READ, 1997).

##### 4.4.1 Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA)

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pertencem ao filo Glomeromycota, são biotróficos obrigatórios, asseptados e colonizam intercelularmente e intracelularmente o córtex de raízes. Estima-se que os FMA são capazes de estabelecer associação com cerca de 80% das raízes de espécies vegetais (SMITH; READ, 1997; SCHÜßLER et al., 2001). O Filo



Glomeromycota conta com cerca de 288 espécies descritas (ÖPIK; DAVISON, 2016), sendo que, no Brasil foram registradas 192 spp. (MAIA et al., 2020). Com base em números morfológicos e moleculares acreditasse que o número de espécies de Glomeromycota esteja entre 2.700 e 1.700, respectivamente (ÖPIK; DAVISON, 2016).

A micorriza arbuscular forma uma associação mutualística na qual o fungo cresce nos tecidos vegetais vivos e obtém fotossintatos da planta hospedeira, e em troca a planta recebe melhorias nutricionais proporcionadas pelos FMA (SMITH; READ, 1997), principalmente em relação aos elementos de baixa mobilidade que não estão ao alcance das raízes, como é o caso do fósforo (NOGUEIRA; CARDOSO, 2006; NOVAIS; SIQUEIRA, 2009; BALOTA; MACHINESKI; STENZEL, 2011), zinco (ANDRADE et al., 2009), cobre (SOARES; SIQUEIRA, 2007) e ferro (KAHNEH et al., 2006), mas também podem proporcionar uma maior absorção de outros nutrientes como é o caso do nitrogênio (HODGE; CAMPBELL; FITTER, 2001; GOVINDARAJULU et al., 2005) e do potássio (GUPTA et al., 2002). A capacidade dos FMA de fornecer nutrientes para as plantas está associada ao micélio extrarradicular do FMA, que explora um volume muito maior de solo do que as raízes, com uma taxa de extensão cerca de 820 vezes maior do que a da raiz, aumentando consideravelmente a capacidade de absorção do sistema radicular (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os FMA também favorecem a relação água-planta (SYLVIA; WILLIAMS, 1992), podem conferir maior resistência às condições de estresse climáticos e edáficos (SMITH; READ, 1997; BACON; WHITE, 2000; REINHARDT, 2007), aumentar a tolerância das plantas à toxicidade por metais pesados como o Cd, Cr, Ni, Pb e Cu, entre outros (SINGH et al., 2019; ZHAN et al., 2019; WU et al., 2020), aumentar a proteção das plantas contra patógenos (SIKES; COTTENIE; KLIRONOMOS, 2009) e às pragas (VANNETTE; HUNTER, 2009) e contribuir para o estabilização de agregados estáveis no solo (SYLVIA, 1999; CHAO et al., 2009). Além disso, os FMA podem ainda determinar o padrão de sucessão ecológica de uma comunidade vegetal (RAMOS-ZAPATA; ORELLANA; ALLEN, 2006; STÜRMER; SIQUEIRA, 2008; MORALES-LONDOÑO et al., 2019).

Para que ocorra o estabelecimento das micorrizas arbusculares é necessária uma sequência de eventos complexos coordenados pelo fungo, pela planta e suas interações, cujos mecanismos de regulação ainda são pouco conhecidos (KIRIACHEK et al., 2009). Apesar disso, estudos sugerem que moléculas chamadas estrigolactonas produzidas e exsudadas pelas raízes de espécies hospedeiras e não hospedeiras de FMA e lipo-quito-oligossacarídeos (LCOs) produzidos pelo FMA, atuam como compostos sinalizadores da formação ou regulação da

simbiose micorrízica arbuscular na fase inicial (AKIYAMA, MATSUZAKI, HAYASHI, 2005; GARRIDO, 2009; REINHARDT, 2007; MOHANTA e BAE, 2015). Subsequente aos eventos de sinalização dessas duas moléculas, cascatas de sinalização são ativadas para desenvolver uma relação simbiótica adequada entre o FMA e a planta (MOHANTA e BAE, 2015).

Devido às excelentes características apresentadas pelos FMA, eles têm sido estudados cada vez mais nos últimos anos e comprovado a sua importância e eficácia na recuperação da cobertura vegetal de áreas degradadas, tanto com espécies vegetais inoculadas com simbiontes alóctones (POUYU-ROJAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2006) quanto por meio do manejo de comunidades nativas (SCHREINER et al., 2007; STOFFEL et al., 2016; GONZÁLEZ-ROCHA, 2016). Os FMA também têm demonstrado que desempenham as funções mais importantes em ecossistemas naturais e agrícolas, quando comparados com outros tipos de micorrizas (CARDOSO; NOGUEIRA; ZANGARO, 2017). O nível de dependência micorrízica das espécies vegetais em relação aos FMA para o seu crescimento e absorção de fósforo é bastante variável. Sendo assim, a dependência micorrízica é definida como “o grau de dependência da planta da condição micorrízica para atingir seu crescimento ou produção máxima num determinado nível de fertilidade do solo (MIRANDA; MIRANDA, 2004).

#### 4.4.2 Bactérias endofíticas

Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas apenas em 1866 foi que Bary delineou uma possível diferença entre os microrganismos endofíticos e os patogênicos de plantas (AZEVEDO, 1998). Inicialmente, os microrganismos endofíticos foram definidos como assintomáticos e devido a isso ficaram praticamente esquecidos até a década de 70.

Atualmente, são consideradas bactérias endofíticas aquelas que colonizam o interior de tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças aparente (DÖBEREINER, 1992; WILSON, 1995; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007), ocupando os espaços inter e intracelulares (GARCÍA et al., 2012). As bactérias endofíticas abrangem tanto bactérias gram-positivas como as gram-negativas, e incluem gêneros como: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Afipia*, *Aminobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Aminobacter*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Nocardia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizomonas*, *Xanthomonas*, *Zymomonas*, entre outros (LODEWYCKX et al., 2002). Algumas bactérias, como é o caso das pertencentes ao gênero *Azospirillum*, são consideradas endofíticas facultativas (BALDANI et al., 1997),

pois, podem sobreviver no solo na forma de cistos (BASHAN; HOLGUIN, 1997) e, ou, utilizar poli- $\beta$ -24 hidroxibutirato como fonte de carbono e energia (BALDANI et al., 1999) quando não associadas aos tecidos vegetais.

A atividade e a ocorrência das bactérias endofíticas no solo são fortemente influenciadas por estresses físicos (baixa umidade e alta temperatura), químicos (acidez e baixos teores de nutrientes e carbono) e biológicos (espécie vegetal não hospedeira), (BASHAN; HOLGUIN, 1997; BALDANI et al., 1999).

Os microrganismos endofíticos podem desempenhar importante papel na reabilitação e sustentabilidade dos ecossistemas, pois contribuem ou são responsáveis pela adaptação das plantas ao estresse biótico e abiótico. Estudos têm demonstrado que alguns endofíticos são capazes de incorporar N por meio da fixação biológica em quantidades que podem variar de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N, melhorar o crescimento das plantas hospedeiras por meio da produção e liberação de fitohormônios como auxinas, giberelinas e citocininas, aumentar a tolerância à condições de estresse, produzir compostos antimicrobianos que protegem a planta contra o ataque de fitopatógenos, excretar substâncias poliméricas extracelulares de imobilização metálica, entre tantos outros benefícios que esse microrganismos podem promover às plantas (BAZZICALUPO; OKON, 2000; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010; ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; REN; LI; GAO, 2011; MA et al., 2016; SUN et al., 2018). Os microrganismos endofíticos têm sido estudados visando, por exemplo, a produção de inoculantes para crescimento vegetal e biocontrole (QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; LACAVA; AZEVEDO, 2014; SANTOS et al., 2015; VERMA et al., 2018a; CHUNG et al., 2018). Entretanto, a maioria dos estudos com bactérias endofíticas são realizados com espécies de importância econômica, como a cana-de-açúcar (KLEINGESINDS et al., 2018; SILVEIRA et al., 2018; SILVA et al., 2018), milho (SANTOS et al., 2015; MARAG; SUMAN, 2018; MARAG; SUMAN; GOND, 2018) e o arroz (VERMA et al., 2018b; NAHER et al., 2018; CHUNG et al., 2018), poucos são os trabalhos que focam nos microrganismos endofíticos associados a espécies arbóreas.

#### **4.4.3 Bactéria fixadoras de nitrogênio (BFN)**

A fixação biológica do nitrogênio (BFN) é realizada por um grande e diversificado grupo de microrganismos de vida livre ou em simbiose com plantas, que possuem a enzima nitrogenase, capaz de reduzir N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>, a forma assimilável pelas plantas (VOET; VOET, 1995;

MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSAARD, 2008; BRUIJN, 2015). Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) se destacam os rizóbios. O termo “rizóbio” é utilizado para definir o grupo de BFN capaz de formar nódulos em associação com espécies de leguminosas, pois trata-se na verdade, de um grupo parafilético onde se encontram todas as bactérias pertencentes as Protobactérias com capacidade de formar esse tipo de simbiose, sendo divididos em  $\alpha$  e  $\beta$ -Proteobactérias.

Atualmente se conhecem inúmeras espécies de rizóbios, que se encontram distribuídos dentro do grupo das  $\alpha$ -Proteobactérias e  $\beta$ -Proteobactéria (VELÁZQUEZ et al., 2017). Em  $\alpha$ -Proteobactérias temos os gêneros: *Rhizobium* (JORDAN, 1982), *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1984), *Azorhizobium* (DREYFUS; GARCIA; GILLIS, 1988), *Ensifer* (CASIDA, 1982) (anteriormente *Sinorhizobium* (CHEN; YAN; LI, 1988), *Mesorhizobium* (JARVIS et al., 1997), *Allorhizobium* (DE LAJUDIE et al., 1998), *Devosia* (RIVAS et al., 2002), *Methylobacterium* (JOURAND et al., 2004), *Ochrobactrum* (TRUJILLO et al., 2005), *Phyllobacterium* (MANTELIN et al., 2006), *Shinella* (LIN et al., 2008), *Aminobacter* (MAYNAUD et al., 2012), *Microvirga* (ARDLEY et al., 2012), *Neorhizobium* (MOUSAVI et al., 2014) e *Pararhizobium* (MOUSAVI et al., 2015). Nas  $\beta$ -Proteobactéria encontram-se espécies dos gêneros *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001), *Cupriavidus* (CHEN et al., 2001) e *Paraburkholderia* (SAWANA; ADEOLU; GUPTA, 2014).

Alguns rizóbios são muito específicos, com capacidade para nodular um número reduzido de espécies, enquanto outros são menos seletivos. A eficiência para infectar as células da raiz se deve ao intercâmbio de sinais entre os simbioses. Flavonoides exsudatos pelas plantas induzem a expressão dos genes *nod* em *Rhizobium*, envolvidos na síntese dos fatores de nodulação (REDMOND et al., 1986; PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000) que estimulam os pelos radiculares permitindo a entrada de rizóbios na planta. Posteriormente, os fatores de nodulação induzem a formação de um canal de infecção e a divisão das células corticais, levando à formação dos nódulos que apresentam um interior perfeitamente estruturado (YAO; VINCENT, 1969; XI et al., 2000). Nos nódulos ocorre a redução do nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) em nitrogênio amoniacal ( $NH_3$ ). Assim, há fixação de nitrogênio sob a forma de amônia, que é disponibilizado à planta simbiote, a qual, em contrapartida, fornece metabólitos para o desenvolvimento dos rizóbios (MUNIZ; FILHO; SÁ, 2012).

Alguns trabalhos realizados nas áreas de mineração em SC têm demonstrado bons resultados de crescimento em espécies de leguminosas inoculadas com isolados de rizóbios nativos. Moura et al. (2016), isolou e avaliou a eficiência de 19 isolados de rizóbios

provenientes de áreas de mineração em Criciúma nas espécies arbóreas *Mimosa bimucronata* (maricá), *Mimosa scabrella* (bracatinga) e *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho), e alcançaram excelentes resultados com algumas das estirpes no crescimento do maricá e da bracatinga. Hernández et al. (2017) avaliou 16 dos 19 isolados obtidos por Moura et al. (2016) nas leguminosas herbáceas *Vicia sativa* (ervilhaca) e *Calopogonium mucunoides* (calopogônio), obtendo resultados promissores no crescimento das espécies avaliadas.

#### 4.4.4 Rizobactérias não formadoras de nódulos

Há a ocorrência no solo de uma grande diversidade de bactérias que vivem na rizosfera e acredita-se que de 7 a 15% de toda a superfície das raízes são ocupadas por esses microrganismos (GRAY; SMITH, 2005). Dentre as quais, muitas têm capacidade de fixar nitrogênio, algumas por meio de associação mutualística, como é o caso dos rizóbios e das bactérias endofíticas, que já foram tratados aqui, mas há também os fixadores de nitrogênio de vida livre que não necessitam associar-se às plantas, como é o caso de muitas rizobactérias não formadoras de nódulos.

As rizobactérias ou bactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV - BPCV), como são conhecidas, podem efetuar a solubilização de nutrientes do solo, como os fosfatos minerais (SOUCHIE; ABOUD; CAPRONI, 2007), são capazes de produzir hormônios vegetais, como o ácido-indol-acético (AIA) (CATTELAN, 1999). Estima-se que 80% das RPCV são capazes de produzir AIA, sendo que vai variar de acordo com a espécie de bactéria, cepa, espécie vegetal, substrato disponível e condições de cultivo. As quatro principais vias de produção de AIA estão associadas ao triptofano, que é o precursor formado nessas vias (HAYAT et al., 2010). Diversos gêneros de rizobactérias vêm sendo descritos, com interações e efeitos positivos em diversas culturas, como: arroz (ADNAN et al., 2016), lentilha (SHAH et al., 2018), milho, batata, alface, entre outras (PAREWA et al., 2018), inclusive em condições de estresse ambiental (NADEEM et al., 2014).

Dentre os gêneros mais estudados temos: *Azospirillum* (que também é considerado endofítico facultativo), *Bacillus* e *Pseudomonas* do grupo fluorescente, que auxiliam diversas culturas em seu desenvolvimento, desde a germinação até a produção (FILHO; FERRO; PINHO, 2010; MOREIRA et al., 2010). Esses gêneros podem ainda suprimir fitopatógenos pela produção de sideróforos e antibióticos (LOPER; BUYER, 1991; VOISARD, et al., 1994; LIU

et al., 2017; LIU et al., 2018). O potencial dessas bactérias ainda é pouco estudado, muito menos com espécies vegetais arbóreas visando a recuperação de áreas degradadas.

Como pode ser observado em muitos trabalhos publicados nos últimos anos, a importância da associação simbiótica entre plantas e os microrganismos promotores do crescimento vegetal é essencial para a obtenção de crescimento mais rápido, captação de nutrientes como o N e o P, além de muitos outros ganhos proporcionados pela inoculação nas inúmeras espécies estudadas. Isso deixa claro a necessidade de se investigar e conhecer melhor os mecanismos envolvidos nessas relações para o uso e aplicação desses microrganismos em maior escala, seja na agricultura ou na recuperação de áreas degradadas (POUYO-ROJAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2006; MOURA et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2017; MELO et al., 2018; CABRINI; SALA; MAGRI, 2019).

#### 4.5 ESTUDOS ENVOLVENDO OS MPCV COM AS ESPÉCIES ARBÓREAS SELECIONADAS

##### 4.5.1 *Citharexylum myrianthum*

*C. myrianthum* pode estabelecer simbiose com FMA (SIQUEIRA et al., 2007). Em estudo realizado por Pasqualini, Uhlmann e Stürmer (2007) observaram efeitos significativos nos parâmetros de crescimento e nutrição avaliados em mudas de *C. myrianthum* em condições de casa de vegetação inoculadas com comunidades de FMA. A espécie também já foi avaliada em relação a coinoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato e FMA em condições de viveiro (PASQUALINI, 2013). Embora a espécie apresenta excelente potencial de aplicação em áreas degradadas os estudos com *C. myrianthum* ainda são muito escassos em relação a inoculação de MPCV de forma geral.

##### 4.5.2 *Mimosa scabrella*

A bracatinga possui capacidade de se associar simbioticamente com rizóbios, sendo que a maioria dos estudos envolvendo a espécie tem sido estudada em relação a inoculação e associação com diferentes estirpes de rizóbios (GAIAD; CARPANEZZI, 1984; SATURNO; ANDRADE, 2015; MOURA et al., 2016). As estirpes BR3454 (*Bulkholderia mimosarum*) (CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2006) e BR3437 (*Bulkholderia* sp.) (CHEN et al., 2005) são

as estirpes recomendadas pela RELARE (Reunião da rede de laboratórios para a recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola) e autorizada pelo MAPA para a produção de inoculantes. Moura et al. (2016) isolou estirpes de rizóbios provenientes da rizosfera de indivíduos de bracatinga em áreas de mineração, e avaliou em casa de vegetação quanto a capacidade desses isolados em formar nódulos e fixar nitrogênio na espécie. Algumas das estirpes avaliadas mostraram-se muito eficientes em fixar nitrogênio.

A bracatinga também pode associar-se simbioticamente com FMA (SIQUEIRA et al., 2007). Em experimento com *M. scabrella* em condições de casa de vegetação usando solo de áreas de mineração de carvão contendo rejeitos, a inoculação de estirpes autóctones de FMA propiciou elevada colonização micorrízica, as estirpes foram eficientes na absorção de P, além do que, promoveram o acúmulo de elementos traços na parte aérea da bracatinga (STOFFEL et al., 2016).

#### **4.5.3 *Senna multijuga***

*S. multijuga* possui capacidade de se associar simbioticamente com FMA (SIQUEIRA et al., 2007). Os trabalhos que avaliaram inoculação em *S. multijuga* se resumem a estudos de inoculação simples ou múltiplas de FMA. Em trabalho realizado por Carneiro et al. (1996), *S. multijuga* apresentou elevada dependência micorrízica, no qual a espécie recebeu um inoculante contendo uma mistura de *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann e *Gigaspora margarita* Becker & Hall, tanto no tratamento sem P, como no tratamento contendo superfosfato.

Não foi relatado até o momento associação simbiótica entre rizóbios em *S. multijuga* (FARIA et al., 1984; SOUZA; SILVA; MOREIRA, 1994; LÍRIO et al., 2012), isso pode estar relacionado a especificidade rizóbio-simbionte (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994). Há estudos mostrando que a nodulação em Caesalpinoideae é muito baixa quando comparado com as outras subfamílias de Fabaceae (MOREIRA, 1994; BARBERI et al., 1998). Embora não foi observado até o momento associação simbiótica de rizóbios com a espécie, não é possível afirmar que não existe algum tipo de relação entre os rizóbios e a *S. multijuga*. Assim como as demais espécies, em *S. multijuga* há escassez de estudos de inoculação ou coinoculação de diferentes grupos de MPCV.

#### **4.5.4 *Schinus terebinthifolius***

Alguns trabalhos têm demonstrado a associação de *S. terebinthifolius* com FMA (CARNEIRO et al., 1996; POUYU-ROJAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2006; SIQUEIRA et al., 2007; SANTOS; SIQUEIRA; MOREIRA, 2008). Pouyu-Rojas, Siqueira e Santos (2006) obtiveram bons resultados de colonização micorrízica com a espécie quando inoculada com *Eutrophospora colombiana*. Em um trabalho realizado por Carneiro et al., (1996), onde a aroeira vermelha foi inoculada com uma mistura de *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann e *Gigaspora margarita* Becker & Hall, a espécie apresentou alta dependência micorrízica na ausência do P. Santos, Siqueira e Moreira (2008), em ensaio com FMA isolados de solos de mineração de bauxita no crescimento inicial de espécies arbóreas nativas, observaram que em *S. terebinthifolius* a espécie *Paraglumus occultum* (Walker) Morton & Redecker foi a que apresentou maior colonização micorrízica e nos demais parâmetros (massa seca da parte aérea, área foliar, massa seca das raízes e teor de P), sendo que os resultados foram muito superiores ao tratamento não inoculado.

Trabalhos relatando a associação ou efeito de outros microrganismos promotores do crescimento em *S. terebinthifolius* ainda são escassos ou inexistentes, para tanto, são necessários maiores estudos buscando compreender essas possíveis interações de modo a desenvolver um inoculante mais efetivo e que possa ser utilizado na recuperação de diferentes áreas degradadas.

#### 4.6 BENEFÍCIOS DA COINOCULAÇÃO NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL

Coinoculação é a introdução simultânea de microrganismos que apresentam potencial de proporcionar benefícios para as plantas. A coinoculação objetiva obter um melhor resultado a partir da premissa de que os microrganismos possam atuar de forma sinérgica na melhoria do crescimento vegetal (THOMLOUDI et al., 2019). No entanto, pode ocorrer competição entre os microrganismos envolvidos na coinoculação, levando a um efeito negativo ou nulo. Nesse caso, é possível que a inoculação de apenas um microrganismo em uma determinada planta apresente melhores resultados, ou que apenas a escolha dos microrganismos do co-inóculo não foram os ideais (TRABELSI e MHAMDI, 2013).

A coinoculação de *Bacillus subtilis* 101 com *Azospirillum brasilense* Sp245, por exemplo, não apresentou efeito sinérgico na biomassa da planta em comparação com as inoculações de um só microrganismo em tomate (*Lycopersicon esculentum*) (FELICI et al.,



2008). Entretanto, vários trabalhos têm demonstrado resultados positivos da coinoculação em relação a apenas a inoculação de um único microrganismo (XAVIER e GERMIDA, 2002; SUBRAMANIAN et al., 2015; MOREL et al., 2015; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2015; ARAÚJO et al., 2016; HIDALGO; GABRIELA, 2016).

Figueiredo et al. (2008), observou em *Phaseolus vulgaris* co-inoculado com *Rhizobium tropici* e *Paenibacillus polymixa*, maior crescimento das plantas, maior teor de nitrogênio e nodulação, quando comparados ao tratamento com apenas o rizóbio.

Zaidi e Khan (2006), em um trabalho desenvolvido em solo com baixa disponibilidade de P, testaram o co-inóculo com quatro diferentes espécies de microrganismos (*Bradyrhizobium* sp, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus awamori* e *Glomus fasciculatum*) com diferentes combinações entre eles, em *Vigna radiata* L. Wilczek. Obtiveram ao final, com a inoculação tripla entre *G. fasciculatum*, *Bradyrhizobium* sp e *B. subtilis* um aumento significativo da produção de matéria seca, teor de clorofila nas folhas e N, e absorção de P nas plantas.

Muitos dos mecanismos pelos quais os microrganismos promotores do crescimento vegetal podem atuar de forma sinérgica na promoção do crescimento vegetal ainda não foram bem elucidados. Algumas bactérias, por exemplo, afetam diretamente a germinação dos esporos de FMA e facilitam a promoção do crescimento vegetal por meio da associação com FMA (CARPENTER, LOYNACHAN, STAHL, 1995). Outro possível mecanismo seria pelo aumento da permeabilidade celular das raízes por bactérias, facilitando a colonização micorrízica, influenciando assim positivamente a fisiologia da planta (RAMASAMY et al., 2011).

Os trabalhos com coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas, ainda são poucos, porém a maioria tem demonstrado excelentes resultados (BURITY et al., 2000; JESUS; SCHIAVO; FARIA, 2005; DIAS et al., 2012) portanto, é uma área que apresenta um amplo campo de pesquisa a ser explorado.

#### 4.7 INDICADORES DE RECUPERAÇÃO AMBIENTAL

Ao longo do processo de revegetação de solos degradados, é importante a avaliação de atributos do solo que possam indicar a evolução da recuperação das áreas impactadas. Até recentemente, os atributos químicos e físicos do solo eram considerados na avaliação dos impactos e da capacidade produtiva dos plantios florestais e na avaliação da qualidade do solo, devido à íntima relação com o desenvolvimento vegetal (DORAN et al., 1994;

SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000). Entretanto, atualmente, maior atenção vem sendo dada ao estudo de atributos microbiológicos (BARETTA et al., 2005; CHAER; TÓTOLA, 2007; DA SILVA et al., 2007).

Neste contexto, os microrganismos podem aumentar a capacidade produtiva de solos por serem responsáveis principalmente pela constante ciclagem de nutrientes e na disponibilidade de elementos como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, auxiliando, portanto, no estabelecimento das espécies vegetais (MOREIRA e SIQUIERA, 2006).

Diferente dos indicadores físicos e químicos, os microrganismos possuem a capacidade de dar respostas rápidas às mudanças na qualidade do solo. Algumas vezes, mudanças na população e atividade microbiana podem ocasionar alterações nas propriedades químicas e físicas, refletindo um claro sinal de melhoria ou degradação do solo (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007). Aliado ao fato, vários estudos demonstraram que as propriedades biológicas e bioquímicas do solo, tais como a respiração basal, a atividade enzimática, o nitrogênio da biomassa microbiana, a biomassa e diversidade microbiana podem funcionar como indicadores mais sensíveis que os físicos e químicos, possibilitando detectar com maior antecedência possíveis alterações ambientais pelo uso e manejo do solo (DORAN e PARKIN, 1994; ARAÚJO e MONTEIRO, 2007; ARAÚJO et al., 2012; KHEYRODIN; GHAZVINIAN; TAHERIAN, 2012; CARVALHO; MOREIRA; CARDOSO, 2012; VASCONCELLOS et al., 2016; BALOTA et al., 2014; JUNIOR; PORTILHO; MERCANTE, 2015; ZANINETTI; MOREIRA; MORAES, 2016; FRANZLUEBBERS, 2016).

Alguns trabalhos envolvendo avaliações dos atributos microbiológicos do solo já foram realizados em áreas de mineração de carvão a céu aberto em recuperação (DOS SANTOS et al., 2008; HOLANDA NETO, 2011; DA SILVA et al., 2019; QUADROS et al., 2016). Da Silva et al. (2019) verificaram que os atributos microbiológicos edáficos como o carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) e o quociente metabólico ( $qCO_2$ ) apresentaram mudanças sensíveis em relação ao tempo de recuperação de áreas de mineração de carvão, e, portanto, possuem potencial de aplicação no monitoramento de áreas degradadas. Sendo assim, se faz necessário um trabalho de monitoramento de atributos microbiológicos desde o momento inicial do processo de revegetação de uma área degradada pela mineração de carvão para compreender melhor ao longo do processo de recuperação essa dinâmica e como essas avaliações podem ser utilizadas para diagnosticar a qualidade e melhoria desse solo.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C. et al. Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 847-850, 2016.
- ADNAN, M. et al. Isolation and characterization of effective and efficient plant growth-promoting rhizobacteria from rice rhizosphere of diverse paddy fields of indian soil. **ARPN Journal of agricultural and biological science**, v. 11, p. 9, 2016.
- AFKHAMI, M. E. et al. Tripartite mutualisms as models for understanding plant–microbial interactions. **Current opinion in plant biology**, v. 56, p. 28-36, 2020.
- AKIYAMA, K; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 824, 2005.
- ALMEIDA, D. S. S. **Recuperação ambiental da mata atlântica**. SciELO-Editus-Editora da UESC, 2016.
- ALMEIDA, V. G.; DE MOURA, E. N.; VIEIRA, G. T. Espécies vegetais utilizadas em áreas degradadas pela mineração. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 3, p. e3583710-e3583710, 2019.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- AMARAL, Weber A. Neves; ANTIQUEIRA, Lia Maris Ritter; HORBACH, Micheli A. Frutificação e ecologia da germinação de *Citharexylum myrianthum* Cham (Verbenaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, 2013.
- ANDRADE, S. A. L. et al. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. **Chemosphere**, v. 75, n. 10, p. 1363-1370, 2009.
- ANM – AGÊNCIA NACIONAL DE MINERAÇÃO. Sumário mineral, v. 37. 2017.
- ANM – AGÊNCIA NACIONAL DE MINERAÇÃO. Anuário mineral de Santa Catarina: 2017 e 2018. Santa Catarina, 2019.
- ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, jul. 2007.
- ARAÚJO, E. A. et al. Qualidade do solo: conceitos, indicadores e avaliação. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicadas nas Ciências Agrárias**, Guarapuava, v.5, n. 1, p. 187-206, jan. 2012.

ARAÚJO, É. de O. et al. Co-inoculation with rhizobacteria in association with humic acid and nitrogen on common bean development. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n. 21, p. 1908-1913, 2016.

ARDLEY, J.K. et al. *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 11, p. 2579-2588, 2012.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos associativos. **Ecologia microbiana**, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. **Fungi: multifacetated microbes**. Boca Raton: CRC Press, Anamaya Publishers, p. 189-207, 2007.

BACON, C. W.; WHITE, J. **Microbial endophytes**. Boca Raton: CRC Press, 2000.

BAGGIO, A. J. **Estudo sobre el agroflorestral tradicional de la bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) en Brasil: productividad, manejo de residuos y elaboración de compost**. 1994. Tese (Doutorado) - Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 1994.

BAKSHANDEH, E. et al. Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 1, p. 123-136, 2020.

BALDANI, J. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p.911-922, 1997.

BALDANI, J. et al. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; CARVALHO, J.G. eds. **Inter-relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS/UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.

BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; STENZEL, N. M. C. Resposta da acerola à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em solo com diferentes níveis de fósforo. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 166-175, 2011.

BALOTA, E. L. et al. Soil microbial properties after long-term swine slurry application to conventional and no-tillage systems in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 397-404, 2014.

BARBERI, A. et al. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.

BARETTA, D. et al. Efeito do monocultivo de *Pinus* e da queima do campo nativo em atributos biológicos do solo no Planalto Sul-Catarinense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, n. 5, p.715-724, Sept. 2005.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 103-121, 1997.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Springer, 2000. p. 409-410.

BELLOLI, M.; QUADROS, J.; GUIDI, A. **História do Carvão de Santa Catarina: 1950-2000**. Criciúma: Editora MEG, v. 2, 2002.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol science and technology**, v. 11, n. 5, p. 557-574, 2001.

BERG, G. et al. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 148, 2014.

BRASIL. 11º Relatório de monitoramento dos indicadores ambientais. 2019. Disponível em: <<http://acpcarvao.com.br/login/index.php>> Acesso em: abril de 2021.

BROWN, S.; LUGO A. E. Rehabilitation of tropical lands: a key to sustaining development. **Restoration Ecology**, v. 2, n. 2, p. 97-111, 1994.

BRUIJN, F. J. Biological nitrogen fixation. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). **Principles of plant-microbe interactions**. Springer, Cham, 2015. p. 215-224.

BURITY, H. A. et al. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 35, n. 4, p. 801-807, 2000.

CABRINI, P. G.; SALA, F. C.; MAGRI, M. M. R. *Torulaspora globosa*: levedura rizosférica promotora de crescimento de alface para produção de mudas e em campo. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 266-271, 2019.

CALLAWAY, R. M. Positive interactions among plants. **The Botanical Review**, v. 61, n. 4, p. 306-349, 1995.

CAMPOS, M. L. et al. Impactos no solo provocados pela mineração e depósito de rejeitos de carvão mineral. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 2, p. 198-205, 2010.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A.; ZANGARO, W. Importance of Mycorrhizae in Tropical Soils. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Basel: Springer, Cham, 2017. p. 245-267.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Mycorrhizal fungi and superphosphate on growth of tropical woody species. **Scientia Forestalis**, v. 50, p. 21-36, 1996.

CAROLA, C. R. **Trabalhadoras das minas de carvão de Santa Catarina (1937-1964)**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2002.

CARPENTER-BOGGS, L.; LOYNACHAN, T. E.; STAHL, P. D. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. **Soil biology and biochemistry**, v. 27, n. 11, p. 1445-1451, 1995.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994.

CARVALHO, F.; MOREIRA, F. M. de S.; CARDOSO, E. J. B. N. Chemical and biochemical properties of *Araucaria angustifolia* (Bert.) Ktze. forest soils in the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 1189-1202, 2012.

CASIDA JR, L. E. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 339-345, 1982.

CASTILHOS, Z. C.; FERNANDES, F. R. C. A bacia carbonífera sul catarinense e os impactos e passivos da atividade da indústria extrativa mineral de carvão na territorialidade. In: FERNANDES, F. R. C.; ENRÍQUEZ, M. A. R. S.; ALAMINO, R. C. J. (Ed.). **Recursos minerais & sustentabilidade territorial: grandes minas**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2011. p. 361-386.

CATTELAN, A J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja- Documentos (INFOTECA-E)**, 1999.

CDB – **Convention on Biological Diversity**. 2008. CDB Handbook. 3rd ed. Disponível em: <<https://www.cbd.int/handbook/>>. Acesso em: 28/05/2018.

CHAER, G. M.; TÓTOLA, M. R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 1381-1396, nov. 2007.

CHAO, A. et al. Sufficient sampling for asymptotic minimum species richness estimators. **Ecology**, v. 90, n. 4, p. 1125-1133, 2009.

CHEN, W.; YAN, G.; LI, J. Numerical Taxonomic Study of Fast-Growing Soybean Rhizobia and a Proposal that *Rhizobium fredii* be Assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p. 392-397, 1988.

CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patient. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v 51, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. et al. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel Mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005.

- CHEN, W. M. et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2006.
- CHUNG, Y. R. et al. **Plant endophytic bacteria *Bacillus oryzicola* isolated from rice rhizosphere, and development of agent for natural plant protection and plant enhancement using the same.** U.S. Patent n. 9,862,955, 9 jan. 2018.
- CITADINI-ZANETTE, V. et al. *Mimosa scabrella* Benth. (Fabaceae) melhora a restauração em áreas de mineração de carvão na Floresta Atlântica. **Cerne**, v. 23, n. 1, p. 103-114, 2017.
- DA SILVA, M. C.; SCARANO, F. R.; DE SOUZA CARDEL, F. Regeneration of an Atlantic Forest formation in the understorey of a *Eucalyptus grandis* plantation in south-eastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, 1995, 11.1: 147-152.
- DA SILVA, M. B. et al. Atributos biológicos do solo sob influência da cobertura vegetal e do sistema de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n.12, p. 1755-1761, dez. 2007.
- DA SILVA, E. P. et al. Soil attributes in coal mining areas under recovery with bracinga (*Mimosa scabrella*). **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 6, p. 497-504, 2019.
- DE LAJUDIE, P. et al. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1277-1290, 1998.
- DELGADILLO, L.A.E. et al. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación Tropical y Subtropical. **Agroecosystems**, v.14 p.597-612, 2011.
- DIAS, P. C. et al. Micorriza arbuscular e rizóbios no enraizamento e nutrição de mudas de angico-vermelho. **Revista Árvore**, v. 36, n. 6, 2012.
- DNPM – DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL. Portaria nº 917, de 06 de julho de 1982. Disponível em: <https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro45252/documento%201.pdf>. Acesso em 30 de dezembro de 2019
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, 1992.
- DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Eds.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: SSSA, 1994. p. 1-20.

DOS SANTOS, D. C. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo construído após mineração de carvão e submetido a diferentes coberturas vegetais. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 3, 2008.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., A stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rosata*. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v.38, n.1, p.89-98, 1988.

DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. 2015. *Mimosa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB100978>>. Acesso em 19 de maio de 2019.

FARIA, S. M. et al. New nodulating legume trees from southeast Brazil. **New Phytologist**, v. 98, p. 317-328, 1984.

FELICI, C. et al. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: effects on plant growth and rhizosphere microbial community. **Applied Soil Ecology**. v. 40, p. 260-270, 2008.

FERREIRA, P. I. et al. Espécies potenciais para recuperação de áreas de preservação permanente no Planalto Catarinense. **Floresta e Ambiente**, v. 20, n. 2, p. 173-182, 2013.

FERREIRA, P. I. et al. Estrutura populacional, padrão espacial e estoque de carbono em bracingais no Planalto Sul Catarinense. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 227-234, 2016.

FIGUEIREDO, M. et al. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied soil ecology**, v. 40, n.1, p. 182-188, 2008.

FILHO, L. R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.

FRANCO, A. A. **Revegetação de solos degradados**. In: Workshop sobre recuperação de áreas degradadas, Anais, I, UFRRJ, Itaguaí, p. 133-157, 1991.

FRANCO, A. A. et al. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: Um modelo tecnológico. In: Simpósio sobre Estrutura, Funcionamento e Manejo de Ecossistemas, UFRRJ, Itaguaí, p.13, 1992.

FRANZLUEBBERS, A. J. Should soil testing services measure soil biological activity? **Agricultural & Environmental Letters**, v. 1, n. 1, 2016.

GAIAD, S.; CARPANEZZI, A. A. Ocorrência de *Rhizobium* em leguminosas de interesse silvicultural para a Região Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.156-158, 1984.



- GARCÍA, A. et al. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. **Biological research**, v. 45, n. 2, p. 139-148, 2012.
- GARRIDO, J. M. G. Arbuscular mycorrhizae as defense against pathogens. In: WHITE, J. F. J.; TORRES, M. S. **Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 183-198.
- GOMES, A. P. et al. Carvão fóssil. **Estudos avançados**, v. 12, n. 33, p. 89-106, 1998.
- GONZÁLEZ ROCHA, D. A. **Fungos micorrizicos arbusculares e biocarvão no crescimento de mudas de bracatinga (*Mimosa scabrella*) e cedro (*Cedrela fissilis*) em solo de áreas de mineração de carvão**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- GOVINDARAJULU, M. et al. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 819-823, 2005.
- GRAZZIOTTI, D. et al. Microbiological attributes of soil under spontaneous restoration. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.
- GUPTA, M. L. et al. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. **Bioresource Technology**, v.81, p.77-79, 2002.
- HAYAT, Rifat et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.
- HERNÁNDEZ, A. G. et al. Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 7, p. 991-1001, 2017.
- HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of biological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 273-290, 2010.
- HIDALGO, A.; GABRIELA, S. **Determinación de la co-inoculación con microorganismos rizosféricos en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L) variedad bolona**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Loja: Universidad Nacional de Loja, 2016.
- HODGE, A.; CAMPBELL, C. D.; FITTER, A. H. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. **Nature**, v. 413, n. 6853, p. 297, 2001.

- HOLANDA NETO, M. R. **Atributos microbiológicos de um solo construído vegetado com gramíneas após mineração de carvão em Candiota/RS.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n.6, p. 811, 2015.
- JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanenseto* a new genus: *Mesorhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology** v. 47, p. 895-898, 1997.
- JESUS, E. da C; SCHIAVO, J. A.; FARIA, S. M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, 2005.
- JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.
- JORDAN, D. Family III, Rhizobiaceae Conn 1938. In: BERGEY, D. H.; KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 234-256, 1984.
- JOURAND, P. et al. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of anaerobic facultatively methylotrophic, legume root-nodulatinf-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2269-2273, 2004.
- JUNIOR, F. P. P.; PORTILHO, I. I. R.; MERCANTE, F. M. Microbiological attributes of the soil under cultivation of sugar cane with and without burning straw. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 151-164, 2015.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Recuperação de áreas ciliares. **Matas ciliares: conservação e recuperação**, v. 2, p. 249-269, 2000.
- KAHNEH, E. et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus supplement on leaf P, Zn, Cu and Fe concentrations of tea seedlings. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, v. 4, n. 1, p. 53-58, 2006.
- KHEYRODIN, H.; GHAZVINIAN, K.; TAHERIAN, M. Tillage and manure effect on soil microbial biomass and respiration, and on enzyme activities. **African Journal of Biotechnology**, [s.l], v.11, n. 81, p.14652-14659, Oct. 2012.
- KIRIACHEK, S. G. et al. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, 2009.

- KLEINGESINDS, C. K. et al. Sugarcane growth promotion by *Kosakonia* sp. ICB117 an endophytic and diazotrophic bacterium. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 5, p. 105-114, 2018.
- KNAPIK, P.; MARANHO, L.T. Avaliação da revegetação em área de mineração, região de inundação do rio Iguaçu, Araucária, PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 507-509, 2007.
- KOPEZINSKI, I. **Mineração x meio ambiente: considerações legais, principais impactos ambientais e seus processos modificadores**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- KOPPE, J. C.; COSTA, J. F. C. L. A lavra de carvão e o meio ambiente em Santa Catarina. In: SOARES, P. S. M. S.; POSSA, M. D.; VALENTE, M. **Carvão Brasileiro: tecnologia e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.
- LACAVALA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: VERMA, V. C.; GANGE, A. **Advances in Endophytic Research**. Springer India, 2014. p. 231-256.
- LEITE, I. G. **Desempenho inicial de espécies arbóreas de diferentes classes sucessionais em um sistema agroflorestal**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.
- LI, F. et al. Adaptation of plants to high-calcium content karst regions: possible involvement of symbiotic microorganisms and underlying mechanisms. **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, 2019.
- LIN, D. X. et al. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1409-1413, 2008.
- LÍRIO, E. J. et al. Efeito da inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* (Bradyrhizobiaceae) sobre o desenvolvimento de *Senna multijuga* e *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae). **Natureza On line**, v. 10, n. 4, p. 195-199, 2012.
- LIU, K. et al. Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of multiple plant diseases. **Phytopathology**, v. 107, n. 8, p. 928-936, 2017.
- LIU, K. et al. Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. **Plant Disease**, v. 102, n. 1, p. 67-72, 2018.
- LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical reviews in plant sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.
- LOERA-MURO, A. et al. Growth effects in oregano plants (*Origanum vulgare* L.) assessment through inoculation of bacteria isolated from crop fields located on desert soils. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 381-395, 2021.

LOPER, J. E.; BUYER, J. S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 4, n. 1, p. 5-13, 1991.

LOPES, R. P.; SANTO, E. L.; GALATTO, S. L. Mineração de carvão em Santa Catarina: geologia, geoquímica e impactos ambientais. In: MILIOLI, G; SANTOS, R. dos; CITADINI-ZANETTE, V. **Mineração de carvão, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no sul de Santa Catarina: uma abordagem interdisciplinar**. Curitiba: Juruá, p. 51-70, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Edição 5. Nova Odessa: Editora Instituto Plantarum, 2016.

MA, Y. et al. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. **Journal of environmental management**, v. 174, p. 14-25, 2016.

MAIA, L. C. et al. Species diversity of Glomeromycota in Brazilian biomes. **Sydowia**, v. 72, p. 181-205, 2020.

MANTELIN, S. et al. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v.56, p. 827-839, 2006.

MARAG, P. S.; SUMAN, A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). **Microbiological research**, v. 214, p. 101-113, 2018.

MARAG, P. S.; SUMAN, A.; GOND, S. Prospecting endophytic bacterial colonization and their potential plant growth promoting attributes in hybrid maize (*Zea mays* L.). **International journal of current microbiology applied sciences**, v. 7, n. 3, p. 1292-1304, 2018.

MARCONATO, G. M.; MAIMONI-RODELLA, R. C. S.; ATTANASIO, C. M. Evaluation of four methods for restoring a degraded swamp forest. **Open Journal of Forestry**, v. 5, n. 05, p. 500, 2015.

MAYNAUD, G.; et al. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 2, p. 65-72, 2012.

MELO, R. O. de et al. Desempenho inicial do milho em resposta a ácidos húmicos e bactérias promotoras de crescimento vegetal. **Revista Ceres**, v. 65, n. 3, p. 271-277, 2018.

MENEZES, C.T B. de; WATERKEMPER, K. Evolução dos processos de degradação ambiental resultante da mineração de carvão em Santa Catarina de 1930-1973. In: MILIOLLI, G.; SANTOS, R.; CITADINI-ZANETTE, V. (Coords.). **Mineração de carvão, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no sul de Santa Catarina: uma abordagem interdisciplinar**. Curitiba: Juruá, p. 205-213, 2009.

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **Dependência micorrízica de diferentes culturas anuais, adubos verdes e pastagens em solos de cerrado**. Planaltina: Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2004.

MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Empresa de Pesquisa Energética - EPE. Balanço Energético Nacional - BEN 2020 – Ano base 2019. Disponível em: <https://ben.epe.gov.br/>. Acesso em: 20 de julho de 2020.

MOHANTA, T. K.; BAE, H. Functional genomics and signaling events in mycorrhizal symbiosis. **Journal of Plant Interactions**, v. 10, n. 1, p. 21-40, 2015.

MORALES-LONDOÑO, D. M. et al. Are microbial activity and arbuscular mycorrhizal fungal community influenced by regeneration stages? A case study in Southern Brazil coastal Atlantic Rain Forest. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 94-98, 2019.

MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. *In*: ARAUJO, RS; HUNGRIA, M. **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-CNPAC/EMBRAPA-CNPQ/EMBRAPA-SPI, p. 121-150, 1994.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2nd edition. Lavras: UFLA, p. 83-161, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, p. 621-666, 2008.

MOREIRA, F. M. S. et al. Diazotrophic associative bacteria: diversity, ecology and potential applications. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.

MOREL, M. A. et al. The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: an interaction that improves plant yield. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 2, p. 134-142, 2015.

MORTON, J. B.; BENNY, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v. 37, p. 471-491, 1990.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **Nature**, v.411, p. 948–950, 2001.

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

MOUSAVI, S. A. et al. Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Systematic and applied microbiology**, v. 37, n. 3, p. 208-215, 2014.

- MOUSAVI, S. A. et al. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, n. 2, p. 84-90, 2015.
- MUNIZ, A. W.; FILHO, J. A. W; SÁ, E. L. S. Promoção de crescimento vegetal por rizóbios. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 25, n.3, 2012.
- NADEEM, S. M. et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 429-448, 2014.
- NAHER, K. et al. Effects of different sources of nitrogen on endophytic colonization of rice plants by *Azospirillum* sp. B510. **Microbes and environments**, v. 33, n. 3, p. 301-308, 2018.
- NASCIMENTO, F. M. F. et al. **Impactos ambientais nos recursos hídricos da exploração de carvão em Santa Catarina**. 2002.
- NASCIMENTO, F. X. I. **Promoting plant growth using ACC deaminase-producing bacteria: insights into plant-bacterial interactions and agricultural and biotechnological applications**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.
- NERI, A. V. et al. Espécies de Cerrado com potencial para recuperação de áreas degradadas por mineração de ouro, Paracatu-MG. **Revista Árvore**, v. 35, p. 907-918, 2011.
- NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Plant growth and phosphorus uptake in mycorrhizal rangpur lime seedlings under different levels of phosphorus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.93-99, 2006.
- NOVAIS, C. B. de; SIQUEIRA, J. O. Formononetin application on colonization and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi in *Brachiaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 496-502, 2009.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia-Documentos, 2003.
- ÖPIK, M.; DAVISON, J. Uniting species- and community-oriented approaches to understand arbuscular mycorrhizal fungal diversity. **Fungal Ecology**, v. 24, p. 106-113, 2016.
- PAREWA, H. P. et al. Sustainable crop production and soil health management through plant growth-promoting rhizobacteria. *In*: SINGH, M.V. **Role of Rhizospheric Microbes in Soil**. Springer, Singapore, 2018. p. 299-329.
- PASQUALINI, D.; UHLMANN, A.; STÜRMER, S. L. Arbuscular mycorrhizal fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plants species from the Atlantic rain forest in South Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 245, n. 1-3, p. 148-155, 2007.

PASQUALINI, D. et al. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias solubilizadoras de fosfato como alternativas para agricultura familiar e recomposição florística. 2013. Tese (Doutorado em Ciências do Solo), Universidade Federal Estadual de Santa Catarina, Lages, 2013.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.180-201, 2000.

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O.; SANTOS, J. G. D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 3, 2006.

QUADROS, P. D. et al. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. **Applied soil ecology**, v. 98, p. 195-203, 2016.

QUECINE, M. C.; BATISTA, B. D.; LACAVALA, P. T. Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria. **Biotechnology: plant biotechnology**, v. 2, p. 377-423, 2014.

RAMASAMY, K. et al. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 44, n. 4, p. 637-649, 2011.

RAMOS-ZAPATA, J. A; ORELLANA, R.; ALLEN, E. Mycorrhizal dynamics and dependence of "*Desmoncus orthacanthos*" Martius (Arecaceae): a native palm of the Yucatan Peninsula (Mexico). **Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América**, v. 31, n. 5, p. 364-370, 2006.

REDMOND, J. et al. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, v.323, p.632-635, 1986.

REINHARDT, D. Programming good relations—development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in plant biology**, v. 10, n. 1, p. 98-105, 2007.

REN, A.; LI, C.; GAO, Y. Endophytic fungus improves growth and metal uptake of *Lolium arundinaceum* Darbyshire ex. Schreb. **International journal of phytoremediation**, v. 13, n. 3, p. 233-243, 2011.

RIVAS, R. et al. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (Lf) Druce. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, 2002.

SANTOS, J. G. D.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares isolados de solos de áreas de mineração de bauxita no crescimento inicial de espécies nativas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. 1, 2008.

SANTOS, J. da S. et al. Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 1, p. 78-85, 2015.

SARMA, B. K. et al. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 87, p. 25-33, 2015.

SATURNO, D. F.; ANDRADE, D. S. A. Diversidade de Rizóbios que nodulam bracinga isolado de solos cultivados e de floresta. **Uniciências**, v. 19, n. 1, 2015.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 429, 2014.

SCHREINER, R. P. Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of 'Pinot noir' (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorus. **Applied soil ecology**, v. 36, n. 2-3, p. 205-215, 2007.

SCHOENHOLTZ, S. H.; MIEGROET, H. van; BURGER, J. A. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. **Forest Ecology and Management**, v.138, p.335-356, 2000.

SCHÜBLER, A. et al. Analysis of partial Glomales SSU rRNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. **Mycological Research**, v. 105, n. 1, p. 5-15, 2001.

SHAH, S. et al. Potential and prospect of plant growth promoting rhizobacteria in lentil. *In*: SINGH, A. K.; SANGLE, U. **Scientific lentil production**. Delhi: Satish Serial Publishing House, 2018.

SIECESC – SINDICATO DA INDÚSTRIA DE EXTRAÇÃO DE CARVÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA. **Carvão mineral – dados estatísticos ano 2018**. Disponível em: [http://www.siecesc.com.br/pdf/dados\\_estatisticos\\_ano\\_2018.pdf](http://www.siecesc.com.br/pdf/dados_estatisticos_ano_2018.pdf). Acesso em 20 de fevereiro de 2020.

SIKES, B. A.; COTTENIE, K.; KLIRONOMOS, J. N. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 6, p. 1274-1280, 2009.

SILVA, L. M.; FERREIRA, R. L. Impacto ambiental pela mineração de carvão no Sul de Santa Catarina. **Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 6, n. 4, 2015.

SILVA, P. R. A. et al. Draft genome sequence of *Paraburkholderia tropica* Ppe8 strain, a sugarcane endophytic diazotrophic bacterium. **Brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 2, p. 210-211, 2018.

SILVEIRA, A. P. D. et al. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-13, 2018.

SINGH, G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoextraction of toxic metals by *Zea mays* L. from tannery sludge. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 28, n. 8, p. 729-746, 2019.



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

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; SILVA, C. A. Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Org.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo - Ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2 ed. Porto Alegre: Metrópole Editora Ltda, v. 1, p. 495-524, 2008.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. San Diego, Academic Press, p. 605, 1997.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Mycorrhiza and phosphate protection of tropical grass against heavy metal toxicity in multi-contaminated soil. **Biology and Fertility Soils**, v. 44, p. 833-41, 2007.

SOBIERAJSKI, G. da R; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Benth (Leguminosaceae) Mating system in nine *Mimosa scabrella* Benth population (Leguminosaceae). **Sistema**, n. 71, p. 37-49, 2006.

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

SOUZA, L. A. G; SILVA, M. F; MOREIRA, F. W. Capacidade de nodulação em cem leguminosas da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 24, n. 18, p. 9-18, 1994.

SOUZA, P. A. et al. Estabelecimento de espécies arbóreas em recuperação de área degradada pela extração de areia. **Cerne**, v. 7, n. 2, 2001.

STOFFEL, S. G. C. et al. Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em substrato contendo rejeito de mineração de carvão. **Cerne**, v. 22, n. 2, 2016.

STOFFEL, S. C. G. et al. Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, 2020a.

STOFFEL, S. C. G. et al. Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 5, p. 702-713, 2020b.

STÜRMER, S. L.; SIQUEIRA, J. O. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em ecossistemas brasileiros. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. UFLA, Lavras, p. 537-584, 2008.

SUBRAMANIAN, P. et al. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 3, p. 327-332, 2015.

SUN, W. et al. Bacterial communities of three plant species from Pb-Zn contaminated sites and plant-growth promotional benefits of endophytic *Microbacterium* sp.(strain BXGe71). **Journal of hazardous materials**, 2018.

SYLVIA, D. M.; WILLIAMS, S. E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. **American Society of Agronomy** (special publication), 1992.

SYLVIA, D. M. Fundamentals and applications of arbuscular mycorrhizae: A “biofertilizer” perspective. **Soil Fertility, Soil Biology, and Plant Nutrition Interrelationships**, p. 705-723, 1999.

THOMLOUDI, E. E. et al. Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants-The compatibility issue. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 12, n. 2, p. 61-77, 2019.

TRABELSI, D.; MHAMDI, Ridha. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

TRUJILLO, M. E. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VANNETTE, R. L; HUNTER, M. D. Mycorrhizal fungi as mediators of defence against insect pests in agricultural systems. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 11, n. 4, p. 351-358, 2009.

VASCONCELLOS, R. L. F. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein as potential indicators of soil quality in a recuperation gradient of the Atlantic Forest in Brazil. **Land Degradation & Development**, v. 27, n. 2, p. 325-334, 2016.

VELÁZQUEZ, E. et al. Current status of the taxonomy of Bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In: ZAIDI, A.; MUSARRAT, M. S. J. **Microbes for Legume Improvement**. Springer, Cham, 2017. p. 1-43.

VERMA, S. K. et al. Fungal disease prevention in seedlings of rice (*Oryza sativa*) and other grasses by growth-promoting seed-associated endophytic bacteria from invasive *Phragmites australis*. **Microorganisms**, v. 6, n. 1, p. 21, 2018a.

VERMA, S. K. et al. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1-2, p. 223-238, 2018b.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2nd edition. John Wiley & sons, Inc., New York, 1995.

VOISARD, C. et al. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. In: O’GARA, F.; DOWLING, D. N.; BOESTEN, B. **Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs**. Wiley-Blackwell, p. 67-89, 1994.

XAVIER, L. J. C.; GERMIDA, J. J. Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 181-188, 2002.

XI, C. et al. Symbiosis-specific expression of *Rhizobium etli* casa encoding a secreted calmodulin-related protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p. 11114 – 11119, 2000.

ZAIDI, A.; KHAN, M. S. Co-inoculation effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Glomus fasciculatum* on green gram-*Bradyrhizobium* symbiosis. **Turkish journal of agriculture and forestry**, v. 30, n. 3, p. 223-230, 2006.

ZANINETTI, R. A.; MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C. Physical, chemical, and biological attributes of a Xanthic Oxisol after forest conversion to rubber tree plantation in the Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1061-1068, 2016.

ZHAN, F. et al. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and heavy metal accumulation of bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] grown in a lead–zinc mine wasteland. **International journal of phytoremediation**, v. 21, n. 9, p. 849-856, 2019.

YAO, P. Y; VINCENT, J M. Host specificity in the root hair" curling factor" of *Rhizobium* spp. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 413-424, 1969.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, p. 274-276, 1995.

WU, J.-T. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi effect growth and photosynthesis of *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel under copper stress. **Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 62-69, 2020.

## 5 CAPÍTULO I

Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas em condições de casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação.

### RESUMO

A mineração de carvão a céu aberto em Santa Catarina ocasionou a degradação de 6.500 ha, atingiu três bacias hidrográficas que sofrem com a acidificação gerada pelos resíduos do processo de mineração, levando inclusive à problemas socioambientais nas comunidades abrangidas. A revegetação dessas áreas com as espécies arbóreas pioneiras *Citharexylum myrianthum*, *Schinus terebinthifolius*, *Senna multijuga* e *Mimosa scabrella* pode ser considerada uma alternativa promissora, uma vez que essas espécies apresentam crescimento rápido e são adaptadas a condições de baixa fertilidade do solo e alta luminosidade. Estudos têm demonstrado que a coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) em espécies arbóreas podem aumentar a sobrevivência, o crescimento e facilitar a adaptação das mudas em ambientes que apresentam condições estressantes, como é o caso das áreas de mineração de carvão. O objetivo desse trabalho foi avaliar em condições controladas de casa de vegetação, os efeitos da coinoculação de MPCV nessas quatro espécies arbóreas pioneiras em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. Os microrganismos selecionados para esse estudo consistiram em um rizóbio (R) *Rhizobium* sp.; uma bactéria endofítica (E1) *Pseudomonas* sp.; uma bactéria rizosférica (E2) *Pantoea* sp. e um inoculante comercial a base do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Rizhophagus intraradices* (F) Rotella BR. Foram feitas coinoculações com todas as combinações possíveis entre os quatro microrganismos, e inclusive a inoculação simples de cada um. Após 180 dias de crescimento em casa de vegetação, as mudas foram avaliadas quanto ao crescimento, absorção de N e P, colonização micorrízica (CM) e número de esporos de FMA. De forma geral, a CM em *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. terebinthifolius* nos tratamentos que receberam o inoculante comercial a base de FMA foi baixa, variando de 2% a 22%. Em *C. myrianthum* e *M. scabrella* nas mudas inoculadas com o tratamento de tripla inoculação R+E1+F apresentaram incrementos de 10% e 90% na altura, 33% e 94% no diâmetro, 313% e 192% na massa seca da raiz (MSR) e de 254% e 221% na massa seca da parte aérea (MSPA), respectivamente, em comparação com o controle sem inoculação (SI). Nas mudas de *S. terebinthifolius* o tratamento de tripla inoculação E1+E2+F apresentou um incremento de 35% na altura, 22% no diâmetro, 80% na MSR e de 93% na MSPA em relação ao tratamento SI. Em *S. multijuga* nas mudas inoculadas com os tratamentos de coinoculação R+E1+F e o MIX com incrementos de 66% na altura e de 64% no diâmetro, na MSR 426% (R+E1+F) e 326% (MIX) e na MSPA 445% (R+E1+F) e 555% (MIX) em comparação com o tratamento controle SI. Verificou-se que em *C. myrianthum* e *S. multijuga* os tratamentos que mais influenciaram no crescimento vegetal estão entre os tratamentos que promoveram maior absorção de N, já em relação a absorção de P essa mesma relação foi verificada em *C. myrianthum* e em *S. terebinthifolius*. Em condições de casa de vegetação a coinoculação de microrganismos promoveu o crescimento das quatro espécies avaliadas em solo proveniente de área de mineração em recuperação e, apresenta potencial de aplicação na produção de mudas visando a revegetação de áreas degradadas.

Palavras-chave: Revegetação; Promoção do crescimento vegetal; Espécies pioneiras; Sinergismo; Áreas degradadas.

## 5.1 INTRODUÇÃO

O carvão mineral é uma importante fonte de energia não renovável, com significativa importância econômica para a região sul do estado de Santa Catarina. No entanto, por mais de um século a exploração desse minério resultou em impactos ambientais profundos, principalmente a extração realizada a céu aberto, que deixou consequências ambientais gravíssimas afetando o solo, importantes bacias hidrográficas, e além de tudo, resultou em problemas socioambientais na região (SILVA et al., 2013; CHAVES, 2016; ROCHA-NICOLEITE, OVERBECK, MÜLLER, 2017; MENEZES et al., 2019).

Estima-se que 6.500 hectares de solos foram degradados na Bacia Carbonífera Catarinense (BRASIL, 2019). Para que a recuperação dessas áreas seja eficaz, o primeiro passo é o planejamento afim de evitar maiores danos (HOLL e AIDE, 2011). Por isso, estudos visando a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão em SC são fundamentais.

A revegetação de áreas degradadas é uma técnica que tem por objetivo a formação de uma cobertura vegetal sob o solo. É importante que a revegetação seja realizada logo após a reconstrução dos solos nas áreas degradadas, pois, o rápido recobrimento evita que ocorra erosão nesse solo, especialmente por se tratar de um solo que apresenta características químicas, físicas e biológicas diferentes de um solo natural (BASSET, SIMCOCK, MITCHELL, 2005; BRASIL, 2008; ROCHA-NICOLEITE et al., 2013; ROCHA-NICOLEITE, OVERBECK, MÜLLER, 2017). A escolha das espécies arbóreas é parte fundamental nesse processo. Dentre as características importantes nas espécies arbóreas selecionadas, o crescimento vegetal rápido é importante pela necessidade de estabelecer rapidamente uma cobertura vegetal no solo. Nesse caso, as espécies pioneiras seriam as mais indicadas para o plantio inicial, que além de apresentarem crescimento rápido, possuem boa adaptação à solos com baixa fertilidade e alta luminosidade (ROCHA-NICOLEITE et al., 2013). Além disso, é desejável que as espécies nativas apresentem capacidade de produzirem frutos e flores atrativos a avifauna e aos insetos (ALMEIDA; MOURA; VIEIRA, 2019).

Outra característica apreciável na escolha das espécies é a capacidade de estabelecerem relações simbióticas com microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV), como rizóbios e/ou fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Além destes, há ainda uma diversidade de microrganismos endofíticos e rizosféricos que podem promover o crescimento vegetal (PHILIPPOT et al., 2013; NANJUNDAPPA et al., 2019). Estudos de inoculação de microrganismos em espécies arbóreas visando a recuperação de áreas degradadas

pela mineração em Santa Catarina ainda são poucos (GONZÁLEZ, 2016; STOFFEL et al., 2016; MOURA et al., 2016; SILVA, 2020), e menos ainda considerando a coinoculação desses microrganismos (SILVA, 2020). A coinoculação pode favorecer ainda mais o desenvolvimento vegetal, uma vez que os microrganismos podem atuar de forma sinérgica (CELY et al., 2016; WANG et al., 2019; NANJUNDAPPA et al., 2019).

No presente estudo foram selecionados quatro microrganismos com capacidade de promover o crescimento vegetal com base em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LMPB) – UFSC. As espécies vegetais escolhidas foram: *Citharexylum myrianthum*, *Mimosa scabrella*, *Schinus terebinthifolius* e *Senna multijuga*, as quais são espécies pioneira e nativas na Bacia Carbonífera Catarinense e apresentam potencial de emprego na recuperação de áreas degradadas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas na recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão em SC.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Coleta de solo

Para a realização dos experimentos em condições controladas em casa de vegetação foi coletado solo em uma área de preservação permanente (APP) que sofreu processo de mineração a céu aberto durante as décadas de 60 e 70. A área de coleta de solo – Área IV Belluno, localiza-se no município de Siderópolis, SC e compreende uma área total de 42,23 ha. No ano de 2013 se deu início ao projeto de recuperação da Área IV Belluno e finalizado em 2014. Atualmente essa área se encontra em estágio inicial de sucessão ecológica. Dentre as ações para a recuperação da Área IV Belluno, foram executadas: remodelamento topográfico, construção do solo, introdução da cobertura vegetal, implantação de sistemas de drenagem superficial, adição de calcário nas lagoas ácidas e plano de monitoramento ambiental. Para a construção de solo nessa área de APP foi estabelecido uma espessura de 120 cm, sendo que nos últimos 30 cm de solo construído, foram adicionados calcário, cama de aviário, turfa e fertilizantes químicos (NPK). O solo utilizado nos ensaios em casa de vegetação foi coletado nessa área no ano de 2017, na camada de 0 a 20 cm de profundidade e posteriormente homogeneizado.

### 5.2.2 Análise química do solo

As análises químicas do solo foram realizadas pelo Laboratório de Solos do Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar (CEPAF) da Epagri, seguindo as metodologias propostas por Tedesco et al. (1995). Na tabela 1 é possível observar os resultados das principais análises químicas desse solo. De acordo com o Manual de Adubação e Calagem para os estados do RS e SC (2016), o pH desse solo é considerado muito baixo, a matéria orgânica é baixa, a capacidade de troca de cátions média, fósforo baixo e potássio, cálcio e magnésio apresentaram valores considerados altos.

Tabela 1. Análises químicas do solo usado nos experimentos em casa de vegetação coletado na Área VI-Belluno, Siderópolis, SC.

%Argila m/v	pH H <sub>2</sub> O 1:1	Índice SMP	H + Al	CTC pH 7,0	MO %	N g/kg	P mg/dm <sup>3</sup>	K 92,0	Al cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup>	Ca 6,0	Mg 14,7
38	4,7	5,8	5,3	14,9	1,5	0,75	8,3	92,0	1,3	6,0	14,7

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Notas: H = hidrogênio; Al = alumínio; CTC = capacidade de troca de cátions; MO = matéria orgânica; P = fósforo; K = potássio; Ca = cálcio; Mg = magnésio.

## 5.2.3 Material biológico empregado

### 5.2.3.1 Espécies arbóreas

Foram utilizadas quatro espécies arbóreas nativas da região sul do estado de Santa Catarina: *Citharexylum myrianthum* Cham. (tucaneira), *Mimosa scabrella* Benth. (bracatinga), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha) e *Senna multijuga* (Rich.) H.S.Irwin & Barneby (pau-cigarra). (COLONETTI et al., 2009). As sementes de *C. myrianthum*, *S. terebinthifolius* e *Senna multijuga* foram adquiridas junto ao Instituto Brasileiro de Florestas (IBF). Já as sementes de *M. scabrella* foram adquiridas com a Embrapa Agrobiologia de Seropédica, RJ.

### 5.2.3.2 Microrganismos utilizados

Quatro microrganismos promotores do crescimento vegetal foram selecionados para os testes de promoção do crescimento vegetal de espécies arbóreas nativas em casa de vegetação, sendo: uma estirpe de rizóbio - UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) (MOURA et al., 2016), uma estirpe de rizobactéria - MSR2 (*Pantoea phytobeneficialis* nov.) (NASCIMENTO; GLICK; ROSSI, 2019), uma estirpe endofítica - SC5 (*Pseudomonas thivervalensis*) (NASCIMENTO, GLICK; ROSSI, 2019) e um inoculante comercial a base do fungo micorrízico arbuscular (FMA) *Rhizophagus intraradices* (Rotella BR) (Tabela 2). As estirpes bacterianas foram obtidas em estudos prévios de isolamento, caracterização, testes de promoção de crescimento, solubilização de fosfato e produção de fitohormônios realizados por pesquisadores do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LMPB) da Universidade Federal Santa Catarina (UFSC), enquanto o inoculante micorrízico é um produto comercial que vem



sendo avaliado em experimentos recentes deste laboratório (STOFFEL et al., 2020a; STOFFEL et al., 2020b).

Tabela 2. Principais características dos microrganismos promotores do crescimento vegetal selecionados para os experimentos em casa de vegetação na promoção do crescimento vegetal de quatro espécies arbóreas.

Estirpe	Abreviaturas utilizadas nesse experimento	Espécie	ACCd*	AIA**	SP***	Local de isolamento	Autores
SC5	E1	<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+	+	Tecidos internos de um fruto de <i>Solanum capsicoides</i> na Barra da Lagoa, Florianópolis, SC	NASCIMENTO; GLICK; ROSSI, 2019
MSR2	E2	<i>Pantoea sp.</i>	+	+	+	Rizosfera de <i>M. scabrella</i>	NASCIMENTO et al., 2020
UFSC-B8	R	<i>Rhizobium sp.</i>	-	+	+	Rizosfera de <i>M. scabrella</i> em áreas de mineração e carvão	MOURA et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2017
RI	F	<i>Rhizophagus intraradices</i>	-	-	-	Inoculante comercial a base de FMA – Rotella BR	

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Notas: \* Atividade da 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase; \*\*Ácido indol-acético; \*\*\*Solubilização de fosfato

## 5.2.4 Meios de cultura e soluções nutritivas

### 5.2.4.1 Preparo dos inoculos bacterianos

Para o crescimento do isolado UFSC-B8 (Tratamento R) foi utilizado o meio de cultura yeast manitol (YM) contendo (em g/L<sup>-1</sup>) manitol-10,0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0,2 g; NaCl 0,1 g; extrato de levedura 0,5 g; água destilada 1000 ml. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,8 com solução 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl ou NaOH. Já para o crescimento dos isolados

SC5 (Tratamento E1) e MSR2 (Tratamento E2) foi utilizado o meio de cultura Tryptone Soya Broth (TSB) contendo (em g/L<sup>-1</sup>): peptona de caseína (pancreática) 17,0 g; peptona de soja (digerido com papaína) 3,0 g; NaCl 5,0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g e glicose 2,5 g. O pH do meio TSB é 7,3. Em seguida, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, os isolados foram repicados para erlenmeyers contendo 100 mL do meio de cultura respectivo e, incubados a 28 °C, sob agitação a 150 rpm em mesa agitadora (MA 830, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) por 48 horas. Após, foi realizada a leitura em espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105 (Piracicaba, Brasil) no comprimento de onda de 540 nm para a bactéria crescida em YM e em 600 nm para as bactérias crescidas em TSB, para assegurar uma densidade óptica (DO) de 0,5, quando necessário foi corrigido o inóculo usando meio YM ou TSB estéril.

#### 5.2.4.2 Solução nutritiva

Durante o período dos ensaios em casa de vegetação, as mudas receberam duas vezes na semana 5 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada com baixo teor de nitrogênio e baixo teor de fósforo para manter as condições nutricionais do solo. A solução era composta por (em mL/L): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mol/L 1,0; K; MgSO<sub>4</sub> 1 mol/L 2,0; KCl 1 mol/L 5,0; CaCl<sub>2</sub> 1 mol/L 5,0; solução de micronutrientes [(em g/L) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2,86; MnCl<sub>2</sub> 1,81; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,22; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,08; NaMO.4H<sub>2</sub>O 0,02] 1,0, Fe-EDTA [(em g/L) FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 24,1; EDTA 25,1] 1,0. A solução foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Nos demais dias da semana as plantas receberam a aplicação de H<sub>2</sub>O destilada e esterilizada previamente em autoclave a 121°C por 15 min.

#### 5.2.5 Delineamento experimental

Os ensaios consistiram em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) para cada espécie vegetal de forma independente. Cada ensaio contou com 15 diferentes tratamentos de inoculação envolvendo o emprego dos quatro microrganismos promotores do crescimento vegetal já descritos anteriormente, sendo: um inoculante a base de fungo micorrízico arbuscular (F), um rizóbio (R), uma bactéria endofítica (E1) e uma bactéria rizosférica (E2). Os tratamentos compreenderam a inoculação de apenas um microrganismo ou na combinação (coinoculação) de dois ou mais microrganismos, como se segue: R; E1; E2; F; R+E1; R+ E2;

R+F; E1+E2; E1+F; E2+F; R+E1+E2; R+E1+F; E1+E2 +F; R+E2+F e R+E1+E2+F (a combinação com os quatro microrganismos será tratado aqui como MIX) e dois tratamentos controles sem inoculação: um com solo não autoclavado (S/A) e um com solo autoclavado (SI). Totalizando assim, 17 tratamentos por espécie com cinco repetições cada tratamento, ou seja, 85 unidades amostrais por planta.

No ensaio com *M. scabrella* foi incluído um tratamento adicional que correspondeu a inoculação com a estirpe BR3437 a qual é atualmente uma das estirpes de rizóbio recomendadas pela Embrapa para a inoculação na espécie (MAPA, 2011). A estirpe foi cedida pela Embrapa Agrobiologia do Rio de Janeiro.

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação em condições controladas e tiveram uma duração de 180 dias após a emergência (DAE). Previamente ao plantio, as sementes das quatro espécies passaram por desinfecção superficial em álcool 70% e hipoclorito de sódio 2% e, em seguida por seis lavagens em água destilada estéril. O tempo de imersão das sementes em álcool e em hipoclorito de sódio foram diferentes entre as espécies, sendo que para *C. myrianthum* e *M. scabrella* foi de 1 min e 30 s em álcool e 5 minutos em hipoclorito de sódio e, em *S. terebinthifolius* e *S. multijuga* foi 1 min em álcool 3 e 2 min, respectivamente, em hipoclorito de sódio. Posteriormente, as sementes de *M. scabrella* e de *S. multijuga* foram submetidas a quebra de dormência. Para *M. scabrella*, as sementes foram mantidas a temperatura de 80 °C por 1 min e após, ficaram imersas *overnight* em água estéril a temperatura ambiente. Já as sementes de *S. multijuga* ficaram imersas em água estéril em temperatura ambiente por 12 h. Após, as sementes de todas as espécies utilizadas foram colocadas em placas de Petri estéreis contendo papel filtro umedecido e então transferidas para BOD até a pré-germinação. Posteriormente, cerca de quatro sementes pré-germinadas foram semeadas em cada tubete de 280 cm<sup>3</sup> contendo o solo coletado de uma área de mineração de carvão no município de Siderópolis (como descrito no item 3.2.1). O solo utilizado nesses ensaios em casa de vegetação foi previamente esterilizado duas vezes em autoclave por uma hora a 121 °C.

No momento da semeadura foi adicionado 1 mL de cada um dos inóculos pré-crescidos nos meios de cultura YM (R) e TSB (E1 e E2) por tubete de acordo com cada tratamento e cerca de 200 propágulos de FMA por tubete, também de acordo com cada tratamento.

Após a emissão da segunda folha cotiledonar, foi fixado dentro de cada tubete uma ponteira estéril de 1 mL e foi adicionada uma fina camada de uma mistura esterilizada de areia (10 kg), clorofórmio (900 mL) e parafina (10 g), recobrando o solo, com a finalidade de evitar

possíveis contaminações no momento da aplicação de água ou solução nutritiva e, contaminação por insetos que podem transitar entre os tubetes contaminando o experimento.

### **5.2.6 Avaliação dos efeitos da inoculação no crescimento das espécies arbóreas**

Após 180 dias de crescimento das mudas em casa de vegetação, foi realizado o desmonte dos experimentos, sendo avaliados os seguintes parâmetros de crescimento das mudas: altura, diâmetro, matéria seca das raízes (MSR) e matéria seca da parte aérea (MSPA). As mudas também foram avaliadas em relação a nutrição: teor de nitrogênio (TN), acúmulo de nitrogênio (AN), teor de fósforo (TP) e acúmulo de fósforo (AP), e em relação ao número de esporos (NE) e colonização micorrízica (CM) nos tratamentos inoculados com FMA.

Para determinar a massa seca da parte aérea e das raízes, o material vegetal de cada muda foi cortado, lavado (somente raízes) e posteriormente seco em estufa com circulação de ar a 65 °C até atingir massa constante. Antes das raízes serem transferidas para secagem, cerca de 1 g de raízes finas de cada planta foram cortadas para avaliar a colonização micorrízica. Após, a massa da parte aérea atingir massa constante, foi pesada e em seguida moída e submetida a digestão com peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico seguindo metodologia proposta por Tedesco et al. (1995), para posterior determinação do teor de nitrogênio e fósforo. O teor de nitrogênio da parte aérea das plantas foi avaliado por meio da destilação de N usando o método semi-micro Kjeldahl, de acordo com Sarruge e Haag (1974). O nitrogênio e o fósforo acumulados na parte aérea foram calculados multiplicando-se o teor obtido com a respectiva produção de matéria seca da parte aérea. Para a determinação dos teores de fósforo na parte aérea foi usado espectrofotometria como descrita por Murphy e Riley (1962).

As amostras de raízes cortadas de cada tratamento foram lavadas, descoloridas e posteriormente coradas segundo o método de Phillips e Hayman (1970), modificado por Koske e Gemma (1989). A porcentagem de colonização micorrízica (CM) foi estimada pela presença ou ausência de colonização em segmentos de raízes de 1,0 cm aproximadamente, em lâminas de microscópio contendo 25 segmentos de raízes segundo o método da interseção proposto por Giovannetti e Mosse (1980) modificado por McGonigle et al. (1990) com no mínimo 100 leituras de interseção por lâmina. A leitura das lâminas para a determinação da CM foi realizada em microscópio óptico no aumento de 200x. A densidade de esporos no solo foi obtida após separação de 50 g de solo de cada amostra, em seguida ressuspensas em 1 L de água, e posteriormente submetidas ao método de peneiramento úmido (GERDEMANN e NICOLSON,

1963) seguido por centrifugação em gradiente de sacarose. Após a extração, a quantificação total foi feita em microscópio estereoscópico (16X) (Stemi DV4, Carl Zeiss, Alemanha).

### 5.2.7 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram submetidos às provas de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett. Os dados de colonização micorrízica foram transformados pela função arco-cosseno  $\sqrt{\% \text{colonização micorrízica}/100}$  e, os dados de teor e acúmulo de fósforo de *S. terebinthifolius* foram submetidos a transformação de  $\text{Log}(x+1)$  para cumprir os pressupostos da análise de variância (ANOVA). Posteriormente foi realizada uma ANOVA para cada variável analisada e, posteriormente os dados foram submetidos ao teste de separação de médias Scott Knott a 5% de probabilidade. Para a realização dos testes de normalidade e homogeneidade foi utilizada a extensão do Excel Action Stat, para a ANOVA e para os testes de separação de médias o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011), e os gráficos no Software Sigma Plot (SYSTAT SOFTWARE, 2008).

## 5.3 RESULTADOS

## 5.3.1 Colonização micorrízica e número de esporos de FMA

Não houve contaminação nos tratamentos que não receberam a aplicação do inoculante à base de FMA (*R. intraradices*). Entretanto, nem todos os tratamentos inoculados com o FMA apresentaram estruturas de colonização micorrízica (CM) nas raízes (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de colonização micorrízica e número de esporos encontrados nas raízes de espécies arbóreas inoculadas com o inoculante comercial a base de fungo micorrízico arbuscular *R. intraradices* (F) após 120 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); MIX = F+R+E1+E2; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação.

Espécie vegetal	Tratamento	Colonização micorrízica total	Número de esporos (50 mL)
<i>C. myrianthum</i>	F	5,5% b	173 b
	R+F	3,9% b	60 c
	E1+F	3,3% b	56 c
	E2+F	1,6% b	67 c
	R+E1+F	1,9% b	64 c
	E1+E2+F	6,0% b	12 d
	R+E2+F	3,8% b	108 c
	MIX	7,1% b	92 c
	S/A	38,5% a	422 a
<i>M. scabrella</i>	F	7,0% c	257 b
	R+F	1,9% d	192 b
	R+E1+F	11,6% c	261 b
	E1+E2+F	21,8% b	323 b
	R+E2+F	0,0% d	180 b
	MIX	7,8% c	177 b
	S/A	49,2% a	1061 a
<i>S. terebinthifolius</i>	F	9,7% b	232 b
	R+F	4,5% c	196 b
	E1+F	9,4% b	69 d
	E2+F	5,1% c	63 d
	R+E1+F	8,5% b	29 e
	E1+E2+F	9,5% b	142 c
	R+E2+F	9,1% b	265 b
	MIX	4,5% c	60 d
	S/A	53,2% a	421 a
<i>S. multijuga</i>	F	77,1% a	520 c
	R+F	7,1% d	263 c
	E1+F	4,6% d	385 c
	E2+F	4,9% d	330 c
	R+E1+F	8,4% d	349 c
	E1+E2+F	6,6% d	254 c
	R+E2+F	11,5% c	349 c
	MIX	14,3% c	1033 b
	S/A	49,4% b	1938 a

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Notas: Médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de separação de médias Scott Knott ( $P < 0,05$ ).

Em *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. terebinthifolius* a maior média de CM foi observada nas raízes do tratamento controle S/A cujo solo não foi autoclavado e continha microrganismos autóctones do local de coleta (Tabela 3). Em *C. myrianthum* não houve diferença estatística nos demais tratamentos em relação a CM. Em *M. scabrella* e *S. terebinthifolius* houve diferenças significativas entre os tratamentos, porém a porcentagem média de CM observada nessas espécies foi inferior a 25%. Para *S. multijuga* o tratamento de inoculação contendo apenas o FMA (F) foi a que apresentou a maior média de CM, com 77% de colonização média nas raízes.

O maior número de esporos no solo nas quatro espécies avaliadas foi observado no tratamento S/A (Tabela 3). O segundo maior número de esporos observado em *C. myrianthum* foi no tratamento F, em *M. scabrella* todos os demais tratamentos de inoculação com FMA não diferiram entre si, em *S. terebinthifolius* os tratamentos F, R+F e R+E2+F apresentaram o segundo maior NE e, em *S. multijuga* o tratamento MIX apresentou a segunda maior média de NE e os demais tratamentos de inoculação não diferiram significativamente entre si.

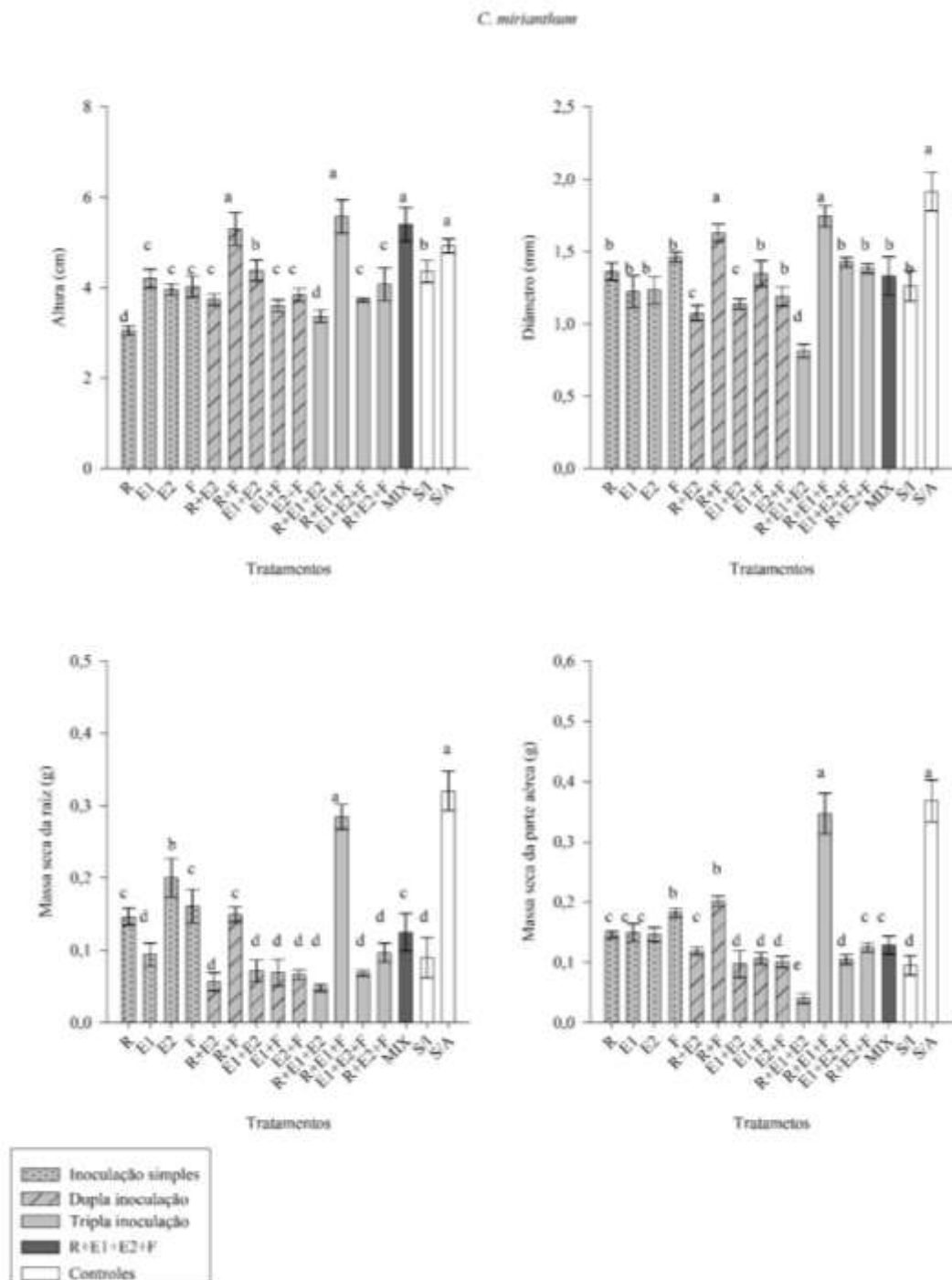
### 5.3.2 Avaliação do crescimento das mudas

Alguns tratamentos nos ensaios em casa de vegetação com *C. myrianthum* (R+E1), *M. scabrella* (R, E2+F, E1+F e R+E2+F), *S. terebinthifolius* (R+E1) e *S. multijuga* (R+E2) foram perdidos durante o experimento, que podem ter ocorrido pela baixa qualidade das sementes observadas na pré-germinação, principalmente em *M. scabrella*, ou devido a uma possível interação negativa entre as combinações de microrganismos.

A coinoculação de MPCV favoreceu o crescimento das espécies arbóreas pioneiras avaliadas no presente estudo em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação, sendo que, de forma geral combinações de tripla inoculação de MPCV foram as que mais influenciaram nos parâmetros de crescimento avaliados.

Em *C. myrianthum*, o tratamento de tripla inoculação R+E1+F e o tratamento contendo microbiota autóctone do solo da área de coleta (S/A) foram os tratamentos que mais influenciaram no crescimento das mudas (Figura 2). Nestes tratamentos foram verificados incrementos médios de 10%, 33%, 313% e de 254% em relação a altura, diâmetro, MSR e MSPA, respectivamente, em comparação com o tratamento controle SI.

Figura 2. Altura (CV=4,34%), diâmetro (CV=13,30%), massa seca da raiz (MSR) (CV=31,49%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=11,88%) das mudas de *C. myrianthum* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).



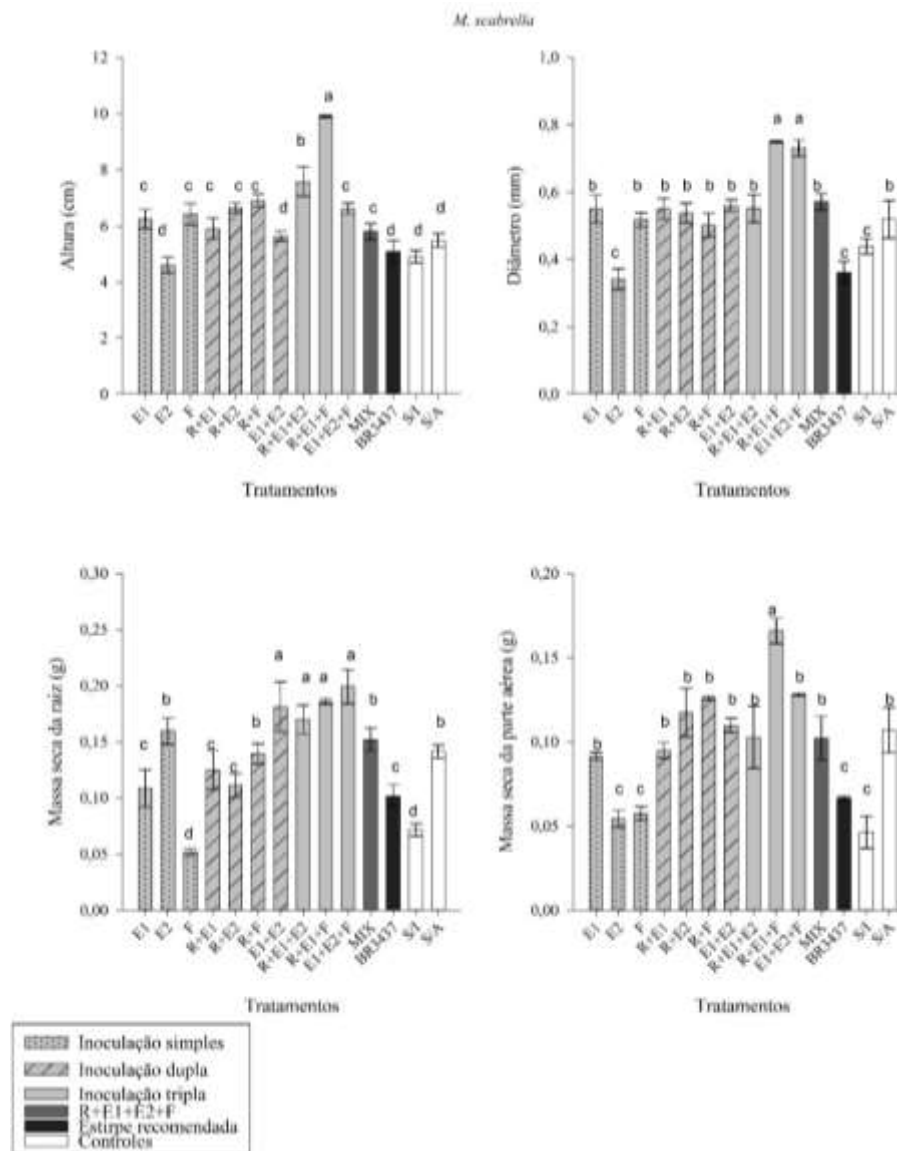
No tratamento de inoculação dupla R+F também foi verificado efeito positivo em relação a altura e ao diâmetro das mudas de *C. myrianthum* quando comparado com as inoculações simples de R e F. Já nos tratamentos de inoculação dupla E1+E2, E1+F e E2+F foram verificados valores menores na MSPA em comparação com as inoculações simples dos microrganismos referentes a cada inoculação dupla. No tratamento de dupla inoculação R+E2 o efeito da combinação foi neutro em relação a MSPA em comparação com as inoculações simples de R e de E2.

Verificou-se efeito positivo da inoculação tripla R+E1+F em comparação com a inoculação simples de R, E1 e F em todos os parâmetros de crescimento avaliados. Já no tratamento de inoculação tripla R+E1+E2, E1+E2+F e R+E2+F foram verificados efeitos negativos em alguns dos parâmetros de crescimento avaliados em comparação com a inoculação simples. Em R+E1+E2 o diâmetro e a MSPA foram menores que a inoculação simples dos microrganismos (R, E1 e F), em E1+E2+F esse efeito foi observado em relação à MSPA e em R+E2+F na MSR. Já quando comparado a inoculação tripla E1+E2+F com as inoculações duplas E1+E2, E1+F e E2+F, verificou-se efeito neutro na MSR e na MSPA.

Os tratamentos de inoculação dupla E1+E2, E1+F, E2+F e o tratamento de tripla inoculação E1+E2+F não diferiram do tratamento controle SI em nenhum dos parâmetros de crescimento avaliados ou apresentaram valores médios inferiores ao controle SI, sendo que os tratamentos E1+F, E2+F e E1+E2+F apresentaram valores 28% menores na altura e o tratamento E1+E2 valores médios 20% menores no diâmetro em comparação com o controle SI. Já o tratamento de inoculação tripla R+E1+E2 apresentou os menores valores para a maioria dos parâmetros de crescimento avaliados, com exceção da MSR a qual não diferiu do controle SI. No tratamento R+E1+E2 foi verificado valores inferiores na altura, diâmetro e MSPA de 32%, 65% e 124% menores em relação ao controle SI, respectivamente.

Nas mudas de *M. scabrella* o tratamento de inoculação de MPCV que mais favoreceu nos parâmetros de crescimento avaliados foi a tripla inoculação R+E1+F (Figura 3), verificando-se incrementos de 90% na altura, 94% no diâmetro, 192% na MSR e de 221% na MSPA em comparação com o tratamento controle SI.

Figura 3. Altura (CV=10,86%), diâmetro (CV=13,10%), massa seca da raiz (MSR) (CV=9,74%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=25,44%) das mudas de *M. scabrella* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A = solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 5$ ).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para *M. scabrella* os tratamentos de coinoculação E1+E2, R+E1+F, R+E1+E2, e E1+E2+F foram os que mais influenciaram na MSR das mudas, com um incremento de 192% em relação ao tratamento SI. Os tratamentos E2, R+F e R+E1+E2+F não diferiram significativamente do controle S/A em relação à MSR e apresentaram um incremento

intermediário de 139% em comparação com o controle SI. De forma geral, foi verificado que com exceção do tratamento de inoculação simples E1, nos tratamentos com inoculação dupla, inoculação tripla e com os quatro microrganismos (MIX), a coinoculação de microrganismos potencializou o crescimento das mudas, principalmente em relação à MSPA, sendo que esse mesmo resultado foi observado no tratamento controle SA. O incremento médio nesses tratamentos foi de 102% na MSPA em relação ao controle SI.

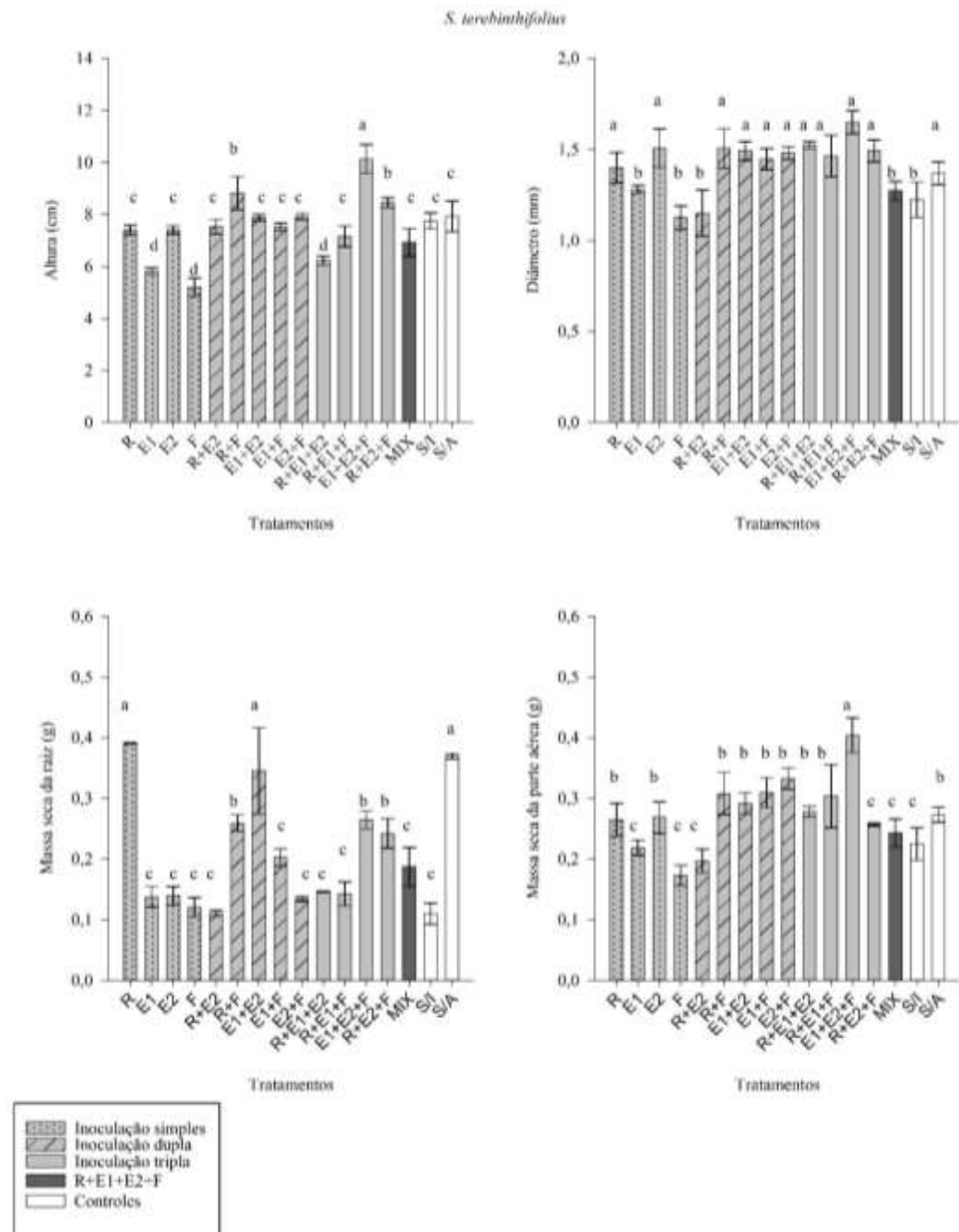
Nas mudas de *M. scabrella* que receberam a inoculação dupla E1+E2 verificou-se efeito positivo na MSR em comparação com as inoculações simples de E1 e E2. Nos demais tratamentos não foi possível fazer essa comparação devido a perda do tratamento R.

Na inoculação tripla R+E1+E2 o efeito da coinoculação foi neutro em relação ao diâmetro e a MSPA das mudas em comparação com as inoculações duplas R+E1, E+E2 e E1+E2. Já no tratamento E1+E2+F verificou-se efeito sinérgico no diâmetro e na MSR em comparação com as inoculações simples de E1, E2 e F.

As mudas de *M. scabrella* inoculadas com o tratamento de inoculação simples E2 e com o tratamento correspondente a estirpe recomendada para essa espécie arbórea, BR3437, só diferiram em relação ao controle SI na MSR, já nos demais parâmetros de crescimento avaliados não diferiram do controle SI. Na MSR das mudas inoculadas com a estirpe E2 verificou-se um incremento de 139% em comparação com SI.

Nas mudas de *S. terebinthifolius*, de forma geral, o tratamento de inoculação tripla E1+E2+F foi o que mais favoreceu nos parâmetros de crescimento avaliados (Figura 4). Neste tratamento verificou-se um incremento de 35% na altura, 22% no diâmetro, 80% na MSR e de 93% em comparação com o controle SI, sendo que só não esteve presente entre as maiores médias em relação a MSR. A MSR das mudas de *S. terebinthifolius* foram mais favorecidas pelos tratamentos R e E1+E2 que não diferiram estatisticamente do controle S/A e tiveram um incremento de 160% em relação a SI.

Figura 4. Altura (CV=9,77%), diâmetro (CV=12,62%), massa seca da raiz (MSR) (CV=25,72%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=21,45%) das mudas de *S. terebinthifolius* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizopagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A = solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão



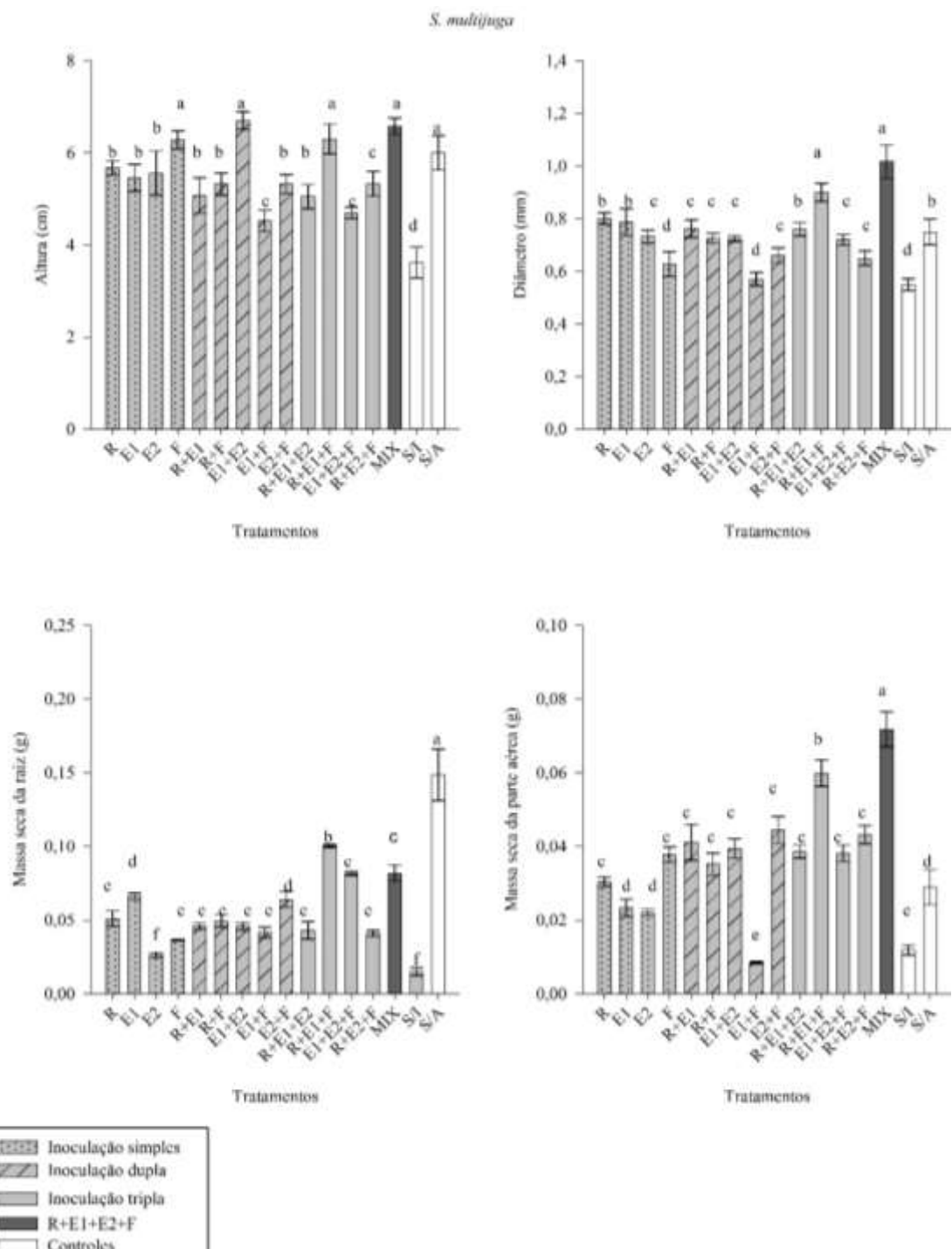
No tratamento de inoculação dupla E1+F também foram verificados efeitos sinérgicos entre os microrganismos nos parâmetros altura, diâmetro e MSPA das mudas de *S. terebinthifolius* em comparação com a inoculação simples de E1 e F, só não houve diferença significativa na MSR entre a inoculação dupla e as inoculações simples. Ainda nos tratamentos R+F e E1+E2 foi verificado efeito sinérgico entre as estirpes, sendo que em R+F esse efeito foi observado apenas na altura e em E1+E2 apenas na MSR. Por outro lado, no tratamento de inoculação dupla R+E2 verificou-se efeito negativo no diâmetro e na MSPA em comparação com as inoculações simples (R e E2). Já no tratamento E2+F foi verificado efeito neutro na MSR em comparação com a inoculação simples dos microrganismos.

No tratamento de tripla inoculação E1+E2+F apresentou efeito sinérgico em comparação com as inoculações duplas E1+E2, E1+F e E2+F na altura e na MSPA. O mesmo tratamento comparado com todas as inoculações simples desses microrganismos (E1, E2 e F) foi maior na altura, MSR e na MSPA, só não diferiu na MSR em relação ao tratamento E2. Já no tratamento de inoculação tripla R+E2+F verificou-se efeito positivo apenas em comparação com as inoculações simples (R, E2 e F) na altura das mudas. Nas demais combinações de tripla inoculação não foi possível observar efeito positivo ou negativo comparando com as inoculações duplas e/ou simples.

Os tratamentos de coinoculação R+E2 e o tratamento MIX contendo todos os microrganismos não diferiram do controle SI em todos os parâmetros de crescimento avaliados, ou seja, essas combinações não favoreceram o crescimento das mudas de *S. terebinthifolius* nas condições avaliadas. Já os tratamentos de inoculação simples E1 e F não diferiram do tratamento controle SI no diâmetro, MSR e MSPA e, foi verificado valores médios 35% menores na altura em em comparação com o tratamento SI.

Em *S. multijuga* os tratamentos de inoculação de MPCV que mais favoreceram no crescimento das mudas nos parâmetros avaliados foram a inoculação tripla R+E1+F e o MIX com os quatro microrganismos coinoculados (Figura 5). Em relação à altura e ao diâmetro, os tratamentos R+E1+F e MIX não diferiram significativamente entre si, sendo esses incrementos médios de 66 e 64%, respectivamente, em comparação com SI. No tratamento de inoculação tripla R+E1+F foram verificados incrementos de 426% na MSR e de 445% na MSPA em comparação com o tratamento controle SI e, no tratamento MIX incrementos de 326% e de 555% na MSR e MSPA, respectivamente, em relação ao controle SI.

Figura 5. Altura (CV=11,61%), diâmetro (CV=10,92%), massa seca da raiz (MSR) (CV=22,10%) e massa seca da parte aérea (MSPA) (CV=21,99%) das mudas de *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

No tratamento de coinoculação E1+E2 é possível observar que houve efeito sinérgico na altura e na MSPA das mudas de *S. multijuga* em comparação com a inoculação simples de cada uma das estirpes (E1 e E2), isso também foi observado na coinoculação de E2+F em relação a MSR. Por outro lado, na coinoculação de E1+F foram verificados valores menores na altura e na MSPA em comparação com a inoculação simples desses microrganismos (E1 e F) e, no tratamento de coinoculação R+E1 foram verificados valores menores no diâmetro em relação a inoculação de cada microrganismo individualmente. Já no tratamento de coinoculação R+F foi verificado efeito neutro na MSR e na MSPA em comparação com a inoculação simples.

Nas mudas que receberam a inoculação tripla R+E1+F foi verificado efeito sinérgico dessa combinação em comparação com as duplas inoculações R+E1, R+F e E1+F em todos os parâmetros de crescimento avaliados neste trabalho e, em comparação com as inoculações simples R, E1 e F houve efeito positivo no diâmetro, MSR e na MSPA. No tratamento de inoculação tripla E1+E2+F foram verificados valores maiores na MSR em comparação com as combinações de inoculação dupla (E1+E2, E1+F e E2+F) e comparado as inoculações simples (E1, E2 e F). No tratamento de inoculação tripla R+E2+F verificou-se efeitos negativos na combinação quando comparados com a inoculação simples desses microrganismos. Já no tratamento de inoculação tripla R+E1+E2 não houve efeito na altura das mudas quando comparado com a inoculação simples de cada microrganismo.

O tratamento S/A apresentou incrementos positivos na altura e na MSR. Esse tratamento apresentou a maior média em relação a MSR, já na altura das mudas de *S. multijuga* os tratamentos de inoculação e coinoculação F, E1+E2, R+E1+F e MIX não diferiram do tratamento controle S/A e tiveram um incremento médio de 66% em relação ao tratamento controle SI.

### 5.3.3 Absorção de N e P pelas mudas

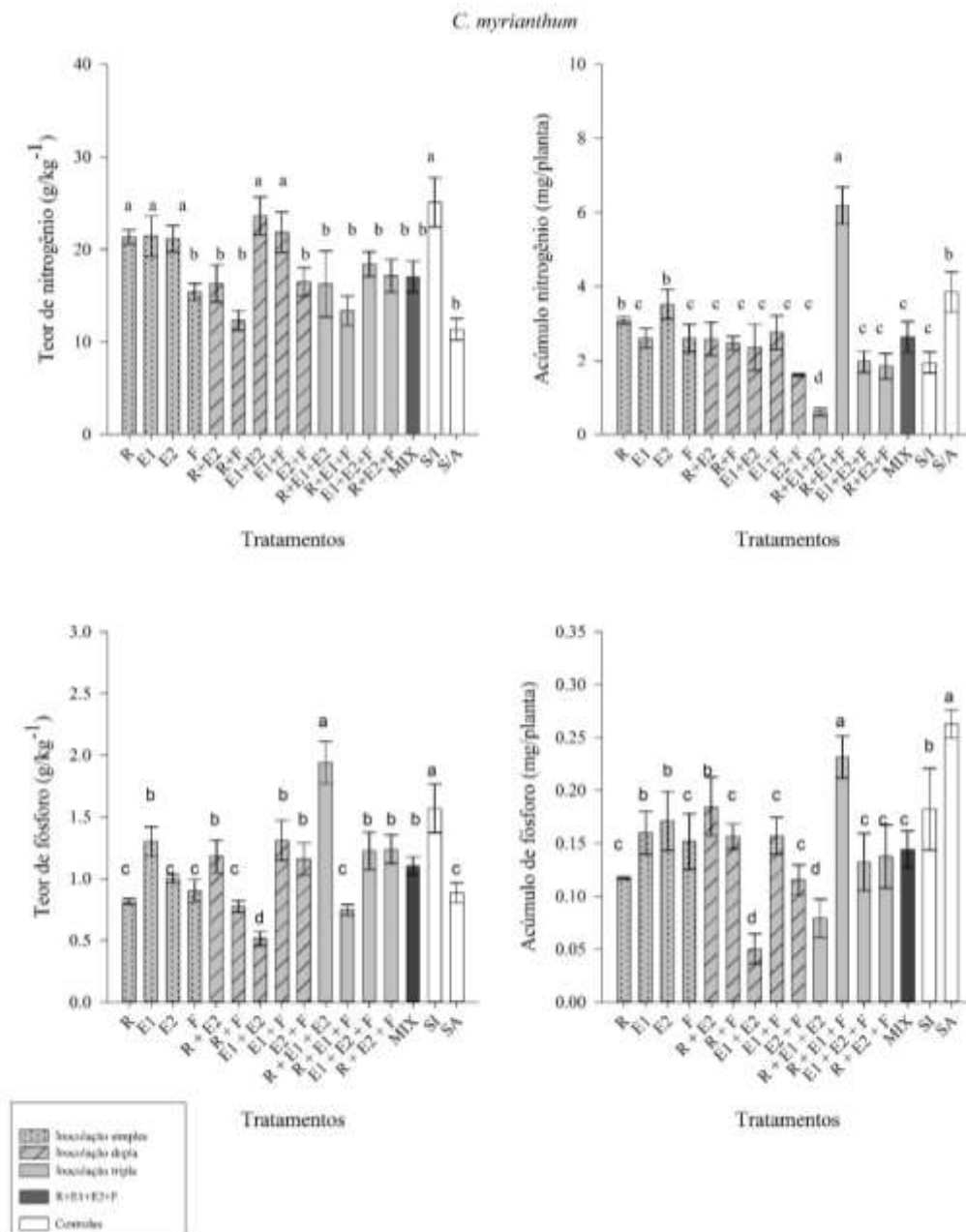
Nas mudas das espécies arbóreas avaliadas foi possível observar que os tratamentos que mais influenciaram no crescimento das mudas de *C. myrianthum* e de *S. multijuga* estão entre as maiores médias verificadas para o acúmulo de nitrogênio (AN). Já em *M. scabrella* não houve uma relação entre o tratamento que promoveu o maior crescimento das mudas com o AN e nem com o acúmulo de fósforo (AP) e, em *S. terebinthifolius* não houve diferença significativa entre o tratamento controle SI e as maiores médias de inoculação e coinoculação verificados

neste trabalho para o AN. O maior acúmulo de P nas mudas de *C. myrianthum*, *M. scabrella*, *S. terebinthifolius* e *S. multijuga* foi observado em tratamentos contendo a inoculação do FMA, sendo que para as espécies arbóreas *C. myrianthum* e *S. terebinthifolius* as maiores médias no AP foram verificadas nos tratamentos que mais influenciaram nos parâmetros de crescimento avaliados.

Em *C. myrianthum* o melhor resultado médio em relação ao TN foi observado nos tratamentos de inoculação simples (R, E1 e E2), e nos tratamentos de inoculação dupla (E1+E2 e F+E1), no entanto esses tratamentos não diferiram estatisticamente do controle SI. O tratamento que mais se destacou em relação ao AN em *C. myrianthum* foi a tripla inoculação R+E1+F com um incremento de 219% em comparação com SI. Os tratamentos de inoculação simples R e E2 não diferiram do tratamento controle S/A e apresentaram um incremento de 79% em comparação com o controle SI. Todos os demais tratamentos de inoculação com exceção de R+E1+E2, não diferiram do tratamento controle SI. O tratamento de tripla inoculação R+E1+E2 apresentou os menores valores em relação ao AN, com 220% de decremento em relação ao controle SI.



Figura 6. Nutrição das mudas de *C. myrianthum* (teor de nitrogênio (CV=23,41%) e fósforo (CV=15,63%) e acúmulo de nitrogênio (CV=20,00%) e fósforo (CV=31,45%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

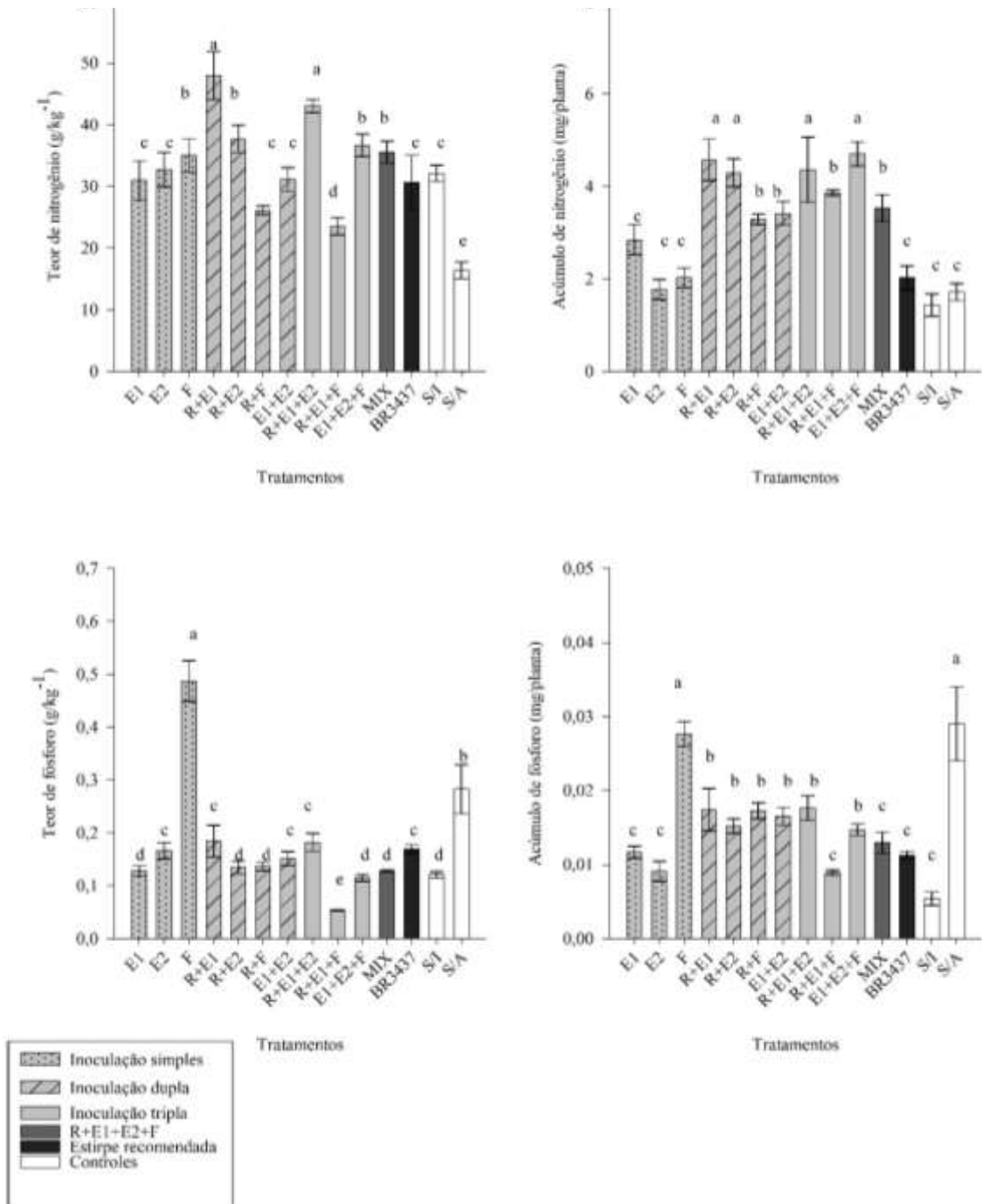
No AN verificou-se que a inoculação dupla R+E2 apresentou efeito negativo quando comparada com a inoculação simples das estirpes R e E2. Já a inoculação dupla E1+F apresentou efeito neutro em comparação com a inoculação simples de E1 e F. Na inoculação tripla R+E1+F foi verificado efeito sinérgico das estirpes quando coinoculadas em relação ao AN quando comparadas a inoculação simples. Por outro lado, na inoculação tripla R+E1+E2 foi verificado efeito negativo quando as estirpes são coinoculadas em comparação com a inoculação simples. Já nos tratamentos de inoculação tripla E1+E2+F e R+E2+F foi verificado efeito neutro no AN em comparação com as combinações de inoculações duplas respectivas.

Em relação ao TP, as mudas de *C. myrianthum* inoculadas com o tratamento de tripla inoculação R+E1+E2 apresentaram os maiores valores para esse parâmetro e, não diferiram significativamente do tratamento controle SI (Figura 6). Os menores valores para o TP foram verificados nas mudas inoculadas com o tratamento de dupla inoculação E1+E2, com decrementos de 243% em comparação com o controle SI. Já em relação ao AP, nas mudas inoculadas com o tratamento de tripla inoculação R+E1+F e no controle SA verificou-se os maiores valores para essa variável, com incrementos de 41% em comparação com o controle SI. Os tratamentos de inoculação simples E1 e E2 e, o tratamento de dupla inoculação R+E2 não diferiram do controle SI. Os menores valores para AP foram verificados nos tratamentos de inoculação E1+E2 e R+E1+E2, com decrementos de 172% em comparação com o tratamento controles SI.

No tratamento de inoculação dupla R+F verificou-se efeito neutro no AP quando comparado a inoculação simples desses microrganismos e, efeito negativo no tratamento de inoculação dupla E1+E2. No tratamento de tripla inoculação R+E1+F verificou-se efeito positivo dessa combinação de microrganismos no AP em comparação com a inoculação simples de R, E1 e E2. Já em R+E1+E2 o efeito foi negativo no AP.

Em *M. scabrella* os tratamentos de dupla inoculação (R+E1 e R+E2) e de tripla inoculação (R+E1+E2 e E1+E2+F) foram os tratamentos que mais favoreceram na absorção de N, e o tratamento F na absorção de fósforo (Figura 7).

Figura 7. Nutrição das mudas de *M. scabrella* (teor de nitrogênio (CV=16,24%) e fósforo (CV=11,07%) e acúmulo de nitrogênio (CV=27,33%) e fósforo (CV=18,93%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 5$ ).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As mudas de *M. scabrella* inoculadas com o tratamento R+E1 e o tratamento R+E1+E2 apresentaram um incremento no TN de 49% em relação ao tratamento SI. Os tratamentos F, R+E2, R+E2+F, E1+E2+F e o tratamento MIX tiveram um incremento menor no TN de 20% em relação a SI. Os tratamentos E1, E2, R+F e E1+E2 não diferiram do tratamento controle SI e da estirpe recomendada BR3437 e, o tratamento controle SA apresentou a menor média em relação ao TN. Em relação ao AN na parte aérea das mudas de *M. scabrella* os tratamentos R+E1, R+E2, R+E1+E2 e E1+E2+F tiveram um incremento de 127% em relação ao tratamento controle SI. Nos tratamentos R+F, E1+E2, R+E1+F e MIX verificou-se um incremento intermediário no AN de 79% em relação ao tratamento controle SI. Já os tratamentos com inoculação simples (E1, E2 e F) não diferiram estatisticamente dos controles SI e S/A e da estirpe recomendada para a espécie (BR3437).

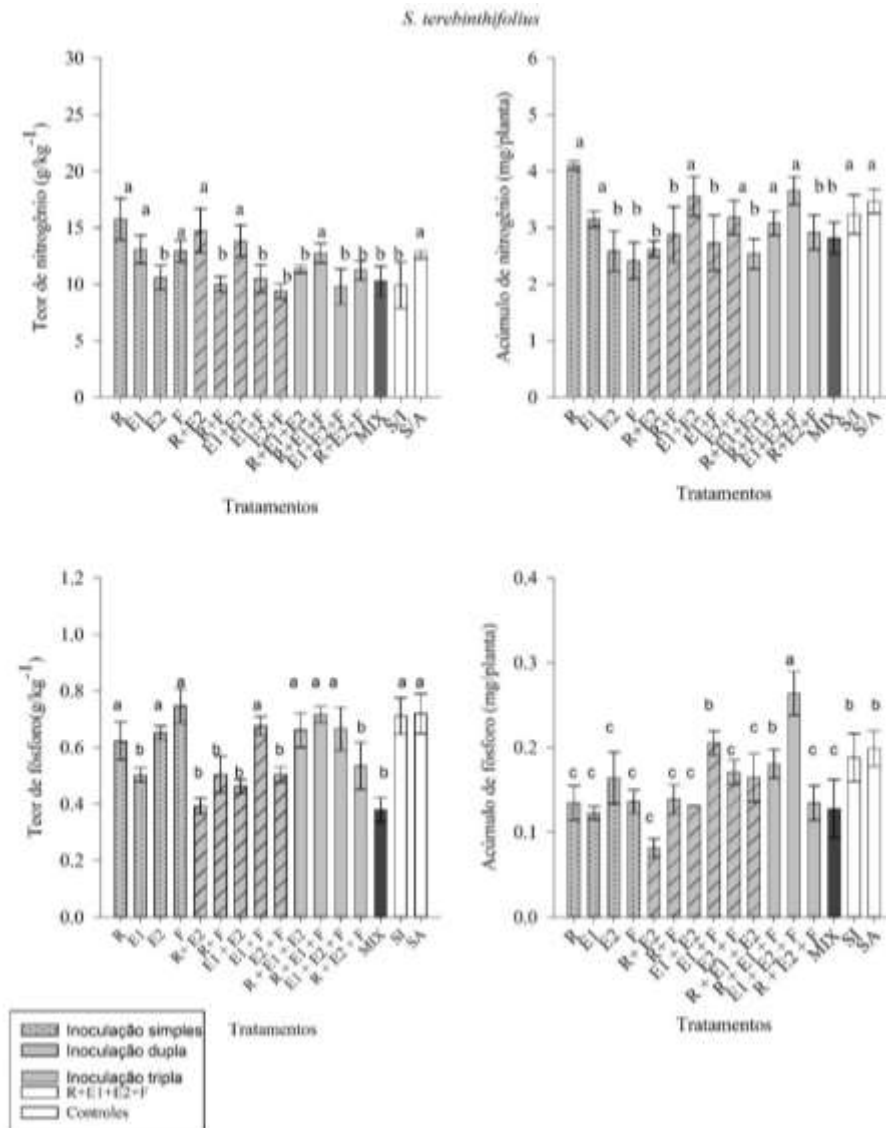
De forma geral, em *M. scabrella* verificou-se que as mudas inoculadas com dupla, tripla ou inoculadas com o tratamento contendo os quatro microrganismos (MIX) apresentaram maior AN em comparação com a inoculação simples.

Nas mudas de *M. scabrella* a melhor média para o TP foi verificada no tratamento de inoculação simples F, com incremento de 283% em comparação com SI. O tratamento S/A apresentou a segunda melhor média, seguido pelos tratamentos E2, R+E1, E1+E2 e R+E1+E2 que não diferiram estatisticamente da estirpe recomendada BR3437 e apresentaram um incremento de 34% comparado a SI. Os tratamentos E1, R+E2, R+F, E1+E2+F e MIX não diferiram do controle SI, e por último com a menor média de TP ficou o tratamento R+E1+F. O AP em *M. scabrella* foi maior nos tratamentos F e S/A que não diferiram significativamente, com ganhos de 180% em comparação com o controle SI. Os tratamentos R+E1, R+E2, R+F, E1+E2, R+E1+E2 e E1+E2+F não diferiram entre si e apresentaram um incremento médio intermediário de 63% em comparação com o controle SI. Os demais tratamentos de inoculação e o tratamento com a estirpe recomendada não diferiram do controle SI.

Cabe destacar que no tratamento de inoculação dupla E1+E2 verificou-se efeito positivo da coinoculação no AN e no AP comparativamente a inoculação simples de E1 e E2. Na tripla inoculação E1+E2+F também foi possível verificar efeito positivo da coinoculação desses microrganismos no AN em relação a inoculação simples.

Em *S. terebinthifolius* os tratamentos que apresentaram as maiores médias em relação ao TN foram os tratamentos de inoculação simples (R, E1 e F), de inoculação dupla (R+E2 e E1+E2) e o tratamento de inoculação tripla R+E1+F que não diferiram do tratamento controle S/A e tiveram um incremento de 51% em comparação com o tratamento controle SI (Figura 8).

Figura 8. Nutrição das mudas de *S. terebinthifolius* (teor de nitrogênio (CV=9,72%) e fósforo (CV=20,89%) e acúmulo de nitrogênio (CV=24,05%) e fósforo (CV=31,05%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 5).



Fonte:

Elaborada pela autora (2021).

Os demais tratamentos de inoculação não diferiram estatisticamente do controle SI em relação ao TN em *S. terebinthifolius*. No AN em *S. terebinthifolius* as maiores médias foram verificadas nos tratamentos de inoculação simples (R e E1), inoculação dupla (E1+E2 e E2+F) e de inoculação tripla (R+E1+F e E1+E2+F) que não diferiram dos controles SI e S/A. Os demais tratamentos de inoculação apresentaram médias inferiores no AN comparados aos tratamentos controles.

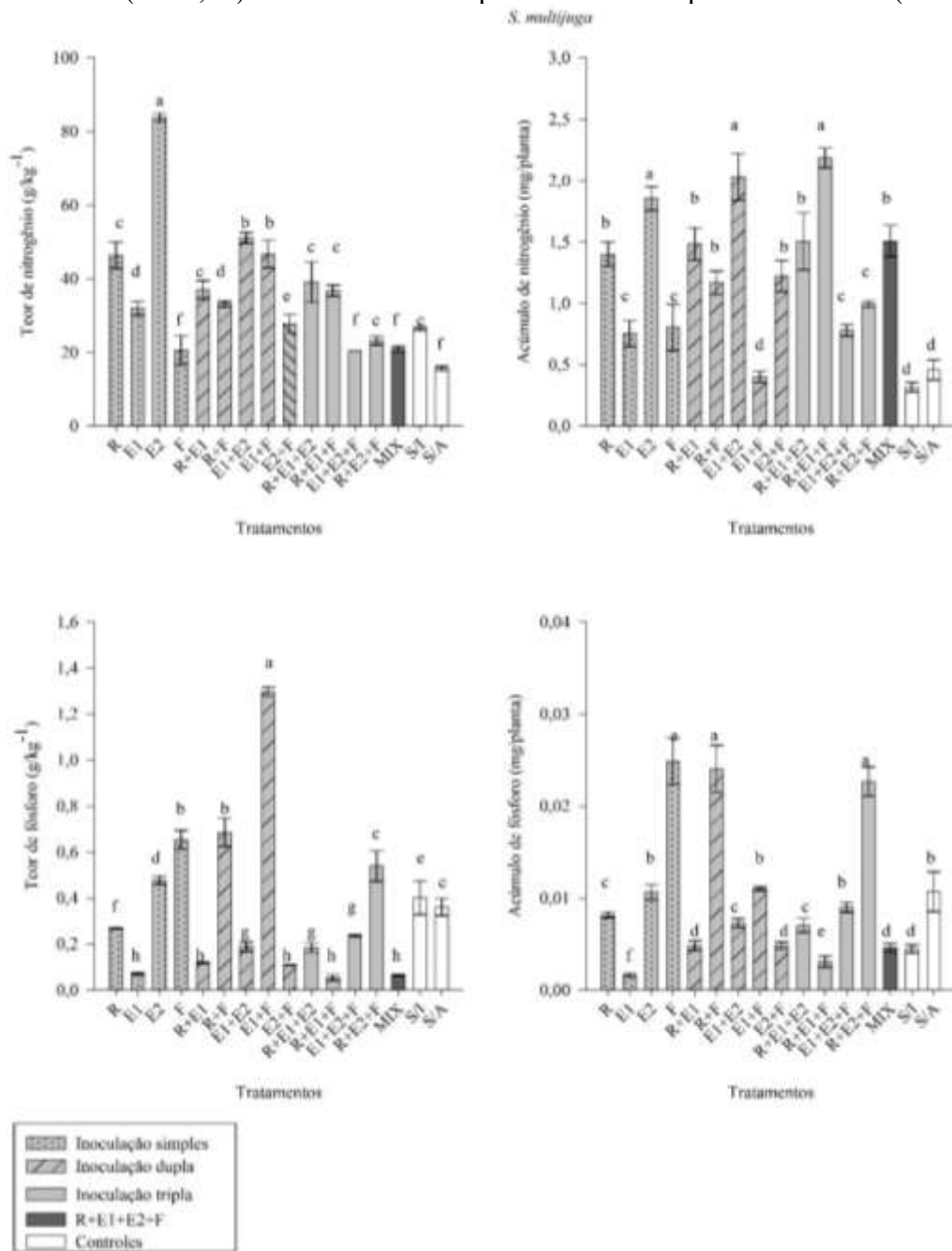
O TP nas mudas de *S. terebinthifolius* nos tratamentos de inoculação simples (R, E2 e F), no tratamento de inoculação dupla (E1+F), nos tratamentos de tripla inoculação (R+E1+E2, R+E1+F e E1+E2+F) não diferiram significativamente entre si e em relação aos controles SI e SA (Figura 8). Nos demais tratamentos de inoculação verificou-se um decréscimo no TP de 53% em comparação com o controle SI. Por outro lado, a maior média no AP nas foi verificado nas mudas inoculadas com o tratamento de tripla inoculação E1+E2+F, com incremento de 37% em comparação com os tratamentos controles SI e SA. Já nos tratamentos de inoculação simples (R, E1, E2 e F), nos tratamentos de inoculação dupla (R+E2, R+F e E1+E2), no tratamento de tripla inoculação R+E2+F e no MIX foram verificados os menores valores para AP, com decréscimos de 49% em comparação com o tratamento controle SI.

No AP foi verificado efeito positivo nas inoculações triplas R+E1+F e E1+E2+F em comparação com a inoculação simples desses microrganismos e, no tratamento E1+E2+F também foi observado esse mesmo efeito positivo comparado as combinações de dupla inoculação E1+E2, E1+F e E2+F (Figura 8). Cabe salientar que em todas as demais inoculações duplas, triplas e no tratamento MIX, verificou-se efeito de neutralidade no AP quando comparado com as respectivas inoculações simples e duplas.

Já em *S. multijuga*, o tratamento com a inoculação do isolado E2 foi o que apresentou a maior média de TN, com um incremento de 224% em relação ao controle SI (Figura 9). Nos tratamentos E1+E2 e E1+F o incremento foi de 89% em relação ao controle SI e, seguido pelos tratamentos R, R+E1+E2 e R+E1+F com 52% de incremento e E1 e R+F com 27% de incremento em comparação com o controle SI. Já os tratamentos E2+F e R+E2+F não diferiram significativamente do controle SI, e os tratamentos F, E1+E2+F e MIX não diferiram do tratamento controle S/A em relação ao TN. Os tratamentos que mais influenciaram no AN em *S. multijuga* foram os tratamentos E2, E1+E2 e R+E1+F que tiveram um incremento de 414% em relação a SI. Os tratamentos R, R+F, E2+F, R+E1+E2 e MIX também apresentaram um incremento alto no AN em relação a SI de 248%. Os tratamentos E1, F, R+E2+F e E1+E2+F

tiveram um incremento menor em relação aos tratamentos controles de 112%, e o tratamento E1+F não diferiu estatisticamente de S/A e SI.

Figura 9. Nutrição das mudas de *S. multijuga* (teor de nitrogênio (CV=16,39%) e fósforo (CV=21,22%) e acúmulo de nitrogênio (CV=22,85%) e fósforo (CV=12,29%)) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em casa de vegetação em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação. R = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.); E1 = SC5 (*Pseudomonas* sp.); E2 = MSR2 (*Pantoea* sp.); F = inoculante comercial Rotella BR (*Rhizophagus intraradices*); MIX = F+R+E1+E2; S/I = solo autoclavado e sem inoculação de MPCV; S/A= solo sem autoclavar e sem inoculação de MPCV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 5$ ).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

No tratamento de inoculação dupla E1+F verificou-se que houve efeito negativo na coinoculação em relação ao AN quando comparado as inoculações simples de E1 e de F (Figura 9). Por outro lado, no tratamento de tripla inoculação R+E1+F verificou-se efeitos positivos no AN comparado tanto as inoculações simples de cada microrganismo, como em relação as diferentes combinações duplas entre os microrganismos R, E1 e F.

Em *S. multijuga* a média mais alta em relação ao TP foi observada no tratamento de dupla inoculação E1+F com incremento 241%, seguido por R+F e F com 76%, R+E2+F com 42% e E2 com 26% de incremento em comparação com SI (Figura 9). Os demais tratamentos de inoculação apresentaram médias de TP menores que os tratamentos controles. Os tratamentos controles SI e SA não diferiram significativamente em relação ao TP. Em relação ao AP, os tratamentos F, R+F e R+E2+F tiveram a maior média em relação a esse parâmetro com 441% de incremento em comparação com SI. Os tratamentos E2, E1+F, E1+E2+F não diferiram do controle S/A e tiveram um incremento médio de 128% em comparação com SI, seguido pelos tratamentos R, E1+E2, R+E1+E2 com 75% de incremento. Já os tratamentos E2+F, R+E1 e MIX não diferiram do controle SI, e os tratamentos E1 e R+E1+F tiveram um desempenho no acúmulo de N inferior ao controle SI.

No tratamento de inoculação dupla E2+F verificou-se efeito negativo no AP comparado a inoculação simples dos microrganismos E2 e F (Figura 9). Efeito negativo também foi observado no tratamento de tripla inoculação R+E1+F em relação ao AP quando comparado com as inoculações duplas dos microrganismos R, E1, e F.



## 5.4 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que a coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies vegetais pode facilitar o crescimento, a adaptação e a sobrevivência das mudas em condições de grande estresse ambiental. Em espécies arbóreas ainda são poucos os estudos de coinoculação de MPCV, sendo que a maior parte se destina a investigar espécies arbóreas com interesse comercial. Os microrganismos promotores do crescimento vegetal, como os FMA e as bactérias promotoras do crescimento vegetal, podem atuar por meio de mecanismos diretos ou indiretos na promoção do crescimento vegetal (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; SIKES; COTTENIE; KLIRONOMOS, 2009; BALOTA; MACHINESKI; STENZEL, 2011; ABHILASH et al., 2016; BAKHSHANDEH et al., 2020). Na coinoculação de MPCV pode ocorrer efeito sinérgico (SUBRAMANIAN et al., 2015; MOREL et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016), potencializando o crescimento das mudas, embora efeitos de antagonismo ou neutro também foram descritos (AFKHAMI et al., 2020; LOERA-MURO et al., 2021). Por isso se faz necessário avaliar as diferentes combinações de coinoculação de microrganismos a fim de selecionar a combinação que melhor atue sinergeticamente promovendo o crescimento vegetal.

Na caracterização química do solo empregado no presente estudo verificou-se um pH muito baixo, fósforo baixo e potássio, cálcio e magnésio altos. No presente trabalho foi observado que de forma geral a CM nas raízes das espécies arbóreas avaliadas foi baixa (entre 0 e 22%), especialmente em *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. terebinthifolius* em todos os tratamentos que receberam o inoculante a base de FMA, com exceção do tratamento F em *S. multijuga* que apresentou CM de 77%. A colonização micorrízica é influenciada por diversos fatores externos, principalmente pela disponibilidade de P, sendo os efeitos deste nutriente sobre a colonização diferenciada para cada hospedeiro (HABTE; MANJUNATH, 1991). Estudos têm demonstrado maior responsividade dos FMA em condições de baixa disponibilidade de fósforo (OLIVEIRA, ALIXANDRE, 2013; TEIXEIRA-RIOS; DE OLIVEIRA; YANO-MELO, 2016). No entanto, alguns trabalhos descreveram que o fornecimento de fósforo em dosagens maiores pode favorecer ainda mais o crescimento da planta e a colonização micorrízica e, é variável entre as espécies (MELLO; DA SILVA; JUNIOR, 2012; BRITO et al., 2017).

Diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho, Zangaro et al. (2003) observaram nas espécies pioneiras avaliadas, dentre elas *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S.*

*terebinthifolius*, que houve grande taxa de colonização radicular e as mudas foram fortemente influenciadas pela inoculação de FMA, embora as condições de solo utilizadas por esses autores foram distintas das empregadas no presente estudo. Os autores atribuíram os resultados encontrados de CM nas mudas de espécies pioneiras à baixa reserva nutricional das sementes e, que levaram rapidamente as plantas a se associarem aos FMA para captação maior e mais rápida de nutrientes no solo, uma vez que as pioneiras apresentam uma taxa de crescimento muito maior quando comparadas a espécies de estágios sucessionais posteriores. Corroborando com os resultados encontrados por Zangaro et al (2003), Pasqualini, Uhlmann e Stürmer (2007) também verificaram altas taxas de colonização micorrízica em *C. myrianthum* e *S. terebinthifolius*, variando de 34 a 62% quando inoculadas com comunidades de FMA. Santos, Siqueira e Moreira (2008) avaliaram em casa de vegetação quatro espécies arbóreas inoculadas com diferentes isolados de FMA e obtiveram altas taxas de CM com praticamente todas as combinações de isolados fúngicos, sendo que a eficiência foi maior nas mudas que receberam mais de um FMA.

Embora a CM nas espécies avaliadas tenha sido baixa, de alguma forma a inoculação de FMA pode ter contribuído para o crescimento das plantas avaliadas neste trabalho, uma vez que, as combinações de MPCV que mais favoreceram o desenvolvimento dessas mudas continham o tratamento de inoculação com FMA. Os FMA possuem a capacidade de aumentar a absorção de nutrientes como o P por meio do desenvolvimento de uma grande quantidade de hifas extrarradiculares. Melloni, Siqueira e Moreira (2003) encontraram 47 mg por g de solo de micélio total em área de mineração de bauxita em processo de reabilitação com presença de bracinga. O micélio extrarradicular do FMA pode explorar um volume muito maior de solo, cerca de 820 vezes maior que as raízes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Segundo Balota, Machineski e Stenzel (2011), a colonização radicular não expressa diretamente o benefício micorrízico à planta, pois não reflete a capacidade de produção de micélio extrarradicular.

Em espécies de *Acacia* spp. australianas foi demonstrado que a coinoculação de *Pseudomonas monteilli* com *R. intraradices* aumentou a colonização micorrízica nas espécies testadas em condições estéreis (DUPONNOIS; PLENCHETTE, 2003). Outro estudo envolvendo uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* e uma estirpe de *Burkholderia cepacia* inoculadas em conjunto com o FMA *R. intraradices*, também apresentou incrementos significativos no comprimento das hifas e na germinação dos esporos, do que na ausência da bactéria (SUNDRAM et al., 2011). Costa e Melloni (2019) verificaram em mudas de *Olea europaea* coinoculadas com *Paenibacillus* sp. e *Gigaspora rosea* aumentaram o

desenvolvimento do micélio extrarradicular. Estes estudos vão ao encontro com o presente estudo já que foi verificado que em *M. scabrella* a segunda maior média de CM foi no tratamento de tripla inoculação E1+E2+F, ou seja, uma estirpe de *Pseudomonas* sp, uma estirpe de *Pantoea* sp. e o inoculante a base de FMA (*R. intraradices*).

O tratamento com solo sem autoclavar e sem inoculação (S/A) em três das espécies avaliadas (*C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. terebinthifolius*) foi o que apresentou a maior CM, demonstrando a presença de comunidade autóctone de FMA no solo utilizado e com potencial fonte de inóculo. Silva (2018) verificou elevada colonização micorrízica em mudas de *M. caesalpiniifolia* empregando *topsoil* de remanescente de vegetação adjacente às jazidas de exploração de piçarra. Em estudo realizado por Ferreira et al. (2020) verificou-se que a CM no simbionte vegetal foi maior com o aumento da diversidade microbiana no solo, principalmente durante o período inicial do desenvolvimento das plantas.

Em condições controladas de casa de vegetação e solo com baixos teores de nutrientes provenientes de uma área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação, a coinoculação de MPCV favoreceu o crescimento das mudas, e foi melhor do que a inoculação de apenas um microrganismo em quase todos os parâmetros de crescimento analisados para todas as espécies arbóreas pioneiras avaliadas nesse estudo. Em *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. multijuga* a tripla inoculação com *Rhizobium* sp. + *Pseudomonas* sp. + inoculante a base de FMA *Rhizophagus intraradices* (R+E1+F) foi o tratamento que mais promoveu o crescimento dessas espécies, com exceção de *S. multijuga* que também foi favorecida pela coinoculação dos quatro microrganismos (MIX). Dessa forma, possivelmente houve efeito sinérgico entre esses três microrganismos promovendo o crescimento dessas espécies.

Os FMA podem aumentar a área de exploração das raízes por meio do micélio extrarradicular, favorecendo na absorção de fósforo e outros nutrientes no solo (BALOTA; MACHINESKI; STENZEL, 2011), melhoram a absorção de água (GOVINDARAJULU et al., 2005; SYLVIA; WILLIAMS, 1992), e podem proporcionar a planta maior resistência às condições de estresse (REINHARDT, 2007; POSTA; DUC, 2019). Embora a estirpe de *Rhizobium* sp. (UFSC-B8) utilizada nesse trabalho não tenha favorecido a formação de nódulos nas raízes de *M. scabrella*, *S. multijuga* não possui a capacidade de formar nódulos em associação com rizóbios e que *C. myrianthum* não é uma espécie de leguminosa, a estirpe demonstrou ter desempenhado um papel importante na promoção do crescimento dessas espécies. Em estudo realizado por Hernández et al. (2017), os autores verificaram *in vitro* a capacidade da estirpe UFSC-B8 em produzir ácido indol acético e em solubilizar fosfato, sendo

possível que a promoção do crescimento nessas espécies tenha ocorrido por meio de algum desses mecanismos, no entanto esses mecanismos não foram avaliados no presente trabalho. Já em relação a estirpe de *Pseudomonas* sp. (SC5), Nascimento (2018) verificou também em condições *in vitro* a capacidade da bactéria em produzir ACC deaminase, ácido indol acético e capacidade de solubilizar fosfato. No presente estudo foi possível observar que em *C. myrianthum* o tratamento R+E1+F também apresentou a maior média no acúmulo de N e P e, em *S. multijuga* no AN, podendo nesses casos a promoção do crescimento vegetal estar associados com mecanismos de solubilização de fosfato em *C. myrianthum* e na absorção de N em *C. myrianthum* e *S. multijuga*.

Não há relatos ou são escassos na literatura estudos que avaliaram a coinoculação de MPCV em *C. myrianthum* em condições controladas e em solo estéril. Trabalho sobre inoculação apenas de FMA em *C. myrianthum* em condições controladas foi realizado por Pasqualini, Uhlmann e Stürmer (2007). Estes autores conduziram experimento com solo autoclavado com diferentes espécies arbóreas pioneiras, incluindo *C. myrianthum* e *S. terebinthifolius*, avaliaram a inoculação de comunidades de FMA nessas espécies, e observaram incrementos significativos nos parâmetros de crescimento avaliados em comparação com o controle sem inoculação.

Trabalhos avaliando a coinoculação de rizóbios com FMA em leguminosas arbóreas são mais comuns na literatura, uma vez que, as leguminosas podem estabelecer simbiose com rizóbios envolvidos na fixação biológica de nitrogênio (MARQUES; PAGANO; SCOTTI, 2001; VALDENEGRO; BAREA; AZCÓN, 2001; SCHIAVO; MARTINS, 2003; PATREZE; CORDEIRO, 2004; LAMMEL et al., 2015; CELY et al., 2016; KARTHIKEYAN; ARUNPRASAD, 2019). Corroborando com os resultados mais expressivos encontrados no presente estudo para *M. scabrella*, Lammel et al. (2015) verificaram que a coinoculação do FMA *Acaulospora koskei* com um mix de duas estirpes de *Burkholderia* sp. foi muito mais eficiente no crescimento das mudas de *M. scabrella* do que a inoculação simples de rizóbio. Os autores sugerem que seja feita inoculação dupla de FMA/rizóbio nas mudas de *M. scabrella* para garantir um crescimento mais rápido.

A estirpe de rizóbio (R) utilizada neste trabalho (UFSC-B8) foi previamente isolada de solo proveniente de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação, o solo foi coletado próximo as raízes das espécies arbóreas *M. scabrella*, *M. bimucronata* e *Acacia mearnsii* por Moura et al., (2016). Após o isolamento dos rizóbios, os autores testaram a eficiência simbiótica de 19 estirpes isoladas desse solo em três espécies arbóreas em casa de

vegetação (*M. scabrella*, *M. bimucronata* e *Parapiptadenia rígida*) utilizando substrato estéril (vermiculita e areia). Moura et al. (2016) observaram que a estirpe UFSC-B8 apresentou elevada eficiência simbiótica (256%) em promover o crescimento das mudas de bracinga. No presente estudo o tratamento apenas com a estirpe UFSC-B8 foi perdido durante o ensaio, o que não permitiu avaliar o desempenho individual da estirpe em promover o crescimento das mudas. No entanto, a combinação que apresentou os melhores resultados na promoção do crescimento vegetal de *M. scabrella* contém a estirpe de rizóbio (R+E1+F), o que demonstra a importância da participação deste microrganismo nos tratamentos de coinoculação para a espécie.

Outro trabalho realizado com coinoculação de FMA e rizóbios em espécie arbórea da família Fabaceae também demonstrou resultados de sinergismo no crescimento das mudas (JÚNIOR et al., (2017). No entanto, são poucos os estudos com coinoculação de FMA e rizóbios envolvendo espécies arbóreas da subfamília Cesalpinoideae (BRYAN; BERLYN; GORDON, 1996; CELY et al., 2016), sendo que a formação de nódulos foi observada em poucos casos (MOREIRA, 1994; BARBERI et al., 1998). *S. multijuga* é uma espécie pertencente a subfamília Cesalpinoideae e não é nodulífera (FARIA et al., 1984; SOUZA; SILVA; MOREIRA, 1994; LÍRIO et al., 2012; VARGAS; MARQUES, 2017), porém pode se beneficiar do N<sub>2</sub> fixado por rizóbios, bactérias endofíticas e da rizosfera (VAN SAMBEEK; NAVARRETE-TINDALL; HUNT, 2008), assim como, os rizóbios podem atuar como promotoras do crescimento vegetal beneficiando o crescimento de espécies não nodulíferas (MEHBOOB et al., 2012). Cely et al. (2016) observaram em uma espécie da subfamília Cesalpinoideae, *Schizolobium parahyba*, que tanto a inoculação apenas de rizóbios como a coinoculação de rizóbios com FMA incrementaram o desenvolvimento das mudas inoculadas, demonstrando assim que os rizóbios podem favorecer o desenvolvimento de espécies não nodulíferas.

Em *S. terebinthifolius* a tripla inoculação com E1+E2+F foi a que mais influenciou, de forma geral, nos parâmetros de crescimento avaliados, assim como na absorção de N e P. A coinoculação de E1+E2+F também apresentou efeitos sinérgicos na MSPA e no AP comparado a todas as combinações duplas de E1, E2 e F e em relação as inoculações simples desses microrganismos. Segundo Nascimento et al. (2020) a estirpe E2 (MSR2) pode atuar por diversos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, incluindo aumento da atividade da ACC deaminase, na produção de sideróforos, na biossíntese de IAA e na solubilização de fosfatos.

Assim como pode ocorrer sinergismo entre os microrganismos promovendo o crescimento vegetal, efeitos antagonistas também podem ser observados. Os efeitos antagonistas podem ocorrer pela competição entre os microrganismos, o que causa uma superexploração do hospedeiro (SCHEUBLIN e VAN DER HEIJDEN, 2006; HASSANI, DURÁN, HACQUARD, 2018; AFKHAMI et al., 2020). Nas espécies arbóreas avaliadas neste estudo, com exceção de *M. scabrella*, foram verificados efeitos negativos nas inoculações ou coinoculações de microrganismos em uma ou mais variáveis avaliadas em comparação com as mudas que não foram inoculadas, assim como foi também observado efeito antagonista entre os microrganismos em alguns tratamentos quando comparado a inoculação simples ou dupla dos respectivos microrganismos. Por exemplo, em *C. myrianthum* o tratamento de tripla inoculação R+E1+E2 apresentou valores médios para os parâmetros altura, diâmetro, MSPA e AN inferiores aos observados no tratamento controle SI e, valores menores na MSPA, AN e AP comparado a inoculação simples de R, E1 e E2, indicando que possa ter ocorrido efeitos antagonistas entre as estirpes de bactérias inoculadas conjuntamente nessa espécie vegetal. Santos et al. (2018) verificaram efeitos negativos da inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal em mudas de *Myrciaria dubia* no diâmetro de caule e, segundo os autores esse resultado pode ser atribuído a uma possível incompatibilidade com a microbiota nativa da rizosfera da planta, gerando competição entre os microrganismos, o que reflete por consequência em efeitos negativos no crescimento das plantas.

Outro ponto muito importante a ser observado nesse estudo em condições controladas é que os resultados indicam a existência de seletividade simbiótica diferenciada, havendo combinações preferenciais de microrganismos pelas espécies vegetais estudadas. Em estudo com a espécie arbórea *Piptadenia gonoachanta* também foi observada essa seletividade e preferência da espécie por certas combinações de rizóbios e FMA que resultaram em maiores incrementos no crescimento das mudas, maior CM e nodulação (BOURNAUD et al., 2017). Resultados semelhantes foram observados em estudos com *Aegiceras corniculatum* (Primulaceae), *Bruguiera gymnoirrhiza* (Rhizophoraceae) e *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) inoculadas com diferentes estirpes de bactérias promotoras do crescimento vegetal, sendo que foram feitas inoculações simples e combinadas. Os autores observaram que os efeitos de uma dada bactéria ou combinação de bactérias diferiram entre as espécies vegetais, e uma dada espécie de planta respondeu de forma diferente às diferentes inoculações bacterianas (XIONG et al., 2016). Os resultados encontrados por Xiong et al. (2016) e em estudo anterior por Rojas et al. (2001), sugerem que a inoculação de bactérias promotoras do

crescimento vegetal pode promover o crescimento das plantas, independentemente da planta e da bactéria, porém a interação entre a planta e a bactéria vão definir a magnitude dos efeitos promovidos. Esses resultados demonstram a importância da realização de estudos de inoculação e coinoculação para cada espécie vegetal a fim de selecionar os microrganismos ou combinações destes mais eficientes, garantindo assim melhores resultados para cada espécie vegetal.

## 5.5 CONCLUSÕES

A coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) favoreceu o crescimento das mudas das espécies arbóreas avaliadas no presente trabalho em solo estéril proveniente de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação e, apresentam potencial de aplicação na produção de mudas visando a revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão em SC. Para as espécies arbóreas *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. multijuga* a tripla inoculação R+E1+F (*Rhizobium* sp. + *Pseudomonas* sp. + Inoculante a base de *Rhizophagus intraradices*) e para *S. terebinthifolius* a tripla inoculação E1+E2+F (*Pseudomonas* sp. + *Pantoea* sp. + Inoculante a base de *Rhizophagus intraradices*) foram as combinações de MPCV que mais promoveram o crescimento dessas espécies arbóreas. Nas mudas de *S. multijuga* a coinoculação dos quatro microrganismos (MIX – *Rhizobium* sp. + *Pseudomonas* sp. + *Pantoea* sp. + Inoculante a base de *Rhizophagus intraradices*) também promoveu o crescimento da espécie.

Em *C. myrianthum* foi possível observar que a absorção de fósforo e nitrogênio podem ter sido favorecidas pela coinoculação de R+E1+F e, em *S. multijuga* na absorção de N. Em *S. terebinthifolius* esse efeito também foi observado na inoculação tripla E1+E2+F na absorção de N e P. Já em *M. scabrella* a promoção do crescimento vegetal pode ter ocorrido por meio de outros mecanismos que não foram avaliados no presente trabalho.

Embora a colonização micorrízica nas mudas de *C. myrianthum*, *M. scabrella*, *S. terebinthifolius* e *S. multijuga* tenha sido baixa em todos os tratamentos que receberam o inoculante comercial a base de FMA (*R. intraradices* – Rotella BR), com exceção do tratamento F (inoculação simples do FMA) em *S. multijuga*, a coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal contendo o FMA beneficiou o crescimento das mudas em todas as espécies, pois nas combinações que mais promoveram o crescimento vegetal continham o FMA.

Em *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. terebinthifolius* a colonização micorrízica foi maior no tratamento sem autoclavar e sem inoculação (S/A), demonstrando o potencial da comunidade autóctone de FMA presente em em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação em colonizar as raízes das espécies estudadas.



## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C. et al. Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 847-850, 2016.
- AFKHAMI, M. E. et al. Tripartite mutualisms as models for understanding plant–microbial interactions. **Current opinion in plant biology**, v. 56, p. 28-36, 2020.
- ALMEIDA, V. G.; DE MOURA, E. N.; VIEIRA, G. T. Espécies vegetais utilizadas em áreas degradadas pela mineração. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 3, p. e3583710-e3583710, 2019.
- ARAÚJO, É. de O. et al. Co-inoculation with rhizobacteria in association with humic acid and nitrogen on common bean development. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n. 21, p. 1908-1913, 2016.
- BAKHSHANDEH, E. et al. Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 1, p. 123-136, 2020.
- BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O.; STENZEL, N. M. C. Resposta da acerola à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em solo com diferentes níveis de fósforo. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 166-175, 2011.
- BARBERI, A. et al. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.
- BASSETT, I. E.; SIMCOCK, R. C.; MITCHELL, N. D. Consequences of soil compaction for seedling establishment: implications for natural regeneration and restoration. **Austral Ecology**, v. 30, n. 8, p. 827-833, 2005.
- BOURNAUD, C. et al. Interdependency of efficient nodulation and arbuscular mycorrhization in *Piptadenia gonoacantha*, a Brazilian legume tree. **Plant, cell & environment**, v. 41, n. 9, p. 2008-2020, 2017.
- BRASIL. 12º Relatório de monitoramento dos indicadores ambientais. 2019. Disponível em:< <http://acpcarvao.com.br/login/index.php>> Acesso em: abril de 2021.
- BRASIL. Critérios para a recuperação ou reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão. Ação Civil Pública nº 93.8000533-4. 2008.
- BRYAN, J. A.; BERLYN, G. P.; GORDON, J. C. Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae. In: **Current Issues in Symbiotic Nitrogen Fixation**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 151-159.
- BRITO, V. N. et al. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada na produção de mudas de paricá. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 2, p. 485-497, 2017.

- CELY, M. V. T et al. Inoculation of *Schizolobium parahyba* with mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria increases wood yield under field conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1708, 2016.
- CHAVES, T. F. Uma análise dos principais impactos ambientais verificados no estado de Santa Catarina. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 5, n. 2, p. 611-634, 2016.
- COLONETTI, S. et al. Florística e estrutura fitossociológica em floresta ombrófila densa submontana na barragem do rio São Bento, Siderópolis, Estado de Santa Catarina. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 4, p. 397- 405, 2009.
- COSTA, S. M. L.; MELLONI, R. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 169-180, 2019.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.
- DUPONNOIS, R.; PLENCHETTE, C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 2, p. 85-91, 2003.
- FARIA, S. M. et al. New nodulating legume trees from southeast Brazil. **New Phytologist**, v. 98, p. 317-328, 1984.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, Dorotéia Alves et al. Soil microbial diversity affects the plant-root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. **Microbial ecology**, p. 1-4, 2020.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New phytologist**, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.
- GONZÁLEZ ROCHA, D. A. **Fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão no crescimento de mudas de bracatinga (*Mimosa scabrella*) e cedro (*Cedrela fissilis*) em solo de áreas de mineração de carvão**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- GOVINDARAJULU, M. et al. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 819-823, 2005.
- HABTE, M.; MANJUNATH, A. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. **Mycorrhiza**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 1991.

HASSANI, M. A.; DURÁN, P.; HACQUARD, S. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2018.

HERNÁNDEZ, A. G. et al. Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 7, p. 991-1001, 2017.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California Agricultural Experiment Station**, v. 347(2nd edit), 1950.

HOLL, K. D.; AIDE, T. M. When and where to actively restore ecosystems? **Forest ecology and management**, v. 261, n. 10, p. 1558-1563, 2011.

JÚNIOR, J. Q. de O. et al. Nitrogen-fixing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 95-100, 2017.

KARTHIKEYAN, A.; ARUNPRASAD, T. Growth response of *Pterocarpus santalinus* seedlings to native microbial symbionts (arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium aegyptiacum*) under nursery conditions. **Journal of Forestry Research**, p. 1-7, 2019.

KOSKE, R. E; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v. 92, p. 486-505, 1989.

LÍRIO, E. J. et al. Efeito da inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* (Bradyrhizobiaceae) sobre o desenvolvimento de *Senna multijuga* e *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae). **Natureza On line**, v. 10, n. 4, p. 195-199, 2012.

LAMMEL, D. R. et al. Woody *Mimosa* species are nodulated by *Burkholderia* in ombrophylous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **Plant and soil**, v. 393, n. 1-2, p. 123-135, 2015.

LOERA-MURO, A. et al. Growth effects in oregano plants (*Origanum vulgare* L.) assessment through inoculation of bacteria isolated from crop fields located on desert soils. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 381-395, 2021.

**Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.** 10.ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016. 394p.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 13, de 24/03/20011.** Disponível em: <http://in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf> (www.gov.br). Acesso em 20/05/2021. 2011

MARQUES, M. S.; PAGANO, M.; SCOTTI, M. R. M. M. L. Dual inoculation of a woody legume (*Centrolobium tomentosum*) with rhizobia and mycorrhizal fungi in south-eastern Brazil. **Agroforestry Systems**, v. 52, n. 02, 107-117, 2001.

MCGONIGLE, T. P. et al. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. **New phytologist**, v. 115, n. 3, p. 495-501, 1990.

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

MELLO, A. H.; DA SILVA, E. M. R.; JÚNIOR, O. J. S. Estabelecimento de fungos micorrízicos arbusculares em mudas de Mimosa artemisiana em diferentes substratos. **Revista Agroecossistemas**, v. 4, n. 2, p. 52-66, 2012.

MELLONI, R.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área de mineração de bauxita em reabilitação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 267-276, 2003.

MENEZES, C. T. B. et al. Percepção de impactos socioambientais e a gestão costeira: Estudo de caso em uma comunidade de pescadores no litoral sul de Santa Catarina, Brasil. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 3, p. 457-481, 2019.

MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAUJO, RS; HUNGRIA, M. **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-CNPAF/EMBRAPA-CNPSO/EMBRAPA-SPI, p. 121-150, 1994.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2nd edition. Lavras: UFLA, p. 83-161, 2006.

MOREL, M. A. et al. The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: an interaction that improves plant yield. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 2, p. 134-142, 2015.

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

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica chimica acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NANJUNDAPPA, A. et al. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus* spp. in soil enhancing growth of crop plants. **Fungal biology and biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2019.

NASCIMENTO, F. X.; GLICK, B. R.; ROSSI, M. J. Isolation and characterization of novel soil-and plant-associated bacteria with multiple phytohormone-degrading activities using a targeted methodology. **Access Microbiology**, v. 1, n. 7, p. e000053, 2019.

NASCIMENTO, F. X. I. **Promoting plant growth using ACC deaminase-producing bacteria: insights into plant-bacterial interactions and agricultural and biotechnological applications**. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

NASCIMENTO, F. X. et al. The extreme plant-growth-promoting properties of *Pantoea phytobeneficialis* MSR2 revealed by functional and genomic analysis. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1341-1355, 2020.

OLIVEIRA, J. J. F.; ALIXANDRE, T. F. Parâmetros biométricos de mudas de sabiá micorrizadas sob níveis de fósforo em Latossolo Amarelo. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 74, p. 159-167, 2013.

PASQUALINI, D.; UHLMANN, A.; STÜRMER, S. L. Arbuscular mycorrhizal fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plants species from the Atlantic rain forest in South Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 245, n. 1-3, p. 148-155, 2007.

PATREZE, C. M.; CORDEIRO, L. Nitrogen-fixing and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. **Forest Ecology and Management**, v. 196, n. 2-3, p. 275-285, 2004.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013.

PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p. 158-161, 1970.

POSTA, Katalin; DUC, Nguyen Hong. Benefits of arbuscular mycorrhizal fungi application to crop production under water scarcity. **Drought-Detection and Solutions**, v. 2020, p. 25-37, 2020.

REINHARDT, D. Programming good relations—development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in plant biology**, v. 10, n. 1, p. 98-105, 2007.

ROCHA-NICOLEITE, E. et al. **Mata Ciliar: Implicações técnicas sobre a restauração após mineração de carvão**. Criciúma: SATC, p. 45-57, 2013.

ROCHA-NICOLEITE, E.; OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C. Degradation by coal mining should be priority in restoration planning. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 15, n. 3, p. 202-205, 2017.

ROJAS, A. et al. Synergism between *Phyllobacterium* sp.(N<sub>2</sub>-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, n. 2, p. 181-187, 2001.

SANTOS, J. G. D.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares isolados de solos de áreas de mineração de bauxita no crescimento inicial de espécies nativas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. 1, 2008.

SANTOS, C. H. B. et al. Promoção do crescimento de mudas frutíferas por meio de microrganismos encapsulados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 3, 2018.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974.

SCHEUBLIN, T. R.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize nonfixing root nodules of several legume species. **New Phytologist**, v. 172, n. 4, p. 732-738, 2006.

SCHIAVO, J. A.; MARTINS, M. A. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 173-178, 2003.

SIKES, B. A.; COTTENIE, K.; KLIRONOMOS, J. N. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 6, p. 1274-1280, 2009.

SILVA, F. F. Uso de *topsoil* como fonte de inóculo de microrganismos simbiotes para leguminosas florestais usadas na recuperação de áreas degradadas na Caatinga. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) – Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.

SILVA, L. F. O. et al. Study of environmental pollution and mineralogical characterization of sediment rivers from Brazilian coal mining acid drainage. **Science of the total environment**, v. 447, p. 169-178, 2013.

SILVA, E. P. da. **Caracterização de bactérias endofíticas da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e potencial aplicação em áreas de mineração de carvão em recuperação**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências) – Recursos Genéticos Vegetais, UFSC. Florianópolis, 2020.

SOUZA, L. A. G; SILVA, M. F; MOREIRA, F. W. Capacidade de nodulação em cem leguminosas da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 24, n. 18, p. 9-18, 1994.

STOFFEL, S. C. G. et al. Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em substrato contendo rejeito de mineração de carvão. **Cerne**, v. 22, n. 2, p. 181-188, 2016.

STOFFEL, S. C. G. et al. Yield increase of corn inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **Ciência Rural**, v. 50, 2020a.

STOFFEL, S. C. G. et al. Yield increase of soybean inoculated with a commercial arbuscular mycorrhizal inoculant in Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 16, n. 5, p. 702-713, 2020b.

SUBRAMANIAN, P. et al. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. **Plant Growth Regulation**, v. 76, n. 3, p. 327-332, 2015.

SUNDRAM, S. et al. Symbiotic interaction of endophytic bacteria with arbuscular mycorrhizal fungi and its antagonistic effect on *Ganoderma boninense*. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 551-557, 2011.

SYLVIA, D. M.; WILLIAMS, S. E. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stress. **American Society of Agronomy** (special publication), 1992.

SYSTAT SOFTWARE INC. SigmaPlot (r)-Scientific Data Analysis and Graphing Software. 2008.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. *Boletim técnico*, 5. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

TEIXEIRA-RIOS, Thais; DE OLIVEIRA, João Ricardo Gonçalves; YANO-MELO, Adriana Mayumi. Arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus in the initial development of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 997-1004, 2016.

VALDENEGRO, M.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid mediterranean area. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 02, p. 233-240, 2001.

VAN SAMBEEK, J. W.; NAVARRETE-TINDALL, N. E.; HUNT, K. L. Growth and foliar nitrogen concentrations of interplanted native woody legumes and pecan. *In*: JACOBS, D. F.; MICHLER, C. H., eds. **Proceedings, 16th central hardwood forest conference**. Newtown Square, PA: US Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station: p. 580-588. 2008.

VARGAS, G. de; MARQUES, R. Crescimento e nutrição de angico e canafistula sob calagem e gessagem. **Floresta e ambiente**, v. 24, 2017.

XIONG, Y. et al. Species-specific effects of P-solubilizing and N<sub>2</sub>-fixing bacteria on seedling growth of three salt-tolerant trees. **Russian journal of ecology**, v. 47, n. 3, p. 259-265, 2016.

ZANGARO, W. et al. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 19, n. 3, p. 315-324, 2003.

WANG, Z. et al. Effects of phosphate-solubilizing bacteria and N<sub>2</sub>-fixing bacteria on nutrient uptake, plant growth, and bioactive compound accumulation in *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. **Forests**, v. 10, n. 9, p. 772, 2019.

## 6. CAPÍTULO II

Coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas pioneiras em condições de viveiro visando a revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão

### RESUMO

A revegetação com espécies arbóreas é uma prática adotada na recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão em Santa Catarina, especialmente nas áreas de preservação permanente (APPs). A inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) na produção de mudas de espécies arbóreas podem favorecer o crescimento reduzindo o tempo necessário para a obtenção de mudas em viveiro e, aumentar a sobrevivência e a adaptação no transplante para solos degradados em processo de recuperação, como os encontrados na região carbonífera catarinense. Com o objetivo de avaliar o crescimento das mudas de quatro espécies arbóreas (*Citharexylum myrianthum*, *Schinus terebinthifolius*, *Senna multijuga* e *Mimosa scabrella*) inoculadas com MPCV em condições de viveiro, foram realizados ensaios independentes para cada uma das espécies. Os tratamentos foram: um inoculante comercial a base de fungo micorrízico arbuscular (FMA) (*Rhizophagus intraradices*) – Rotella BR, um consórcio de três bactérias promotoras do crescimento vegetal (MIX) (SC5 - *Pseudomonas* sp, MSR2 - *Pantoea* sp. e UFSC-B8 – *Rhizobium* sp.), e MIX+FMA (SC5 +MSR2 + UFSC-B8 + RotellaBR), e um tratamento controle sem inoculação (SI). Os experimentos foram montados seguindo as práticas de produção de mudas utilizadas pelos viveiristas empregando substrato não esterilizado. Após 180 dias, as mudas foram avaliadas quanto ao crescimento, absorção de nutrientes, colonização micorrízica (CM) e número de esporos (NE) presentes no solo. Verificou-se as maiores médias de CM nas mudas de *S. terebinthifolius* e de *C. myrianthum*. Com valores de CM variando de 72 a 75% em *C. myrianthum* nos tratamentos de inoculação MIX, FMA e MIX+FMA e, de 82 a 87% nas mudas de *S. terebinthifolius* nos tratamentos de inoculação FMA e MIX+FMA, respectivamente. Em condições de viveiro as mudas de *C. myrianthum* foram mais favorecidas pelo tratamento de inoculação FMA, com incrementos de 112%, 37%, 119%, 87%, 126% e de 135% na altura, diâmetro, massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), acúmulo de nitrogênio (AN) e fósforo (AP), respectivamente, em comparação com o controle SI. Já para *S. multijuga*, o tratamento MIX+FMA se destacou, tanto em relação ao crescimento como também em relação ao AN e AP, com incrementos de 176%, 438%, 920%, 749% e de 718% na altura, MSR, MSPA, AN e AP, respectivamente. Para *S. terebinthifolius* os tratamentos de inoculação FMA e MIX+FMA apresentaram incrementos de 14%, 9% e de 33% em comparação com o tratamento controle nos parâmetros diâmetro, MSR e MSPA, respectivamente. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram potencial da inoculação de MPCV especialmente no desenvolvimento das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* em condições de viveiro. Para *M. scabrella* e *S. terebinthifolius*, embora a inoculação tenha sido positiva em alguns dos parâmetros avaliados, estudos de inoculação com outros MPCV devem ser considerados.

Palavras-chave: Revegetação. Áreas degradadas. Espécies pioneiras. FMA. Bactérias promotoras do crescimento vegetal.



## 6.1 INTRODUÇÃO

A exploração de carvão mineral a céu aberto em SC gerou consequências ambientais que até hoje não foram completamente recuperadas. Estima-se que aproximadamente 6.500 hectares tenham sido degradados (ROCHA-NICOLEITE; OVERBECK; MÜLLER, 2017; BRASIL, 2019). Essas áreas sofreram severa degradação ambiental e, necessitam, portanto, de intervenção antrópica para acelerar a recuperação ambiental. Uma das práticas adotadas nesses locais é a reconstrução do solo (ROCHA-NICOLEITE et al., 2018). Essa reconstrução se faz necessária pois, durante o processo de extração de carvão que era realizado, houve a inversão das camadas férteis do solo.

Logo após a construção do solo, normalmente é feita a revegetação. A revegetação é uma técnica que consiste na formação de uma camada vegetal sobre o solo. Nas áreas de preservação permanente, além da introdução de espécies herbáceas, é realizado o plantio com espécies arbóreas (BRASIL, 2008). Estudos tem demonstrado que o desenvolvimento de espécies arbóreas introduzidas em áreas degradadas influencia positivamente a regeneração natural (CITADINI-ZANETTE et al., 2017; ROCHA-NICOLEITE et al., 2018). Todavia, um solo construído não apresenta as mesmas condições presentes em um solo natural, com condições químicas (CAMPOS et al., 2010), físicas (STUMPF et al., 2016) e biológicas (DOS SANTOS et al., 2008) alteradas, dificultando o estabelecimento, desenvolvimento e sobrevivências das mudas introduzidas.

Uma alternativa que pode facilitar a adaptação, o desenvolvimento e a sobrevivência das mudas de espécies arbóreas sob solos construídos é a inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) durante a produção de mudas em viveiro. Alguns estudos têm demonstrado que a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e/ou bactérias promotoras do crescimento vegetal, rizosféricas ou endofíticas em espécies vegetais, podem favorecer o desenvolvimento vegetal (POUYÚ-ROJAS e SIQUEIRA, 2000; CARNEIRO, SIQUEIRA, DAVIDE, 2004; ASLANTAS, ÇAKMAKCI, SAHIN, 2007; MENDES et al., 2013), facilitar a adaptação e a sobrevivência das mudas no campo (CARNEIRO, SIQUEIRA, DAVIDE, 2004; VANDRESEN et al., 2007), inclusive em ambientes de maior estresse ambiental (BASHAN et al., 2012; KONG e GLICK, 2017), como é o caso das áreas com solos construídos.

A produção de mudas em viveiro requer grande espaço físico, custos com manutenção como mão de obra, irrigação e fertilizantes e, com a crescente procura por mudas de espécies

nativas para a recuperação de áreas degradadas, muitas vezes não é possível atender todas as demandas, o que acaba gerando atrasos na implantação dos Planos de Recuperação de Áreas Degradadas (PRADS) (MELO JUNIOR, 2020). Dessa forma, a inoculação de MPCV não apenas poderia fornecer vantagens às mudas no transplante para o campo, como poderiam acelerar o crescimento em condições de viveiro, com a obtenção de mudas de qualidade em questão não apenas de tamanho, mas em termos também de vigor (PATREZE; CORDEIRO, 2004; PASQUALINI, 2013; RODRIGUES; BARROSO; FIQUEIREDO, 2018, MELO JUNIOR, 2020). Outro ponto importante no processo de produção de mudas, adotado pelos viveiristas, é em relação ao fornecimento adequado de água e nutrientes, condição que não é observada no campo e, que pode levar à altos índices de mortalidade. Nesse caso, a inoculação de MPCV também tendem a aumentar a resistência das plantas as condições de estresse hídrico e baixa fertilidade do solo (SCHIAVO e MARTINS, 2003; PASQUALINI, 2013).

Os PRADs das áreas de mineração de carvão em Santa Catarina que estão em execução, não preveem a inoculação de MPCV na produção de mudas, assim como não há nada em relação a inoculação ou uso de microrganismos estabelecido nos Critérios para a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão (BRASIL, 2008) vigentes no momento. Como a inoculação de MPCV pode favorecer de tantas formas, como já visto, o desenvolvimento vegetal, além de ser uma prática econômica viável e ambientalmente aceita, faz-se necessários estudos que demonstrem em condições de viveiro, que a produção das mudas por meio da coinoculação de microrganismos é vantajosa e, fornecer também os subsídios para a adoção desse procedimento pelas empresas responsáveis pela recuperação das áreas degradadas pela mineração de carvão em SC.

Durante aproximadamente uma década, o grupo de pesquisa pertencente ao Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LMPB) da Universidade Federal de Santa Catarina, tem se dedicado ao estudo de isolamento, teste de promoção de crescimento *in vitro*, ensaios em condições controladas de casa de vegetação envolvendo microrganismos distintos, como: bactérias formadoras de nódulos (MOURA et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2019), bactérias endofíticas e rizosféricas (NASCIMENTO; GLICK; ROSSI, 2019; NASCIMENTO et al., 2020; SILVA, 2020) e FMA (GONZÁLEZ, 2016; STOFFEL et al., 2016) com o intuito de selecionar os microrganismos mais aptos para a promoção do crescimento vegetal para diferentes espécies vegetais, visando a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão.

Neste trabalho foram selecionados alguns dos microrganismos previamente isolados e estudados pelo grupo de pesquisa do LMPB e, que apresentam elevado potencial de promoção de crescimento vegetal. Alguns estudos têm demonstrado que a inoculação de dois ou mais microrganismos, ou seja, a coinoculação de MPCV pode atuar de forma sinérgica promovendo maiores ganhos no crescimento vegetal (VALDENEGRO, BAREA, AZCÓN, 2001; SOUCHIE et al., 2005; YU et al., 2012; PASQUALINI, 2013; WANG et al., 2019; COSTA e MELLONI, 2019). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a coinoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas nativas em condições de viveiro com solo não estéril.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Local de estudo e Material biológico empregado

A fim de avaliar os efeitos dos microrganismos promotores do crescimento vegetal em espécies arbóreas nativas em condições não estéreis foram realizados ensaios no Horto Florestal pertencente à Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC em Criciúma – SC. Nesses ensaios o substrato utilizado, assim como os demais materiais, não foi esterilizado com o intuito de simular as condições utilizadas pelos viveiristas. Entretanto, durante a inoculação das sementes, e na reinoculação das plântulas, foi tomado o devido cuidado para evitar contaminação cruzada entre os tratamentos de inoculação e entre o tratamento controle.

#### 6.2.1.1 Microorganismos selecionados

Os microrganismos foram selecionados com base em características de promoção de crescimento vegetal, sendo: uma bactéria formadora de nódulo (UFSC-B8 – *Rhizobium* sp. (R)) (MOURA et al., 2016, HERNÁNDEZ et al., 2017), uma bactéria endofítica (SC5 – *Pseudomonas* sp. (E1)) (NASCIMENTO; GLICK; ROSSI, 2019) uma bactéria rizosférica (MSR2 – *Pantoea* sp. (E2)) (NASCIMENTO et al., 2020) e um inoculante comercial a base de FMA (*Rhizophagus intraradices*) (Rotella BR) (F). As estirpes UFSC-B8, SC5 e MSR2 demonstraram capacidade de produzir ácido indol-3-acético (AIA) e de solubilizar fosfato, e as estirpes SC5 e MSR2 também demonstraram capacidade de produzir 1-aminociclopropano-carboxílico desaminase (ACC desaminase).

Para a produção do inóculo bacteriano, as bactérias E1 e E2 foram repicadas separadamente para o meio de cultura Tryptone Soya Broth (TSB- em g/L<sup>-1</sup>: peptona de caseína (pancreática) 17,0; peptona de soja 3,0 g; NaCl 5,0g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5g e glicose 2,5g, pH 7,3). Já a bactéria R foi repicada para o meio yeast manitol (YM - em g/L<sup>-1</sup>: manitol 10,0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 0,2 g; NaCl 0,1 g; extrato de levedura 0,5 g; água destilada 1000 ml, pH 6,8) e incubadas a 28 °C, sob agitação a 150 g em mesa agitadora (MA 830, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) até atingirem 0,5 de DO no comprimento de onda de 540 nm R (meio YM) e no comprimento de onda de 600 nm as bactérias E1 e E2 (meio TSB). Previamente a inoculação das bactérias no meio de cultura, os meios TSB e YM foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### 6.2.1.2 Espécies arbóreas selecionadas

Nesse estudo foram utilizadas quatro espécies arbóreas nativas da região sul do estado de Santa Catarina: *Citharexylum myrianthum* Cham. (tucaneira), *Mimosa scabrella* Benth. (bracatinga), *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha) e *Senna multijuga* (Rich.) H.S.Irwin & Barneby (pau-cigarra). As sementes de *C. myrianthum*, *S. terebinthifolius* e *S. multijuga* foram adquiridas junto ao Instituto Brasileiro de Florestas (IBF). As sementes de *M. scabrella* com a Embrapa Agrobiologia de Seropédica, RJ.

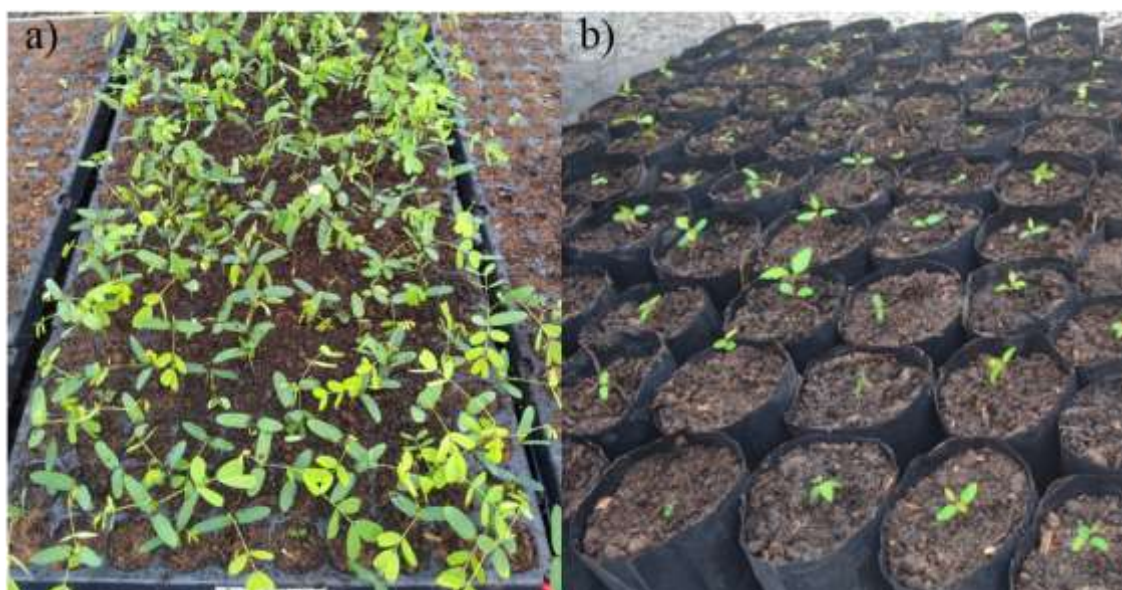
### 6.2.2 Delineamento experimental

Foram montados ensaios independentes para cada uma das espécies arbóreas. O experimento consistiu em três tratamentos de inoculação, sendo: inoculante comercial a base de fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices* (FMA) (Rotella BR), MIX de três bactérias promotoras do crescimento vegetal (UFSC-B8 + SC5 + MSR2) e MIX + FMA (UFSC + SC5 + MSR2 + Inoculante FMA), e um tratamento controle sem inoculação (SI), com 70 repetições cada tratamento, totalizando assim 280 unidades amostrais para cada espécie, (4 espécies = 1120 mudas ao total).

### 6.2.3 Produção de mudas

Inicialmente as sementes foram semeadas em bandejas plásticas de 200 células (Figura 10a) contendo substrato não estéril (Tabela 4).

Figura 10. a) Mudras de *Senna multijuga* em bandeja de plástico com 200 células; b) Mudras de *S. terebinthifolius* recém transferidas para sacos plásticos de 15 x 21 cm.



Fonte: Arquivos pessoais da autora (2021).

Tabela 4. Composição do substrato utilizado na produção de mudras de *C. myrianthum*, *M. scabrella* e *S. multijuga* em viveiro.

	Composição do substrato	Proporção para 100 L
Bandejas	Terra vegetal	55,5 L
	Cinza de casca de arroz carbonizado	44,4 L
Sacos plásticos	Terra vegetal	50 L
	Cinza de casca de arroz carbonizado	40 L
	Cama de aves	10 L
	Fertilizante NPK (5-20-20)	50 g

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Foram colocadas três sementes por célula. As sementes passaram por processo de quebra de dormência quando necessário, como já descrito anteriormente (Capítulo I), não foi feita desinfecção superficial e nem pré-germinação das sementes. Quinze dias após o surgimento do cotilédone das sementes, foi realizado o desbaste deixando-se apenas uma plântula por célula.

Após dois meses, as plântulas foram transplantadas para sacos plástico de 15 x 21 cm (Figura 10b) contendo substrato não estéril (Tabela 4) e acrescido mais 1 mL de inoculo bacteriano (mistura das três bactérias promotoras do crescimento vegetal) para cada plântula e o equivalente a 200 propágulos do FMA por saco plástico, de acordo com cada tratamento.

As plântulas de cada tratamento foram separadas em blocos e mantidas no viveiro com sombrite 50% durante o primeiro mês de crescimento após transplante para os sacos plásticos.

Durante todo o período de crescimento das mudas no viveiro, as mudas foram irrigadas duas vezes ao dia, com o auxílio de microaspersores. Nos últimos três meses de crescimento das mudas em viveiro, as mudas foram expostas ao sol a fim de permitir a aclimatização ao ambiente de campo.

#### 6.2.4 Análises químicas do substrato

Foram feitas as análises químicas do substrato utilizado nos experimentos do viveiro – bandeja e sacos plásticos, seguindo a metodologia proposta por Tedesco et al. (1995) conforme apresentado na Tabela 5. Segundo o Manual de Calagem e Adubação para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (2016), os resultados das análises químicas dos substratos utilizados na produção das mudas em bandejas e nos sacos plásticos mostraram níveis muito altos de P, níveis altos de K, Ca e Mg; e níveis de matéria orgânica média e baixa, respectivamente.

Tabela 5. Principais análises químicas dos substratos utilizados nos experimentos com espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em viveiro na UNESC, Criciúma, SC.

	%Argila m/v	pH H <sub>2</sub> O 1:1	Índice SMP	H + Al	CTC pH 7,0	MO m/v	N g/kg	P mg/dm <sup>3</sup>	K	Al cmolc/dm <sup>3</sup>	Ca	Mg
Substrato Bandejas	22	5,1	6,3	3,09	10,43	3,2	1,60	153	232	0,4	5,3	1,5
Substrato sacos plásticos	25	5,6	6,3	3,24	11,70	2,5	1,25	153	340	0,0	5,7	1,9

Fonte: Dados da autora (2021).

#### 6.2.5 Avaliações das mudas em viveiro

As plantas permaneceram no viveiro por um período de seis meses (180 dias), que foi o tempo considerado adequado para o crescimento das mudas, quando se realizou a avaliação do crescimento, nutrição das mudas quanto ao teor e acúmulo de nitrogênio e fósforo na parte aérea, colonização micorrízica e número de esporos, onde 10 das 70 repetições por tratamento foram avaliadas de forma aleatória.

Em relação aos parâmetros de crescimento foram feitas as seguintes avaliações: altura da parte aérea (H) (expressa em cm – a partir do coleto até a gema apical), diâmetro do coleto (DC) (expresso em mm – utilizando um paquímetro com precisão de 0,01 mm), peso da matéria seca da parte aérea (MSPA) e peso da matéria seca da raiz (MSR) após secagem em estufa a 65 °C até peso constante.

As avaliações de nutrição das mudas, colonização micorrízica total e número de esporos foram realizadas de acordo com os métodos descritos no Capítulo I, modificando apenas o volume de solo utilizado para avaliar a o número de esporos para 25 mL de solo ao invés de 50 mL de solo como descrito no experimento anterior (Capítulo I).

#### **6.2.6 Análises estatísticas**

Todos os dados obtidos foram submetidos às provas de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Bartlett. Os dados de colonização micorrízica foram transformados pela função arco-cosseno  $\sqrt{\% \text{colonização micorrízica}/100}$  para cumprir os pressupostos da análise de variância. Posteriormente, foi realizada uma ANOVA para cada ensaio e havendo diferença estatística significativa, os dados foram submetidos ao teste de separação de médias SNK a 5% de probabilidade. Para a realização dos testes de normalidade e homogeneidade foi utilizada a extensão do Excel Action Stat, para a ANOVA o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011), e para fazer os gráficos o software Sigma Plot (SYSTAT SOFTWARE, 2008).



## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Colonização micorrízica e número de esporos de FMA

Houve colonização micorrízica em todos os tratamentos avaliados, inclusive no tratamento sem inoculação, o que já era esperado considerando que o substrato além de não ter sido autoclavado, continha em sua composição solo que poderia conter propágulos de FMA. A porcentagem de colonização micorrízica (CM) nas raízes das mudas de *C. myrianthum* foi considerada elevada, não diferindo entre os tratamentos de inoculação (MIX, FMA e MIX+FMA), sendo que estes apresentaram incremento de 37% em comparação com o controle SI (Tabela 6). O número de esporos (NE) médio em *C. myrianthum* foi maior no tratamento FMA que não diferiu do controle SI.

Tabela 6. Colonização micorrízica e número de esporos em mudas de *C. myrianthum*, *M. scabrella*, *S. terebinthifolius* e *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro em solo não estéril.

Espécie vegetal	Tratamento	Colonização micorrízica	Número de esporos (25 mL)
<i>C. myrianthum</i>	MIX	71,8% a	72 b
	FMA	79,4% a	236 a
	MIX+FMA	75,0% a	117 ab
	SI	54,9% b	141 a
<i>M. scabrella</i>	MIX	12,4% b	6 b
	FMA	18,3% a	17 a
	MIX+FMA	14,7% ab	22 a
	SI	7,5% c	20 a
<i>S. terebinthifolius</i>	MIX	38,5% c	708 b
	FMA	86,5% a	1338 a
	MIX+FMA	81,9% a	328 b
	SI	56,2% b	331 b
<i>S. multijuga</i>	MIX	58,3% a	64 b
	FMA	58,7% a	65 b
	MIX+FMA	51,2% a	88 a
	SI	50,0% a	38 c

Fonte: Dados da autora (2021).

Notas: Médias seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de separação de médias SNK ( $P < 0,05$ ). MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação.

Em *M. scabrella* a maior média de CM foi observada no tratamento que recebeu a inoculação de FMA, com um incremento de 144% em comparação com SI, porém os valores

médios para porcentagem de colonização micorrízica em todos os tratamentos avaliados foram inferiores a 25% (Tabela 6).

Para *S. terebinthifolius*, a CM nas raízes das mudas dos tratamentos inoculados com FMA e MIX+FMA apresentaram as maiores médias, com 49% de incremento comparado ao tratamento SI e, de 119% em comparação com o tratamento MIX (Tabela 6).

Em *S. multijuga* a porcentagem média de CM nas raízes das mudas foi bastante elevada, no entanto não houve diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o tratamento controle SI (Tabela 6). Já em relação ao NE, o tratamento MIX+FMA apresentou um incremento de 132% em comparação com SI, e de 70% nos tratamentos FMA e MIX.

### 6.3.2 Avaliação do crescimento das mudas

Na Figura 11 é possível observar uma imagem de cada tratamento inoculado, parte aérea e raízes, em comparação com o tratamento SI para *C. myrianthum* (a, b), *S. multijuga* (c, d) e *M. scabrella* (e, f).

Figura 11. Mudanças das espécies arbóreas pioneiras inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal crescidas em substrato não estéril em condições de viveiro por um período de 180 dias (n=10). a, c, e) parte aérea das mudas de *C. myrianthum*, *S. multijuga* e *M. scabrella*, respectivamente; b, d, f) raízes de *C. myrianthum*, *S. multijuga* e *M. scabrella*, respectivamente. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação.



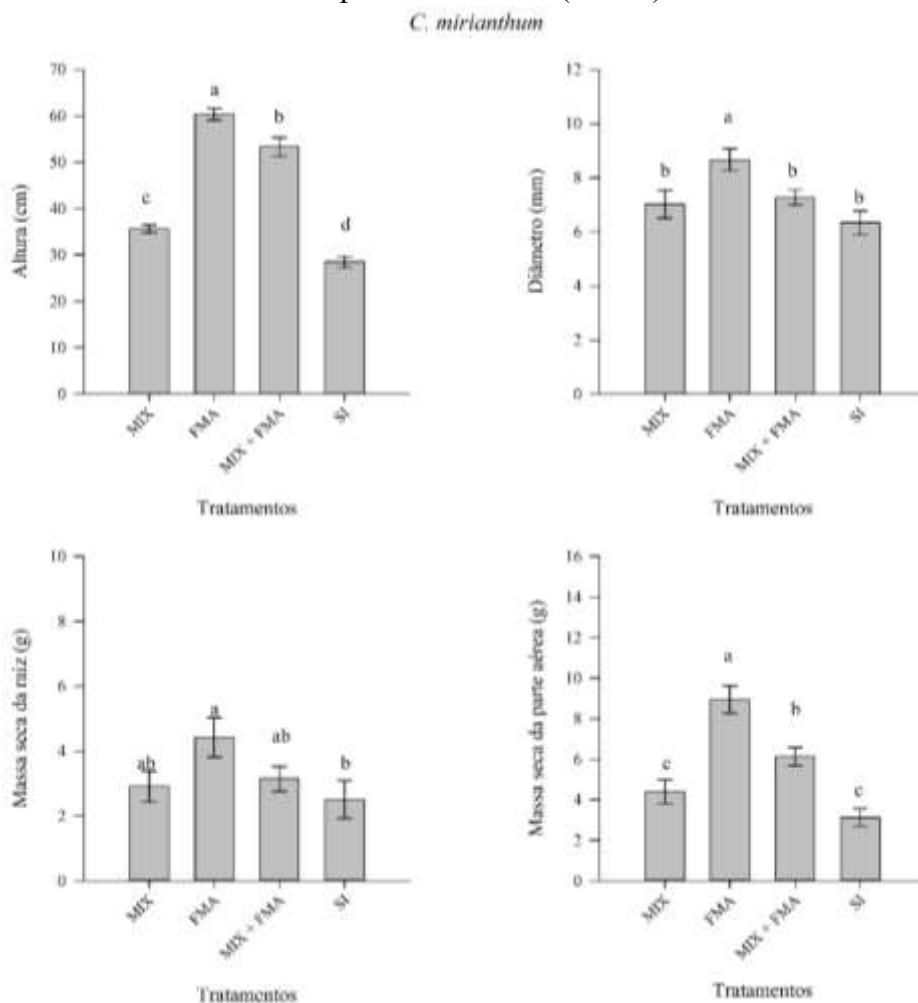
Fonte: Imagens da autora (2021).

Os tratamentos de inoculação influenciaram nos parâmetros de crescimento avaliados nas mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga*, especialmente. Já em *M. scabrella* e *S.*

*terebinthifolius* apenas alguns parâmetros apresentam diferença significativa em relação à inoculação.

Os parâmetros de crescimento avaliados nas mudas de *C. myrianthum* foram mais favorecidas pelo tratamento FMA (Figura 12). As mudas de *C. myrianthum* inoculadas com o tratamento FMA (inoculante a base de *Rhizophagus intraradices*) apresentaram as maiores médias para todos os parâmetros avaliados, sendo o incremento de 112% na altura, 37% no diâmetro, 119% na MSR e de 187% na MSPA em relação ao tratamento controle SI.

Figura 12. Altura (CV% = 9,72), diâmetro (CV% = 17,88), massa seca da raiz (CV% = 46,35) e massa seca da parte aérea (CV% = 30,73) das mudas de *C. myrianthum* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro em condições não estéreis. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10).



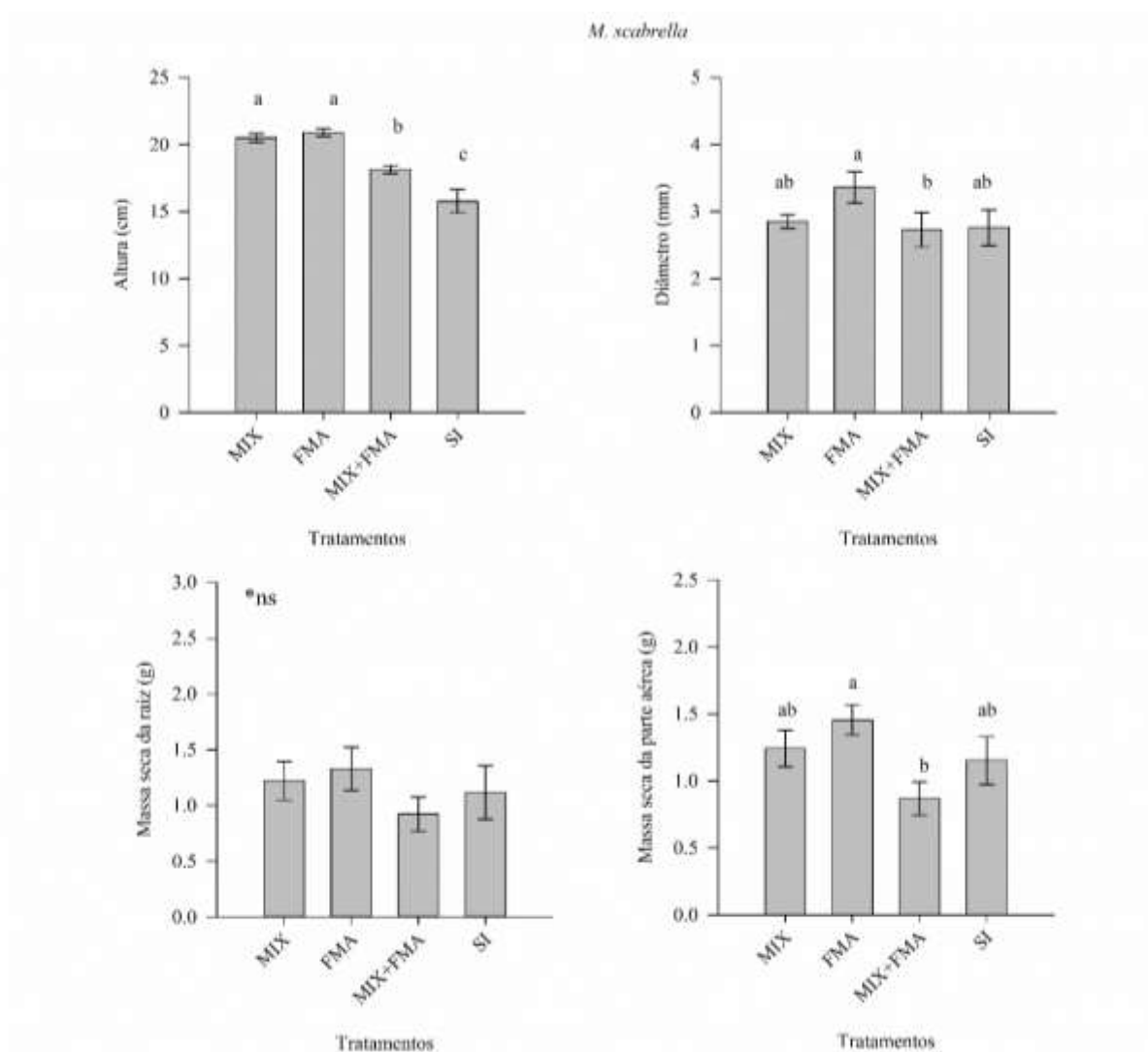
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O tratamento MIX+FMA também influenciou na altura e na MSPA das mudas de *C. myrianthum*, com incrementos médios intermediários de 87% e 96% em relação ao tratamento controle SI, respectivamente (Figura 12). O tratamento MIX, por sua vez, favoreceu menos o crescimento das mudas em comparação com os outros tratamentos de inoculação, com incremento de 25% na altura em relação ao controle SI. Em relação à MSPA, o tratamento MIX não diferiu do controle SI. As mudas inoculadas com MIX e MIX+FMA não diferiram estatisticamente do tratamento controle em relação ao diâmetro.

Em relação aos parâmetros de crescimento avaliados, as mudas de *M. scabrella* foram pouco beneficiadas pela inoculação de MPCV de forma geral, sendo observado uma influência do tratamento de inoculação com as três bactérias - MIX e do tratamento FMA apenas para o parâmetro altura (Figura 13), com incremento de 31% em relação ao tratamento controle SI. Em relação a MSR, as mudas de *M. scabrella* não apresentaram diferenças significativa entre os tratamentos. Já para MSPA, o tratamento FMA diferiu apenas do tratamento MIX+FMA.

Figura 13. Altura (CV% = 18,89), diâmetro (CV% = 21,95), massa seca da raiz (CV% = 52,88) e massa seca da parte aérea (CV% = 37,38) das mudas de *M. scabrella* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro.

MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA = inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA = RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI = sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ ). \*ns = estatística não significativa ( $P > 0,05$ ).

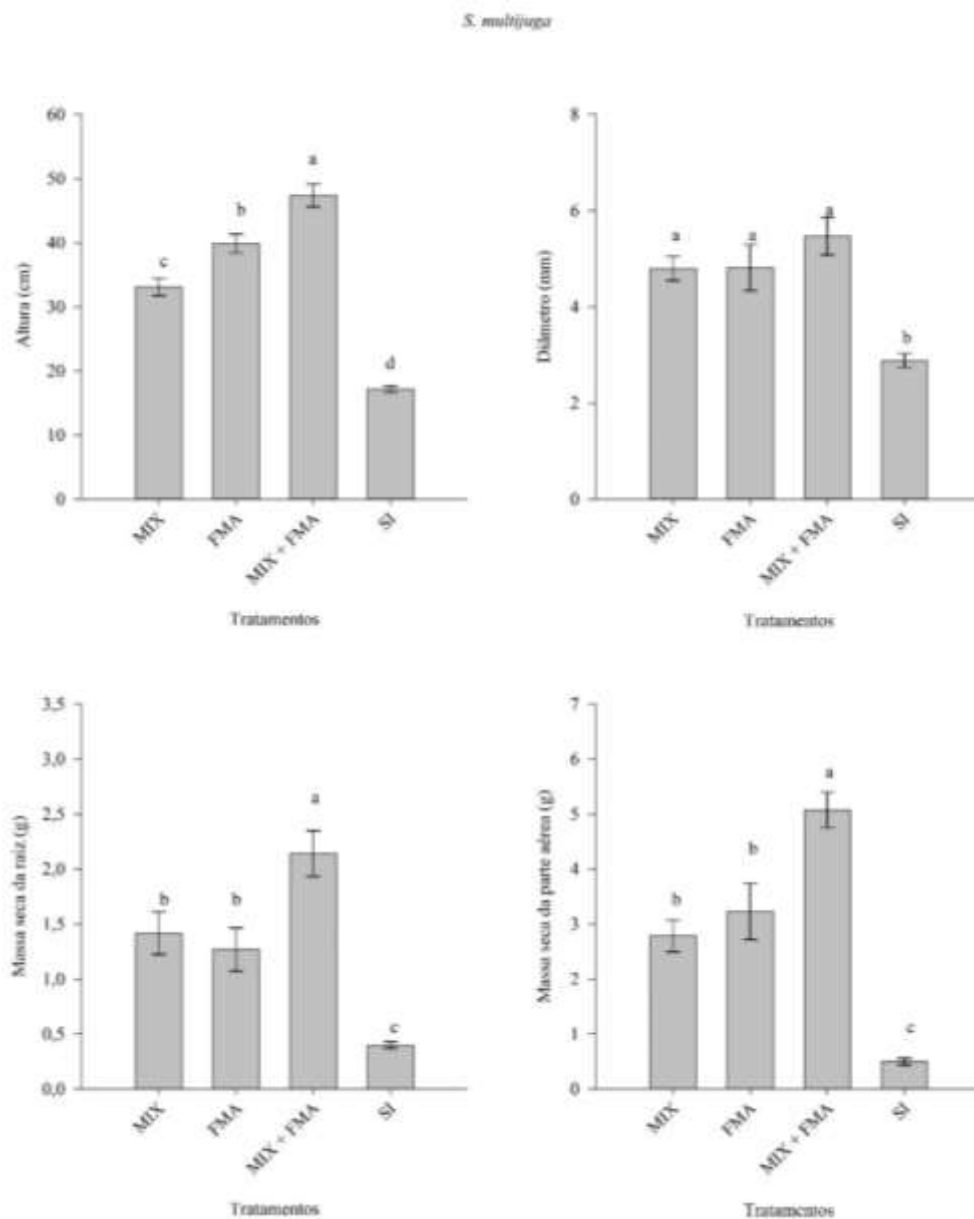


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

As mudas de *S. multijuga* foram beneficiadas por todos os tratamentos de inoculação avaliados em comparação com o tratamento controle SI. O melhor resultado para os parâmetros de crescimento avaliados em *S. multijuga* foi alcançado pelo tratamento de coinoculação MIX+FMA, ou seja, com os quatro microrganismos inoculados (Figura 14), com exceção do diâmetro, no qual todos os tratamentos de inoculação não diferiram entre si e apresentaram um

incremento de 74% em comparação com o controle SI. O tratamento de coinoculação MIX+FMA, apresentou incrementos de 176%, 438% e 920% na altura, MSR e MSPA, respectivamente, em relação ao controle SI.

Figura 14. Altura (CV% = 12,33), diâmetro (CV% = 23,81), massa seca da raiz (CV% = 20,43) e massa seca da parte aérea (CV% = 18,04) das mudas de *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ ).



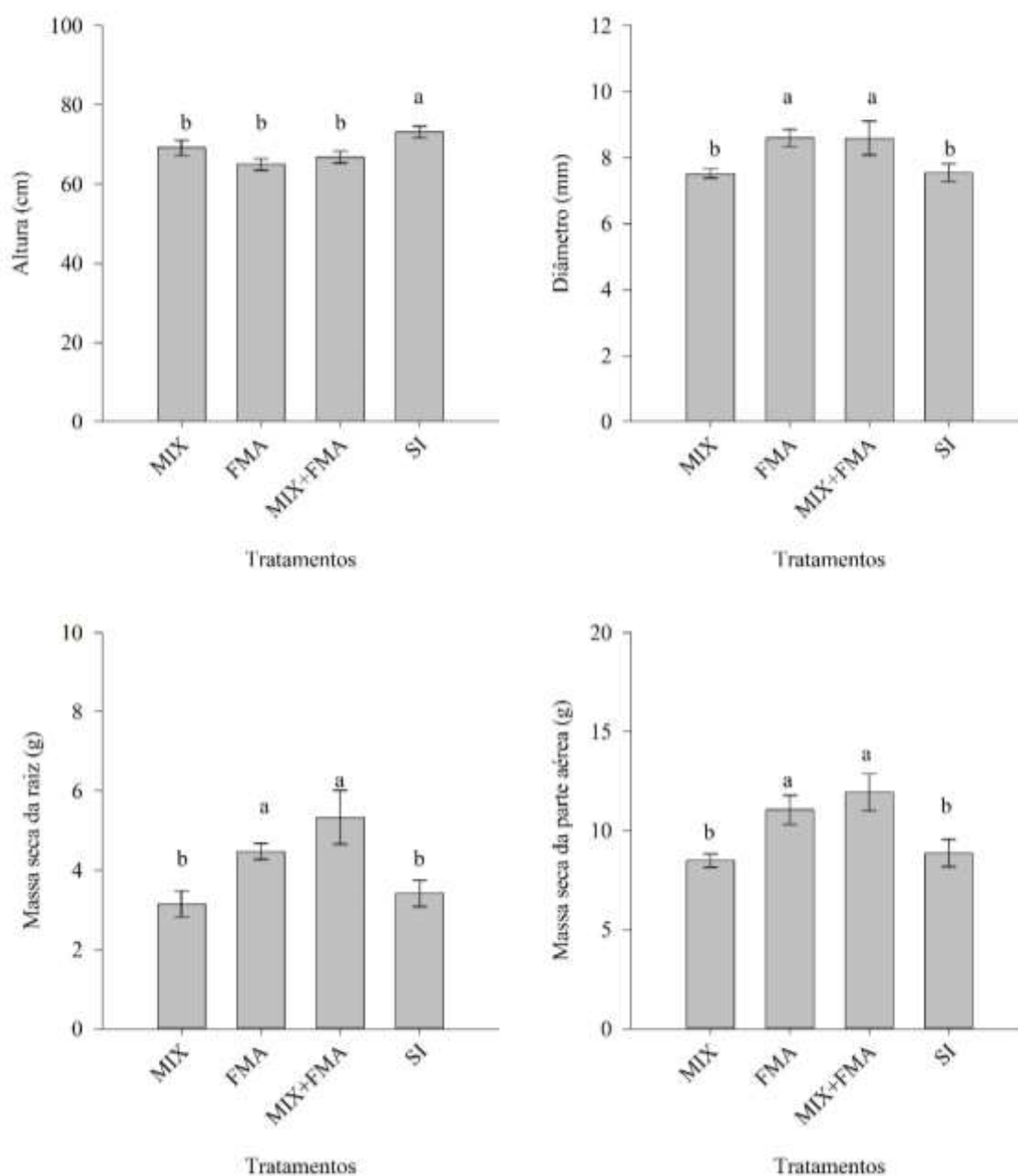
Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em relação à altura, os tratamentos FMA e MIX, em *S. multijuga*, apresentaram incrementos significativos em comparação com o controle SI, com valores de 132 e 93%, respectivamente (Figura 14). Já em relação a MSR e MSPA, os tratamentos de inoculação MIX e FMA não diferiram estatisticamente entre si e, apresentaram incrementos significativos de 505% em relação a MSPA e de 237% na MSR em comparação com o tratamento controle SI.

As mudas de *S. terebinthifolius* foram favorecidas pela inoculação em relação aos parâmetros diâmetro, MSR e MSPA. Na altura, as mudas de *S. terebinthifolius* sem inoculação apresentaram a maior média, com 9% de diferença em comparação com os tratamentos inoculados com MPCV (Figura 15). Já em relação ao diâmetro, MSR e MSPA as mudas de *S. terebinthifolius* inoculadas com os tratamentos FMA e MIX+FMA, apresentaram um incremento de 14%, 9% e 33%, respectivamente, em comparação com os tratamentos MIX e SI.

Figura 15. Altura (CV% = 7,38), diâmetro (CV% = 12,74), massa seca da raiz (CV% = 32,94) e massa seca da parte aérea (CV% = 7,91) das mudas de *S. terebinthifolius* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10).

*S. terebinthifolius*



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

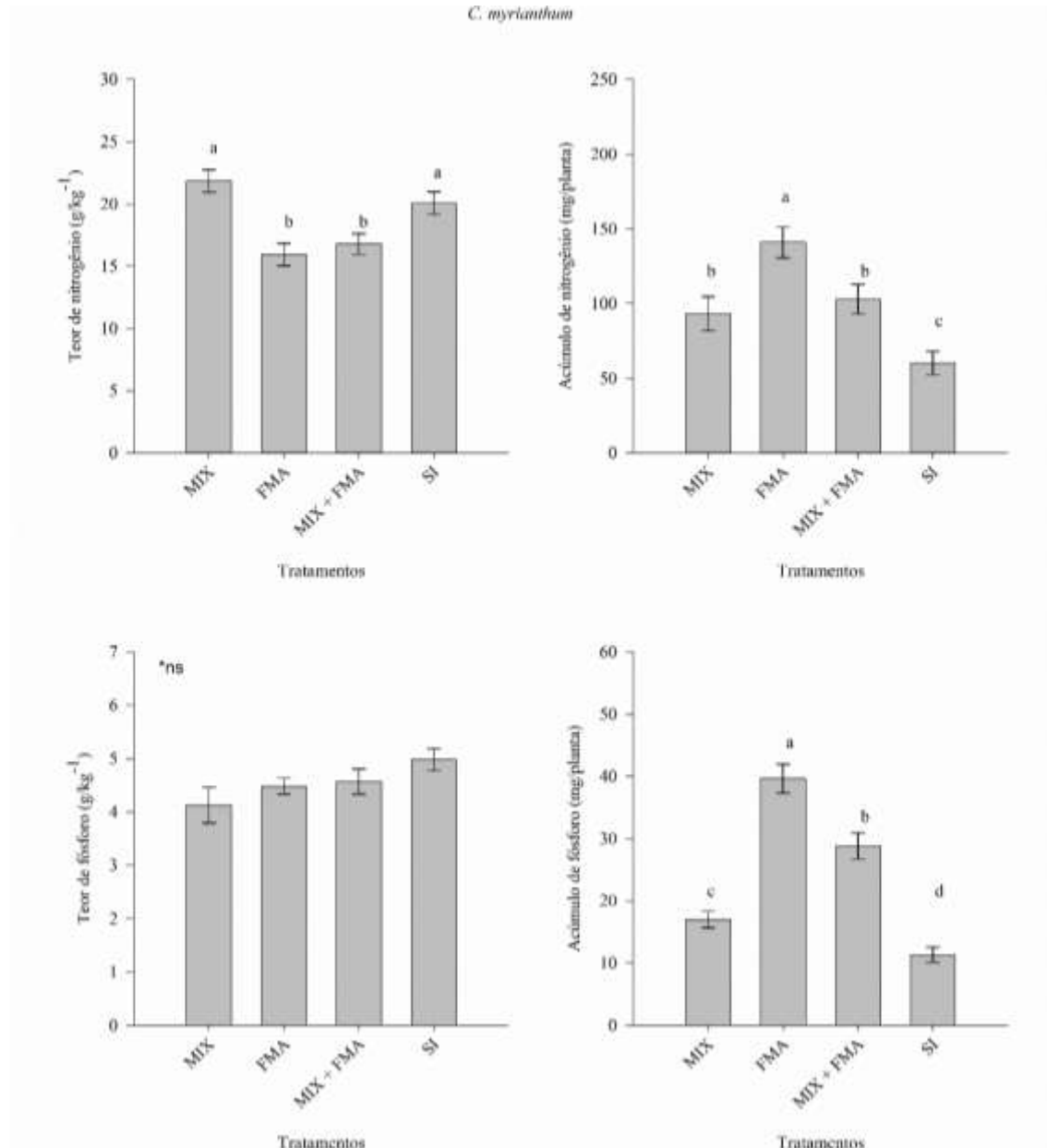


### 6.3.3 Absorção de N e P pelas mudas

Com relação aos parâmetros de nutrição avaliados, as mudas de *C. myrianthum*, *M. scabrella*, *S. terebinthifolius* e *S. multijuga* foram beneficiadas pelos tratamentos de inoculação em condições de viveiro.

O acúmulo de N e P nas mudas de *C. myrianthum* foram favorecidos pelo tratamento de inoculação FMA (Figura 16). Em *C. myrianthum* o incremento no TN pelos tratamentos MIX e do controle SI foi de 31% em relação aos tratamentos FMA e MIX+FMA. O acúmulo de nitrogênio (AN) nas mudas de *C. mirianthum* foi maior no tratamento FMA, com um incremento de 126% em comparação com o tratamento controle SI, seguido pelos tratamentos MIX e MIX+FMA com incremento de 63% no AN. Não foi observada diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos de inoculação e controle nas mudas de *C. myrianthum* em relação ao TP. O tratamento de inoculação com FMA apresentou a melhor média no AP com um incremento de 135% em comparação com o tratamento controle SI, seguido pelo tratamento MIX+FMA com um incremento de 63%. O tratamento MIX não diferiu estatisticamente do controle SI.

Figura 16. Nutrição das mudas de *C. myrianthum* quanto ao teor de nitrogênio (CV% = 14,96) e fósforo (CV% = 16,64) e acúmulo de nitrogênio (CV% = 31,49) e fósforo (CV% = 23,43) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ ). \*ns = estatística não significativa ( $P > 0,05$ ).

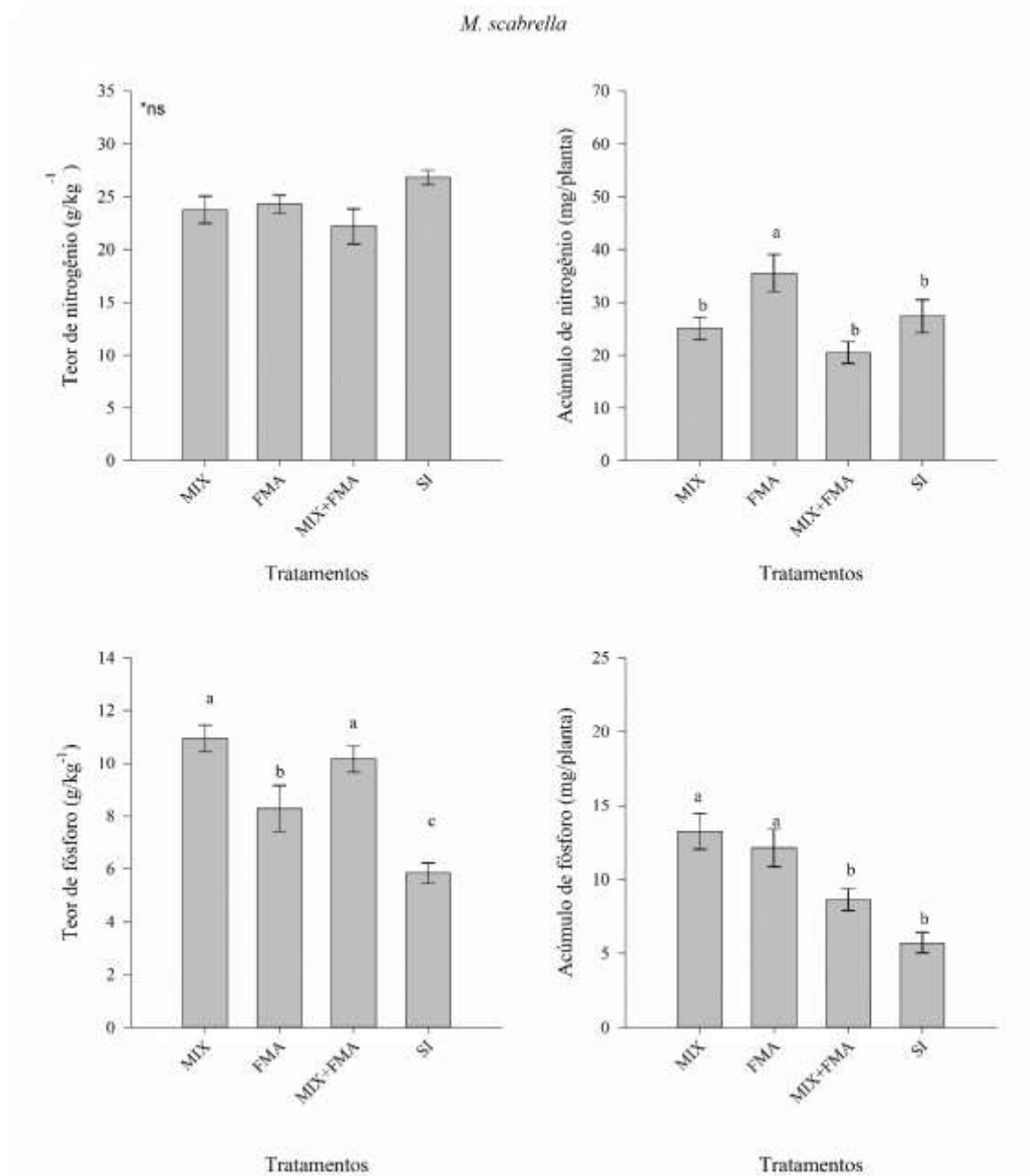


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em *M. scabrella* não houve diferença estatísticas entre o controle SI e os tratamentos inoculados em relação ao TN (Figura 17). No AN, as mudas de *M. scabrella* foram favorecidas pelo tratamento de inoculação FMA, com incrementos de 46% em comparação com o

tratamento controle SI. Os demais tratamentos de inoculação não diferiram estatisticamente do controle SI em relação ao AN. O TP foi maior nas mudas de *M. scabrella* inoculadas com os tratamentos MIX e MIX+FMA, com incremento de 81% em relação ao tratamento controle, seguido pelo tratamento FMA com 42% de incremento. As mudas de *M. scabrella* que apresentaram maior AP foram as inoculadas pelos tratamentos MIX e FMA, com incremento médio de 77% em comparação com as mudas que não receberam inoculação (SI). Já o tratamento MIX+FMA não diferiu do tratamento controle em relação ao AP.

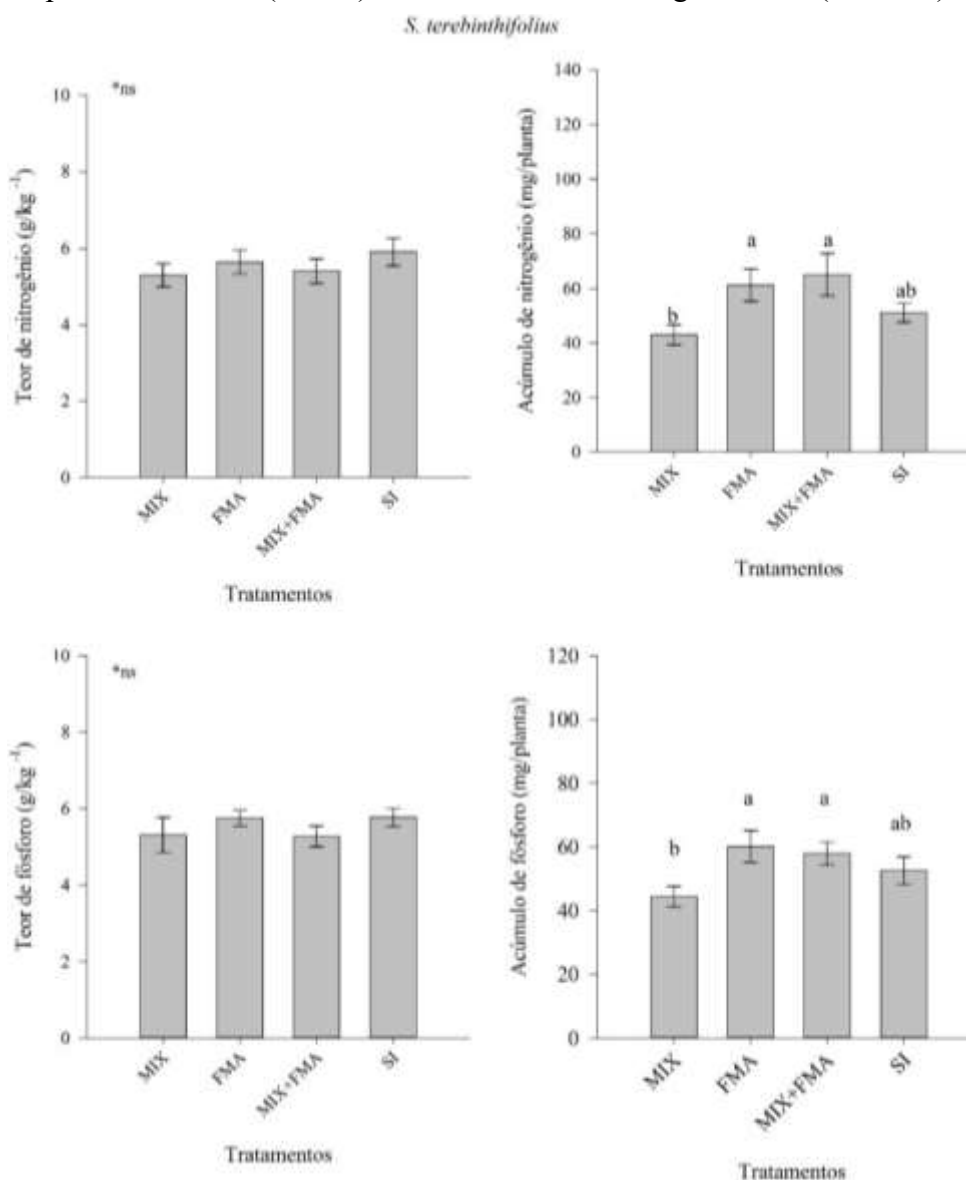
Figura 17. Nutrição das mudas de *M. scabrella* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro quanto ao teor de nitrogênio (CV% = 15,44) e fósforo (CV% = 21,25) e, acúmulo de nitrogênio (CV% = 32,38) e fósforo (CV% = 32,48). MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média ( $n = 10$ ). \*ns = estatística não significativa ( $P > 0,05$ ).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O teor de N e P nas mudas de *S. terebinthifolius* inoculadas com MPCV em condições de viveiro não diferiram significativamente (Figura 18). Já em relação ao acúmulo de N e P nas mudas foi possível observar um padrão, entretanto não foram verificadas diferenças significativas no AN e no AP entre os tratamentos de inoculação e o controle SI.

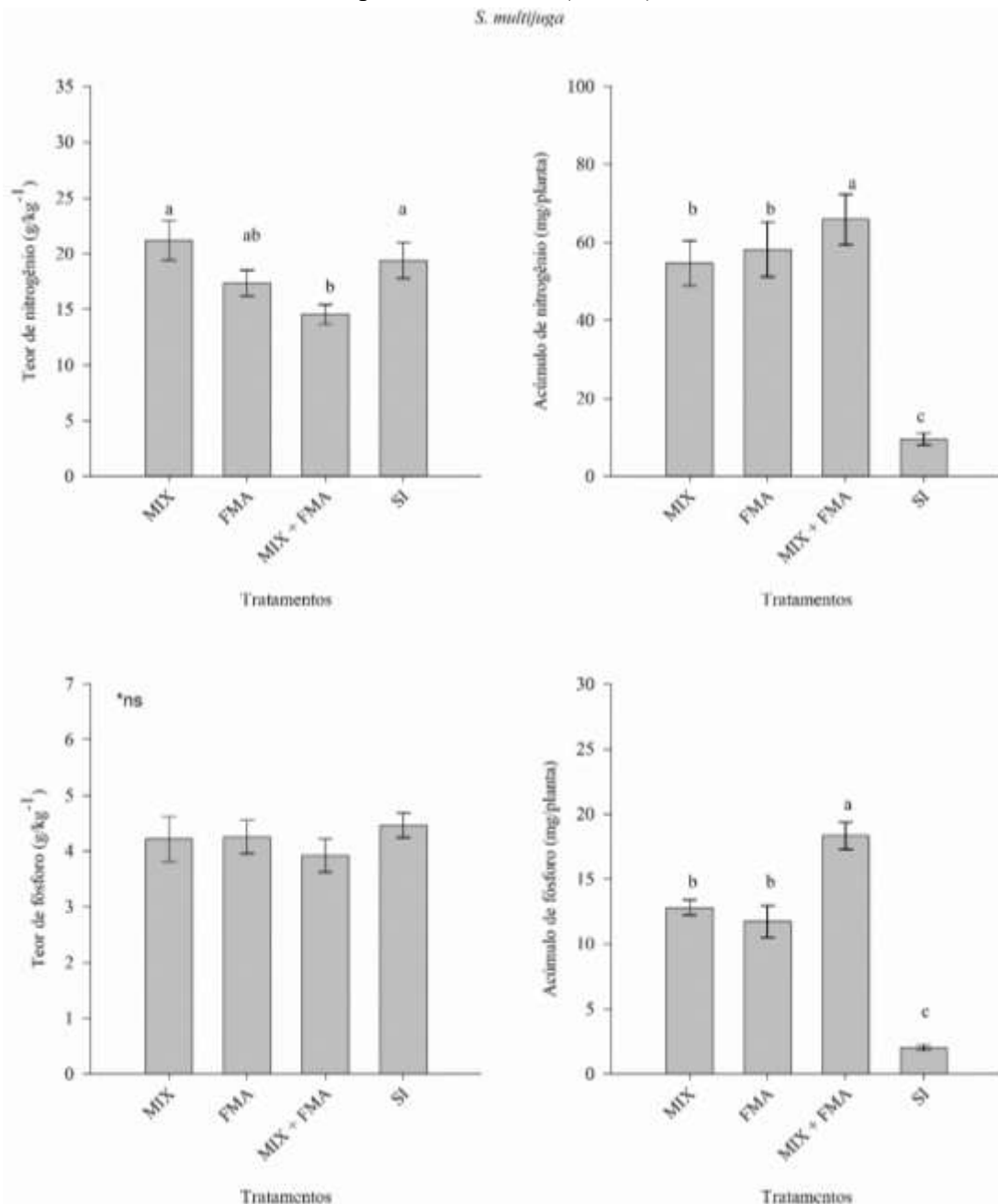
Figura 18. Nutrição das mudas de *S. terebinthifolius* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro quanto ao teor de nitrogênio (CV% = 17,75) e fósforo (CV% = 17,36) e, acúmulo de nitrogênio (CV% = 25,46) e fósforo (CV% = 6,01). MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10). \*ns = estatística não significativa ( $P > 0,05$ ).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O tratamento de inoculação MIX+FMA foi o que mais favoreceu a nutrição das mudas de *S. multijuga* (Figura 19). Com relação ao teor de nitrogênio (TN), nas mudas de *S. multijuga*, foi maior no tratamento MIX e no controle SI que não diferiram estatisticamente entre si e tiveram um incremento de 39% em relação aos demais tratamentos. Já no AN, nas mudas de *S. multijuga* o tratamento de coinoculação MIX+FMA apresentou a maior média de AN com um incremento de 749% em relação ao tratamento controle SI. Os tratamentos MIX e MIX+FMA também tiveram um incremento significativo em relação ao tratamento controle SI de 548%. Em relação ao teor de fósforo (TP) as mudas de *S. multijuga* não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos de inoculação e o tratamento controle SI (Figura 19). O tratamento MIX+FMA foi o que mais influenciou no AP nas mudas de *S. multijuga*, com um incremento de 718% comparado ao tratamento controle SI, seguido pelos tratamentos MIX e FMA com incremento de 415%.

Figura 19. Nutrição das mudas de *S. multijuga* quanto ao teor de nitrogênio (CV% = 24,47) e fósforo (CV% = 23,24) e, acúmulo de nitrogênio (CV% = 16,04) e fósforo (CV% = 11,95) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal após 180 dias de crescimento em viveiro. MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ). Barras verticais representam o erro padrão da média (n = 10).



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

## 6.4 DISCUSSÃO

Estudos com inoculação de microrganismos para a promoção do crescimento vegetal em diferentes espécies vegetais, com o intuito de aplicação na recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão, foram desenvolvidos por alguns autores nesses últimos anos. Desde estudos com rizóbios (MOURA et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2019); com bactérias endofíticas e/ou bactérias rizosféricas (SILVA, 2020; NASCIMENTO; GLICK; ROSSI, 2019; NASCIMENTO et al., 2020) e com FMA (GONZÁLEZ, 2016; STOFFEL et al., 2016). No entanto, até o momento não tem sido avaliado a inoculação e a coinoculação desses microrganismos na promoção do crescimento vegetal na produção de mudas arbóreas em condições de viveiro. Essa etapa é fundamental para que seja avaliado a capacidade de MPCV em promover o crescimento de espécies vegetais em condições não estéreis, e dar subsídio à aplicação de inoculantes microbianos na produção de mudas visando o plantio em áreas degradadas.

A produção de mudas de espécies arbóreas no viveiro muitas vezes requer um tempo relativamente longo, demandando espaço, gastos com fertilizantes e mão de obra. A crescente demanda por mudas nativas visando a revegetação de áreas degradadas requer adoção de novas estratégias para a produção de mudas em viveiro. A inoculação de MPCV pode acelerar o crescimento dessas mudas, reduzir o gasto com insumos químicos, tornando os viveiros mais produtivos e o transplântio das mudas para o campo mais rápido, acelerando assim o início da recuperação das áreas degradadas (PATREZE; CORDEIRO, 2004; PASQUALINI, 2013; RODRIGUES; BARROSO; FIQUEIREDO, 2018, MELO JUNIOR, 2020). Infelizmente a inoculação de MPCV ainda não é uma prática adotada na produção de mudas para a revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão em Santa Catarina.

Os MPCV podem também aumentar a sobrevivência e a adaptação das mudas no campo após o transplântio e favorecer o crescimento em ambientes com estresse ambiental (POUYÚ-ROJAS e SIQUEIRA, 2000; CARNEIRO, SIQUEIRA, DAVIDE, 2004; VANDRESEN et al., 2007; ASLANTAS, ÇAKMAKCI, SAHIN, 2007; MENDES et al., 2013; KONG e GLICK, 2017). Dentre os possíveis mecanismos pelos quais os MPCV podem atuar favorecendo o desenvolvimento das mudas em condições de campo podemos citar a produção de fitohormônios pelas BPCV, como é o caso do AIA, da citotocinina e da giberilina. O AIA produzido por bactérias pode aumentar o número de pelos radiculares, o número de raízes laterais e a superfície total da raiz, aumentando assim a absorção de nutrientes do solo e a



exsudação da raiz (KONG e GLICK, 2017). As citocininas e giberilinas desempenham um importante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal (VETTAKKORUMAKANKAV et al., 1999; FRUGIER et al., 2008; ROMANOV, 2009), sendo que algumas BPCV são capazes de produzir esses fitohormônios (TSAVKELOVA et al., 2006). As citocininas e giberilinas produzidas pelas bactérias podem ajudar as plantas a tolerarem o estresse ambiental, como a falta de água, nessa situação de estresse os níveis desses fitohormônios tendem a sofrer redução na planta, mas a inoculação com BPCV produtoras desses fitohormônios pode favorecer o desenvolvimento das plantas nesse tipo de condição ambiental (ARKHIPOVA et al., 2007). Outro mecanismo pelo qual as BPCV podem favorecer o desenvolvimento vegetal é por meio da produção da enzima ACC desaminase, que podem reduzir os níveis de etileno produzidos pela planta quando em condição de estresse ambiental, por meio da conversão do precursor do etileno em  $\alpha$ -cetobutirato e amônia (GAMELERO e GLICK, 2012; GLICK, 2012). Por meio da solubilização de fosfato, as BPCV podem favorecer o desenvolvimento vegetal em condições de baixa disponibilidade de P No solo, como é a situação dos solos em áreas degradadas. As bactérias utilizadas no presente estudo podem atuar por meio de alguns desses mecanismos citados, pois demonstraram em ensaios *in vitro* possuírem a capacidade de solubilizar fosfato, produzir AIA e/ou ACC desaminase (NASCIMENTO, GLICK, ROSSI, 2019; MOURA et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2020).

Os FMA por sua vez, podem exercer grande influência na adaptação, na sobrevivência e no crescimento das mudas em ambientes degradados que apresentam elevado estresse biótico ou abiótico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Dentre os mecanismos pelos quais os FMA atuam temos o aumento na absorção de nutrientes e água no solo pelas raízes das plantas por meio do micélio extrarradicular, sendo uma associação muito benéfica à planta, especialmente em condições de baixa fertilidade onde há escassez ou baixa disponibilidade de nutrientes (MARSCHNER e DELL, 1994; BAGYARAJ, SHARMA, MAITI, 2015).

De acordo com o Manual de Adubação e calagem para os Estados de SC e RS (2016), o substrato utilizado na produção das mudas no presente estudo apresentou pH baixo nas bandejas e pH médio nos sacos plásticos, enquanto para os demais atributos químicos avaliados não houve diferença significativa entre os substratos, sendo que os valores verificados para fósforo e o potássio são considerados muito alto e valores altos para o cálcio e magnésio. O fósforo em altas concentrações no solo pode reduzir a eficiência da inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato na promoção do crescimento vegetal (NAHAS et

al., 1994; BENTO et al., 2016;), pode também reduzir a eficiência e a dependência micorrízica (CARDOSO et al., 2010; ABREU et al., 2018), enquanto a baixa fertilidade do solo tende a favorecer a simbiose entre o FMA e o hospedeiro (CARDOSO et al., 2010). A faixa de pH do solo tolerável pelos FMA é bastante ampla, variando de 3 a 10 (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), no entanto o valor ideal pode variar para cada espécie. O valor de pH verificado nos substratos utilizados no presente trabalho (5,1 e 5,6) pode possibilitar a formação micorrízica com a espécie de *Rhizophagus intraradices* (MERGULHÃO et al., 2014).

No presente trabalho a colonização micorrízica nas raízes das espécies arbóreas avaliadas foi muito distinta entre as espécies. Em *C. myrianthum* a CM nos tratamentos de inoculação não apresentou diferença significativa entre os tratamentos de inoculação, mas foi maior que o tratamento sem inoculação. Embora no tratamento MIX não tenha sido introduzido o inoculante a base de FMA, a CM não diferiu dos tratamentos de inoculação que receberam o inoculante. Nesse caso é possível que as bactérias promotoras do crescimento vegetal inoculadas tenham atuado em sinergismo com os FMA nativos presentes no solo, favorecendo a CM das raízes. Algumas bactérias presentes na rizosfera podem estimular o crescimento micelial dos FMA, essas bactérias são conhecidas como “mycorrhiza helper bacteria” (MHB) (GARBAYE, 1994). Essas bactérias podem produzir fitohormônios vegetais que influenciam no estabelecimento das micorrizas, esporulação e crescimento das hifas, assim como, podem produzir compostos que estimulam exsudatos radiculares, resultando na ativação das hifas de FMA, aumentando assim a CM (LIES et al., 2018). Dentre os grupos de bactérias estudadas que demonstraram a habilidade de atuarem como MHB quando coinoculadas com FMA, podemos citar os gêneros *Pseudomonas* spp. (DUPONNOIS; PLENCHETTE, 2003; SINGH; SONI; KALRA, 2013), e *Rhizobium* spp. (FESTER; MAIER; STRACK, 1999; BARNAWAL et al., 2014), sendo que no presente trabalho duas das bactérias inoculadas pertenciam a esses gêneros (SC5 e UFSC-B8).

Em *M. scabrella* a inoculação simples de FMA apresentou a maior CM, porém a CM nas raízes em todos os tratamentos avaliados foi baixa. Os resultados obtidos para baixa CM em *M. scabrella* podem estar atrelados à uma maior disponibilidade de P no substrato utilizado ou também é possível que para *M. scabrella* a competição com outros microrganismos autóctones do solo tenha influenciado nos baixos valores de CM observados nessa espécie, assim como, no baixo número de esporos. Corroborando com estes resultados, o estudo realizado por Dalla Costa et al. (2017) foi observado que em mudas de *M. scabrella* inoculadas com diferentes FMA, a eficiência micorrízica diminuiu com o aumento progressivo da

disponibilidade de fósforo no solo. Esses resultados diferem dos resultados verificados por Hentz, da Silva e Júnior (2012) que avaliaram mudas de uma espécie do mesmo gênero (*Mimosa artemisiana*) produzidas em viveiro em diferentes condições de substrato ricos em fósforo, onde observaram que mesmo na presença de altos níveis de fósforo a colonização micorrízica das raízes foi elevada. Patreze e Cordeiro (2004) em estudo com outras leguminosas arbóreas (*Enterolobium contortisiliquum*, *Inga laurina*, *Lonchocarpus muehlbergianus* e *Platypodium elegans*) também em condições de viveiro com solo sem autoclavar, avaliaram a inoculação de FMA, FMA combinados com rizóbios e diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo por um período de 120 dias. Naquele estudo verificou-se maiores valores de CM nas mudas que receberam as maiores dosagens de fósforo. A associação micorrízica arbuscular pode variar de acordo com cada espécie de planta e de FMA, positivamente ou negativamente (SMITH et al., 2011; SMITH; ANDERSON; SMITH, 2018).

Já em *S. multijuga* a CM nas mudas foi igual para todos os tratamentos (50 a 58,7%), indicando que o inoculante comercial a base de FMA não proporcionou aumentos na colonização micorrízica em comparação com as comunidades de FMA presentes no solo do substrato utilizado. Diferentemente do que foi observado no presente estudo, Pouyú-Rojas e Siqueira (2000) avaliaram sete espécies arbóreas em condição de viveiro, entre elas *S. multijuga*, os autores verificaram que a coinoculação de uma mistura de três FMA (*Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita* e *Acaulospora scrobiculata*) mesmo em condições de alta fertilidade do solo proporcionaram elevados valores de CM (70 a 88%) nas mudas de *S. multijuga*. Paron, Siqueira e Curi (1997) também observaram que a CM em mudas de *S. macranthera* foi elevada e favorecida pela adição de P.

Cabe salientar que, diferentemente dos resultados observados para CM em casa de vegetação (Capítulo I), de uma forma geral, a inoculação do FMA proporcionou maiores taxas de CM em condições de viveiro, pelo fato de o tratamento sem autoclavar (SA) ter exibido altas taxas de CM em solo com baixa fertilidade, não é possível atribuir esse aumento na CM apenas a maior disponibilidade de nutrientes no substrato utilizado no viveiro. Ferreira et al. (2020) observaram em experimento em condições controladas com *Rhizophagus clarus*, que a espécie vegetal foi favorecida em solo com maior diversidade microbiana, resultando em maiores valores de CM na planta hospedeira, o mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho.

No presente trabalho os tratamentos que não receberam a inoculação de FMA também apresentaram colonização micorrízica nas raízes, o que era esperado considerando que o solo não foi esterilizado e provavelmente continha FMA autóctones do local de coleta do solo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Patreze e Cordeiro (2004) que em experimento com espécies arbóreas em condições de solo sem autoclavar também observaram colonização em todos os tratamentos, inclusive nos que não haviam recebido a inoculação. Rodrigues, Barroso e Figueiredo (2018) também observaram uma porcentagem de CM de 45% no tratamento que não recebeu a inoculação de *Glomus* sp, mas que continha solo sem autoclavar. González (2016) verificou no tratamento controle sem inoculação, CM acima de 50% em mudas de bracatinga (*M. scabrella*) e de cedro em solo oriundo de área de mineração de carvão sem autoclavar. Segundo Patreze e Cordeiro (2004), esses resultados confirmam que os FMA são parte integrante do sistema radicular de quase todas as plantas nos trópicos, não apenas sob condições naturais, mas também em condições cultivadas.

Em condições de viveiro, o crescimento e a absorção de N e P das mudas de *C. myrianthum* responderam melhor a inoculação do tratamento contendo o FMA e, em seguida pelo tratamento composto por três bactérias promotoras do crescimento vegetal + FMA (MIX+FMA). Resultados distintos ao encontrado neste trabalho foram observados por Pasqualini (2013) em estudo de inoculação e coinoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato com FMA em *C. myrianthum* por um período de 180 dias em condições de solo sem autoclavar. Nesse estudo, o autor não observou diferenças significativas entre os tratamentos com combinações de microrganismos para a maioria dos parâmetros avaliados e nem resposta à inoculação isolada de FMA, sendo que o tratamento controle sem inoculação foi o que apresentou os maiores incrementos na altura e na MSPA das mudas. A combinação de MPCV nem sempre é favorável ao crescimento vegetal. Microrganismos coinoculados podem apresentar efeito sinérgico promovendo o desenvolvimento vegetal (WANG et al., 2016; SREEDHAR; MOHAN, 2016; XIE et al., 2018), entretanto efeitos antagonistas (SVENNINGSEN et al., 2018) ou até mesmo efeitos neutros (TODESCHINI et al., 2018) também podem ser observados de acordo com a combinação dos microrganismos e a espécie vegetal. Isso salienta a importância da realização de estudos com diferentes coinoculações de microrganismos para cada espécie vegetal.

Em *M. scabrella* os tratamentos de inoculação avaliados não foram eficientes em promover o crescimento vegetal em condições de viveiro, sendo observadas diferenças significativas no crescimento das mudas apenas em relação à altura, promovidas pelos tratamentos FMA e MIX, e em relação a nutrição, o tratamento FMA favoreceu o AN e os tratamentos MIX e FMA favoreceram o AP. Ao contrário do que foi observado no presente estudo, Souchie et al., (2005) observaram que a coinoculação de microrganismos (bactérias

solubilizadoras de fosfato (BSF) + FMA + rizóbios) em diferentes espécies arbóreas fixadoras de N, dentre elas *M. caesalpinifolia*, a inoculação de BSF beneficiou o crescimento e a nodulação das mudas, demonstrando que houve algum grau de sinergismo entre as BSF e os rizóbios inoculados. Os autores sugerem que a inoculação de BSF provavelmente tenha melhorado a nutrição das espécies durante a formação das mudas. Entretanto, os autores também observaram efeitos negativos da inoculação de BSF em *Enterolobium contortisiliquum*, pelos resultados observados os autores acreditam que existem combinações de BSF e plantas que não são favoráveis, e/ou a própria competição com outros microrganismos da rizosfera pode ter levado ao resultado observado.

Embora a inoculação de FMA e a coinoculação de MIX+FMA não apresentou diferenças significativas na CM, foram observados efeitos no crescimento das mudas de *S. multijuga* proporcionadas por essa inoculação, sendo que, de forma geral as mudas de *S. multijuga* responderam melhor ao tratamento de coinoculação dos quatro MPCV, como já observado em casa de vegetação (Capítulo I). Efeitos positivos da inoculação de FMA no crescimento e MSPA de mudas de *S. multijuga* também foram observados por Pouyú-Rojas e Siqueira (2000). Já em estudo realizado por Vandresen et al. (2007), verificou-se que em mudas de *Senna macranthera*, mesmo com elevada taxa de colonização micorrízica, a inoculação de FMA não favoreceu a produção de biomassa seca da área foliar e nem favoreceu o crescimento das mudas no viveiro. Os autores atribuíram essa resposta especialmente ao tipo de substrato utilizado, pois, em estudo realizado por Zangaro et al. (2005) com mesmo inóculo, em espécies arbóreas crescidas em solo com baixa disponibilidade de nutrientes, houve resposta à inoculação de FMA e altas taxas de colonização.

No presente trabalho, o tratamento MIX+FMA também proporcionou maior acúmulo de nitrogênio e de fósforo nas mudas de *S. multijuga*. Zhang, Feng e Declerck (2018) verificaram que a frutose exsudada por um FMA estimulou a expressão de genes da fosfatase em uma bactéria solubilizadora de fosfato, e a atividade da fosfatase promoveu a mineralização de fósforo orgânico em fósforo inorgânico, estimulando os processos envolvidos na captação de fósforo pelo FMA. Todas as bactérias avaliadas no presente trabalho demonstraram a capacidade de solubilizar fosfato *in vitro* (UFSC-B8, SC5 e MSR2) (HERNÁNDEZ et al., 2017; NASCIMENTO; GLICK; ROSSI, 2019; NASCIMENTO et al., 2020). Esse pode ser um dos possíveis mecanismos de cooperação entre o FMA e as bactérias solubilizadoras de fosfato, pelo qual a promoção do crescimento vegetal nas mudas de *S. multijuga* foi favorecido.

Souchie et al. (2005) estudaram a coinoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) com FMA em espécies arbóreas, dentre elas *S. terebinthifolius*, os autores não verificaram efeito positivo da coinoculação nas variáveis de crescimento avaliadas em mudas de *S. terebinthifolius*. No presente trabalho a coinoculação apenas das bactérias promotoras do crescimento vegetal (MIX) não apresentou efeitos positivos no crescimento das mudas, mas diferentemente dos resultados observados por Souchie et al. (2005), a coinoculação de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato + FMA proporcionou ganhos no diâmetro e na MSR das mudas de *S. terebinthifolius*, assim como a inoculação apenas de FMA.

Estudos demonstrando efeitos sinérgicos da coinoculação entre o FMA *Rhizophagus intraradices* e bactérias promotoras do crescimento vegetal já foram demonstrados em algumas espécies de interesse comercial, como: em *Poncirus trifoliata* envolvendo a coinoculação com *Paenibacillus mucilaginosus* (WANG et al., 2016), em mudas de morangos com *Rhizophagus intraradices* + *Pseudomonas* sp. (BONA et al., 2014), em tomates híbridos com *Bacillus subtilis* (ZULUETA-RODRÍGUEZ et al., 2020). Nos três estudos citados não apenas houve efeito sinérgico dos microrganismos coinoculados em promover o crescimento vegetal, como também a coinoculação foi muito superior nos parâmetros avaliados do que apenas a inoculação de um microrganismo.

Considerando a dificuldade em estabelecer comunidades vegetais nestas áreas, e especialmente com obtenção de crescimento vegetal desejado para reestabelecimento de processos naturais, estes resultados são muito promissores, com alto potencial para aplicabilidade prática e melhoria das condições ambientais de áreas em processo de recuperação ambiental. Levando em consideração os resultados também obtidos em outros estudos realizados pelo Grupo de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Santa Catarina nas áreas de mineração de carvão em SC (MOURA et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2017; STOFFEL et al., 2016), sugere-se a inclusão nos critérios técnicos, da inoculação de MPCV na produção de mudas arbóreas em viveiro visando a revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão em SC.

## 6.5 CONCLUSÕES

A inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) foi eficiente em promover o crescimento das mudas de *C. myrianthum* e de *S. multijuga* em condições não estéreis de viveiro, sendo que, para *C. myrianthum* o tratamento que recebeu apenas o inoculante a base de *Rhizophagus intraradices* (FMA) foi o mais eficiente e, em *S. multijuga* o tratamento de coinoculação com *Rhizobium* sp. + *Pseudomonas* sp. + *Pantoea* sp. + Inoculante a base de *Rhizophagus intraradices* (MIX+FMA). Em *M. scabrella* e *S. terebinthifolius* os tratamentos de inoculação de MPCV testados não promoveram, de forma geral, ganhos significativos no crescimento das mudas.

A inoculação de MPCV também favoreceu a absorção de nitrogênio e fósforo pelas mudas de *C. myrianthum* (FMA), *S. multijuga* (MIX+FMA) e *M. scabrella* (FMA – NA, MIX+FMA –AP). Para *S. terebinthifolius* não houve influência dos tratamentos de inoculação de MPCV avaliados na nutrição das mudas.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, Gustavo M. et al. Crescimento inicial e absorção de fósforo e nitrogênio de *Enterolobium contortisiliquum* inoculada com fungos micorrízicos arbusculares. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 1, p. 156-164, 2018.
- ASLANTAŞ, R.; ÇAKMAKÇI, R.; ŞAHİN, F. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 111, n. 4, p. 371-377, 2007.
- ARKHIPOVA, T. N. et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. **Plant and Soil**, v. 292, n. 1, p. 305-315, 2007.
- BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, M. P.; MAITI, D. Phosphorus nutrition of crops through arbuscular mycorrhizal fungi. **Current Science**, p. 1288-1293, 2015.
- BARNAWAL, D. et al. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 11, p. 884-894, 2014.
- BASHAN, Y. et al. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. **Journal of environmental management**, v. 102, p. 26-36, 2012.
- BENTO, R. U. et al. Contribuição de bioestimulantes contendo microrganismos rizosféricos na absorção de fósforo pelo milho. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, v. 15, n. 3, p. 572-581, 2016.
- BONA, E. et al. AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. **Mycorrhiza**, v. 25, n. 3, p. 181-193, 2014.
- BRASIL. Critérios para a recuperação ou reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão. Ação Civil Pública nº 93.8000533-4. 2008.
- BRASIL. 12º Relatório de monitoramento dos indicadores ambientais. 2019. Disponível em: <<http://acpcarvao.com.br/login/index.php>> Acesso em: abril de 2021.
- CITADINI-ZANETTE, V. et al. *Mimosa scabrella* Benth. (Fabaceae) enhances the restoration in coal mining areas in the Atlantic rainforest. **Cerne**, v. 23, n. 1, p. 103-114, 2017.
- CAMPOS, M. L. et al. Impactos no solo provocados pela mineração e depósito de rejeitos de carvão mineral. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 2, p. 198-205, 2010.
- CARDOSO, E. J. B. N. et al. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. **Micorrizas**, v. 30, p. 153-214, 2010.



- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; DAVIDE, A. C. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec). **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, p. 119-125, 2004.
- COSTA, S. M. L.; MELLONI, R. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*). **Ciência Florestal**, v. 29, p. 169-180, 2019.
- DALLA COSTA, M. et al. Eficiência simbiótica e teor de nutrientes em bracatinga inoculada com fungos micorrízicos arbusculares. In: IV SIMPÓSIO INTERNACIONAL CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, 2017.
- DOS SANTOS, D. C. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo construído após mineração de carvão e submetido a diferentes coberturas vegetais. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 3, 2008.
- DUPONNOIS, R.; PLENCHETTE, C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of australian acacia species. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 2, p. 85-91, 2003.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, D. A. et al. Soil microbial diversity affects the plant-root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. **Microbial ecology**, p. 1-4, 2020.
- FESTER, T.; MAIER, W.; STRACK, D. Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria. **Mycorrhiza**, v. 8, n. 5, p. 241-246, 1999.
- FRUGIER, F. et al. Cytokinin: secret agent of symbiosis. **Trends in plant science**, v. 13, n. 3, p. 115-120, 2008.
- GARBAYE, Jean. Tansley review no. 76 helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New phytologist**, v. 128, n. 2, p. 197-210, 1994.
- GAMALERO, E.; GLICK, B. R. Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. In: **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**. Springer, New York, NY, 2012. p. 395-412.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.
- GONZÁLEZ R. D. A. **Fungos micorrízicos arbusculares e biocarvão no crescimento de mudas de bracatinga (*Mimosa scabrella*) e cedro (*Cedrela fissilis*) em solo de áreas de mineração de carvão**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

HENTZ, A. de M.; DA SILVA, E. M. R.; JÚNIOR, O. J. S. Dependência micorrízica da leguminosa *Mimosa artemisiana* Heringer & Paula. **Revista Agroecossistemas**, v. 4, n. 2, p. 67-78, 2012.

HERNÁNDEZ, A. G. et al. Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 7, p. 991-1001, 2017.

HERNÁNDEZ, A. G. et al. *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* strains obtained from coal-mining areas nodulate and promote the growth of *Calopogonium muconoides* plants used in the reclamation of degraded areas. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 2, p. 523-533, 2019.

KONG, Z.; GLICK, B. R. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. **Advances in microbial physiology**, v. 71, p. 97-132, 2017.

LIES, Adrien et al. Using mycorrhiza helper microorganisms (MHM) to improve the mycorrhizal efficiency on plant growth. In: **Role of rhizospheric microbes in soil**. Springer, Singapore, 2018. p. 277-298.

**Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2016. 394p.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and soil**, v. 159, n. 1, p. 89-102, 1994.

MELO JÚNIOR, J. A. G. de. **A inoculação com microrganismos afeta positivamente a arquitetura do sistema radicular e o acúmulo de nutrientes em mudas de *Euterpe oleracea* (Mart.)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Agronomia, Universidade Federal Rural Amazônia, Belém, 2020.

MENDES, M. M. C. et al. Crescimento e sobrevivência de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) inoculadas com micro-organismos simbiotes em condições de campo. **Ciência Florestal**, v. 23, p. 309-320, 2013.

MERGULHÃO, A. C. do E. S. et al. Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, p. 393-400, 2014.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2nd edition. Lavras: UFLA, 2006.

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

NAHAS, E.; FORNASIERI, D. J.; ASSIS, L. C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, v. 51, p. 463-469, 1994.

NASCIMENTO, F. X.; GLICK, B. R.; ROSSI, M. J. Isolation and characterization of novel soil-and plant-associated bacteria with multiple phytohormone-degrading activities using a targeted methodology. **Access Microbiology**, v. 1, n. 7, p. e000053, 2019.

NASCIMENTO, F. X. et al. The extreme plant-growth-promoting properties of *Pantoea phytobeneficialis* MSR2 revealed by functional and genomic analysis. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1341-1355, 2020.

PARON, M. E.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N. Fungo micorrízico, fósforo e nitrogênio no crescimento inicial da trema e do fedegoso. **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 21, n. 4, p. 567-574, 1997.

PASQUALINI, D. **Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias solubilizadoras de fosfato como alternativas para agricultura familiar e recomposição florística**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências do Solo), Universidade Estadual de Santa Catarina, Lages, 2013.

PATREZE, C. M.; CORDEIRO, L. Nitrogen-fixing and vesicular–arbuscular mycorrhizal symbioses in some tropical legume trees of tribe Mimoseae. **Forest Ecology and Management**, v. 196, n. 2-3, p. 275-285, 2004.

POUYÚ-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 103-114, 2000.

ROCHA-NICOLEITE, E.; OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C. Degradation by coal mining should be priority in restoration planning. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 15, n. 3, p. 202-205, 2017.

ROCHA-NICOLEITE, E. et al. Forest restoration after severe degradation by coal mining: lessons from the first years of monitoring. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 653-664, 2018.

RODRIGUES, L. A.; BARROSO, D. G.; FIQUEIREDO, F. A. M. M. Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e na nutrição mineral de mudas de *Tectona grandis* LF. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 25-34, 2018.

ROMANOV, G. A. How do cytokinins affect the cell? **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, n. 2, p. 268-290, 2009.

SCHIAVO, J. A.; MARTINS, M. A. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 173-178, 2003.

SILVA, E. P. da. **Caracterização de bactérias endofíticas da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e potencial aplicação em áreas de mineração de carvão em recuperação**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências) – Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

SINGH, R.; SONI, S. K.; KALRA, A. Synergy between *Glomus fasciculatum* and a beneficial *Pseudomonas* in reducing root diseases and improving yield and forskolin content in *Coleus forskohlii* Briq. under organic field conditions. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 1, p. 35-44, 2013.

SMITH, S. E. et al. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. **Plant physiology**, v. 156, n. 3, p. 1050-1057, 2011.

SMITH, S. E.; ANDERSON, I. C.; SMITH, F. A. Mycorrhizal associations and phosphorus acquisition: from cells to ecosystems. **Annual Plant Reviews online**, p. 409-439, 2018.

SOUCHIE, E. L. et al. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, v. 35, n. 2, 2005.

SREEDHAR, S. S.; MOHAN, V. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as bio-fertilizers on growth enhancement of economically important native tree species, *Neolamarckia cadamba* seedlings. *Kavaka*, v. 47, p. 125-133, 2016.

STOFFEL, S. C. G. et al. Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em substrato contendo rejeito de mineração de carvão. **Cerne**, v. 22, n. 2, p. 181-188, 2016.

STUMPF, L. et al. Condição física e desenvolvimento radicular de gramíneas em solo construído após mineração de carvão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1078-1087, 2016.

SVENNINGSEN, N. B. et al. Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. **The ISME journal**, v. 12, n. 5, p. 1296-1307, 2018.

SYSTAT SOFTWARE INC. SigmaPlot (r)-Scientific Data Analysis and Graphing Software. 2008.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. *Boletim técnico*, 5.

TODESCHINI, V. et al. Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatiles. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1611, 2018.

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

VALDENEGRO, M.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R. Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid mediterranean area. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 2, p. 233-240, 2001.

VANDRESEN, J. et al. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação na formação e pós-transplante de mudas de cinco espécies arbóreas nativas do sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 753-765, 2007.

VETTAKKORUMAKANKAV, N. N. et al. A crucial role for gibberellins in stress protection of plants. **Plant and cell physiology**, v. 40, n. 5, p. 542-548, 1999.

XIE, Long et al. Species-specific synergistic effects of two plant growth—promoting microbes on green roof plant biomass and photosynthetic efficiency. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0209432, 2018.

ZANGARO, Waldemar et al. Relationships among arbuscular mycorrhizas, root morphology and seedling growth of tropical native woody species in southern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, p. 529-540, 2005.

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

ZULUETA-RODRÍGUEZ et al. Efectos de la co-inoculación de *Bacillus subtilis* y *Rhizoglossum intraradices* en la producción de jitomate (*Solanum lycopersicon* L.) en un sistema semi-hidropónico. **Revista Bio Ciencias**, v. 7, p. 17, 2020.

YU, Xuan et al. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 112-117, 2012.

WANG, P. et al. Effects of combined inoculation with *Rhizophagus intraradices* and *Paenibacillus mucilaginosus* on plant growth, root morphology, and physiological status of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under different levels of phosphorus. **Scientia horticulturae**, v. 205, p. 97-105, 2016.

WANG, Z. et al. Effects of phosphate-solubilizing bacteria and N<sub>2</sub>-fixing bacteria on nutrient uptake, plant growth, and bioactive compound accumulation in *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. **Forests**, v. 10, n. 9, p. 772, 2019.

## 7. CAPÍTULO III

Revegetação com espécies arbóreas coinoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal e atributos microbiológicos em solo construído sob Área de Preservação Permanente degradada pela mineração de carvão

### RESUMO

Um dos procedimentos adotados na recuperação das áreas degradadas pela mineração de carvão em Santa Catarina é a construção do solo. Embora a construção do solo seja necessária nessas áreas, as condições físicas, químicas e biológicas do solo de áreas de empréstimo utilizado para a recomposição topográfica são muito distintas das condições originais. Dessa forma, a escolha das espécies utilizadas na revegetação merece atenção especial, a fim de garantir que a vegetação consiga se estabelecer adequadamente e melhorar a qualidade do solo. Dentre as espécies arbóreas com potencial de uso na recuperação de áreas degradadas estão a tucaneira (*Citharexylum myrianthum* Cham.) e o pau-cigarra (*Senna multijuga* (Rich.) Irwin & Barneby). O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de crescimento e sobrevivência das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV), bem como os atributos microbiológicos em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação como indicadores da recuperação das áreas impactadas pela atividade. Para tanto, foram implantados ensaios independentes para cada espécie em delineamento em blocos casualizados. Os tratamentos consistiram em: mudas inoculadas com inoculante comercial a base de fungo micorrízico arbuscular (FMA) (*Rhizophagus intraradices*), mudas coinoculadas com as bactérias (*Pseudomonas thivervalensis* (E1), *Pantoea phytobeneficialis* (E2) e *Rhizobium* sp. (R)) – MIX, mudas coinoculadas com MIX + FMA, e um tratamento controle com as mudas sem inoculação (SI). As mudas utilizadas nesse experimento foram inoculadas e produzidas previamente em condições de viveiro e, posteriormente transplantadas para campo. Foram realizadas avaliações de crescimento das mudas no início do experimento – zero e 300 dias após o transplante (DAT) e taxa de mortalidade após 300 DAT. Adicionalmente foi realizada a avaliação dos atributos químicos do solo (Carbono Orgânico Total – COT, pH e fósforo) e dos atributos microbiológicos (atividade das enzimas  $\beta$ -glucosidase, arilsulfatase, fosfatase ácida e hidrólise do diacetato de fluoresceína -DAF-, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico) em três tempos distintos: 0 DAT, 300 DAT e 420 DAT. Com o intuito de avaliar a evolução dos atributos microbiológicos do solo nas áreas em processo de revegetação foram realizadas amostragens em áreas de preservação permanente (APP) sem histórico de impacto da atividade de mineração (APP – Remanescente florestal) e uma APP em estágio de recuperação avançado (APP- ERA). Os tratamentos de inoculação FMA e MIX+FMA diminuíram a taxa de mortalidade das mudas de *S. multijuga*. A coinoculação de MIX+FMA influenciou positivamente e, em um curto espaço de tempo, na biomassa microbiana do solo com plantio das espécies arbóreas avaliadas no presente estudo. A atividade enzimática da arilsulfatase, DAF, fosfatase e a biomassa microbiana do solo demonstraram potencial para serem utilizadas nas avaliações de monitoramento de áreas degradadas pela mineração de carvão em processo de recuperação, uma vez que não atingiram os valores verificados nas áreas referências e apresentaram incrementos significativos ao longo do tempo de avaliação.

Palavras-chave: Revegetação. Coinoculação. Espécies Pioneiras. Atributos microbiológicos.

## 7.1 INTRODUÇÃO

A extração de carvão mineral a céu aberto em Santa Catarina causou um impacto ambiental de aproximadamente seis mil e quinhentos hectares de solos degradados (ROCHA-NICOLEITE; OVERBECK; MÜLLER, 2017). Grande parte das áreas afetadas são constituídas por áreas de preservação permanente (APP), como é o caso das áreas de mata ciliar, onde a revegetação é feita por meio do plantio de mudas de espécies arbóreas, visando a formação de uma camada vegetal (BRASIL, 2019). O crescimento e estabelecimento de espécies arbóreas influenciam positivamente a regeneração natural, sendo fundamentais nesse processo (ROCHA-NICOLEITE et al., 2018).

A literatura tem demonstrado por meio de alguns estudos que a inoculação de MPCV agregam benefícios no desenvolvimento das espécies vegetais e apresentam potencial de aplicação em área degradadas por mineração (MOURA et al., 2016; STOFFEL et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2017; HERNÁNDEZ et al., 2019; MAIA, 2019; SILVA et al., 2020).

Os MPCV podem atuar no crescimento das espécies vegetais por mecanismos diretos ou indiretos seja na produção de fitohormônios, na solubilização de fosfatos, na disponibilização e captação de nutrientes essenciais e/ou baixa mobilidade no solo, maior resistência a condições de estresse ambiental, proteção contra fitopatógenos, entre tantos outros benefícios (BASHAN; HERNANDEZ; BASHAN, 2012; ABHILASH et al., 2016; BAKHSHANDEH et al., 2020; LI et al., 2019). A aplicação conjunta, ou seja, a coinoculação de dois ou mais MPCV, podem potencializar o desenvolvimento das espécies vegetais atuando de forma sinérgica (THOMLOUDI et al., 2019).

As vantagens da aplicação de MPCV podem levar a redução do uso de fertilizantes químicos (ADESEMOYE; TORBERT; KLOEPPER, 2009; ALOO; MAKUMBA; MBEGA, 2019), aumentando o crescimento e desenvolvimento das mudas, a fim de antecipar o transplante das mudas para o campo e aumentar as chances de sobrevivência no viveiro e no transplantio (MIRANDA; MIRANDA, 2001; BAGYARAJ, 2014). Devido ao fato, são uma importante ferramenta a ser explorada para acelerar e melhorar a recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão em SC. Entretanto, poucos são os estudos com coinoculação de MPCV em espécies arbóreas, e destes, em sua maioria são de interesse frutícola (SANTOS et al., 2018; COSTA; MELLONI, 2019; ZOUGARI-ELWEDI et al., 2019) ou madeireiro (PROBANZA et al., 2001; LIMA, 2018; ALEXANDRE et al., 2021).

As espécies arbóreas *Citharexylum myrianthum* e *Senna multijuga* apresentam grande potencial de aplicação em áreas degradadas (LORENZI et al., 2016; ZANON et al., 2021). As duas espécies citadas são pioneiras na sucessão ecológica, ou seja, são as primeiras a ocuparem um ambiente que sofreu alguma perturbação, e por isso essas espécies possuem boa adaptabilidade em solos com baixa fertilidade e alta luminosidade (LORENZI, 2016). *C. myrianthum* e *S. multijuga* também possuem outros atributos importantes do ponto de vista ecológico, como a produção de frutos por *C. myrianthum*, muito apreciados pela avifauna, e grande produção de flores por *S. multijuga*, atraindo várias espécies de insetos polinizadores e, consequentemente pássaros. *C. myrianthum* e *S. multijuga* também podem se associar com MPCV. Entretanto, até o presente momento, a prática de inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) não tem sido adotada na produção das mudas arbóreas usadas na revegetação das áreas degradadas pela mineração de carvão em SC.

A microbiota do solo exerce papéis importantíssimos no solo, dentre eles, nos ciclos biogeoquímicos, por meio da decomposição e mineralização de materiais orgânicos, mantendo assim os processos ecológicos no ecossistema (BARDGETT; van der PUTTEN, 2014; DELGADO-BAQUERIZO et al., 2018). Pela importância desempenhada pelos microrganismos no solo, os atributos microbiológicos são indicadores sensíveis para a determinação da qualidade do solo. Vários estudos têm demonstrado que os atributos microbiológicos do solo são bons bioindicadores da qualidade do solo em áreas agrícolas (SILVA et al., 2012; RAIESI; SALEK-GILANI, 2018), em plantios de espécies florestais madeireiras (PRIMIERY; MUNIZ; LISBOA, 2017; CANEI et al., 2018), em áreas contaminadas por metais pesados (SANTOS et al., 2016), em áreas degradadas por mineração de ferro (SILVA et al., 2018), mineração de cassiterita (YADA et al., 2015), mineração de carvão (SILVA et al., 2019), entre tantos outros estudos em áreas com diferentes usos. Entretanto, nas áreas de mineração de carvão em SC ainda são considerados apenas os atributos químicos e físicos no monitoramento da recuperação dessas áreas. Por isso, se fazem necessários maiores estudos a fim de dar suporte para a inclusão desses atributos microbiológicos na análise de recuperação dessas áreas.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMPB) da Universidade Federal de Santa Catarina vem realizando estudos ao longo de aproximadamente uma década nas áreas de mineração de carvão em Santa Catarina. Os estudos envolvem etapas de isolamento, caracterização, ensaios de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, ensaios em condições controlados com microrganismos provenientes de áreas de



mineração de carvão principalmente, ou de outros locais, com o intuito de selecionar microrganismos com potencial de aplicação na recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão. Dessa forma, este trabalho procurou responder as seguintes questões: a inoculação favorece o crescimento e a sobrevivência das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* após o transplântio para área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação? A inoculação de MPCV influencia os atributos microbiológicos do solo ao longo do tempo?

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Área de estudo

Com o intuito de avaliar os efeitos da coinoculação de microrganismos promotores do crescimento em espécies arbóreas nativas em uma área de mineração em processo inicial de recuperação, foram instalados experimentos a campo independentes para cada uma das espécies: *C. myrianthum* e *S. multijuga*. Os ensaios foram conduzidos no município de Treviso – Área III/Rio Pio em área de preservação permanente (APP), sendo uma área de mata ciliar. Os experimentos foram implantados no início do mês de agosto em 2019. Os ensaios foram realizados em parceria com a Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM) e da empresa Colombo Retroterra Ltda (responsáveis pela execução do PRAD – Plano de Recuperação de Áreas Degradadas), cujas atividades experimentais foram autorizadas pelo Ministério Público Federal, conforme Ata de Reunião realizada em 26 de junho de 2018 (Anexo A).

A Área III - Rio Pio está localizada no município de Treviso, sendo abrangida pela Bacia Hidrográfica de Araranguá, mais precisamente na sub-bacia do Rio Mãe Luzia e Rio Pio. O clima no município em Treviso, segundo Köppen, é classificado como Mesotérmico do tipo temperado. O município apresenta uma temperatura média anual de 19,3 °C, e uma precipitação média anual de 1.660 mm. A Área III – Rio Pio possui 117,79 ha de passivos ambientais que foram gerados pela mineração de carvão a céu aberto. As áreas de APP localizadas dentro da Área III –Rio Pio passaram por reconstrução do solo em agosto de 2018 seguindo os critérios técnicos para recuperação ou reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão (BRASIL, 2008) (Figura 20).

Figura 20. Esquema representativo de como é realizada a construção do solo em Áreas de Preservação Permanente (APPs) nos locais onde houve degradação do solo ocasionada pela mineração de carvão em Santa Catarina segundo os critérios técnicos estabelecidos pelo Grupo Técnico de Assessoramento (GTA).



Fonte: Adaptado de Brasil (2008).

Na tabela 7 é possível observar os insumos que foram aplicados no solo construído. Após a construção do solo, como previsto no PRAD foi realizada a semeadura de um consórcio de espécies herbáceas hibernais: *Avena sativa* (27,78 kg/ha), *Lolium multiflorum* (12,82 kg/ha), *Paspalum sauriae* (5,00 kg/ha), *Raphanus sativus* (10,00 kg/ha), *Stylosanthes guianensis* (1,54 kg/ha) e *Trifolium repens* (2 kg/ha), e consórcio de espécies estivais: *Andropogon gayanus* (2,5 kg/ha), *Neonotonia wightii* (5,00 kg/ha) e *Paspalum atratum* (4,63 kg/ha), com o intuito de promover a cobertura do solo e minimizar processos erosivos para posterior plantio das mudas de espécies arbóreas.

Tabela 7. Quantitativos de insumos aplicados à Área III (Rio Pio) por hectare.

Insumo	Unidade	Quantidade (ha)
Calcário (PRNT 100%)	t/ha	29,00
Cama de aviário	m <sup>3</sup> /ha	51,74
N – P – K (3-27-16,5)	t/ha	0,666
Ureia cobertura/44,5%	t/ha	0,400
Turfa	t/ha	150,00

Fonte: PRAD Área III – Rio Pio (2011).

As espécies herbáceas que se mantiveram presentes com maior predominância na área durante os tempos de avaliações realizados estão representadas na figura abaixo (Figura 21).

Figura 21. Espécies herbáceas mais observadas na área experimental durante o período de avaliação de agosto de 2019 a outubro de 2020. APP- Área III/Rio Pio, Treviso, SC.

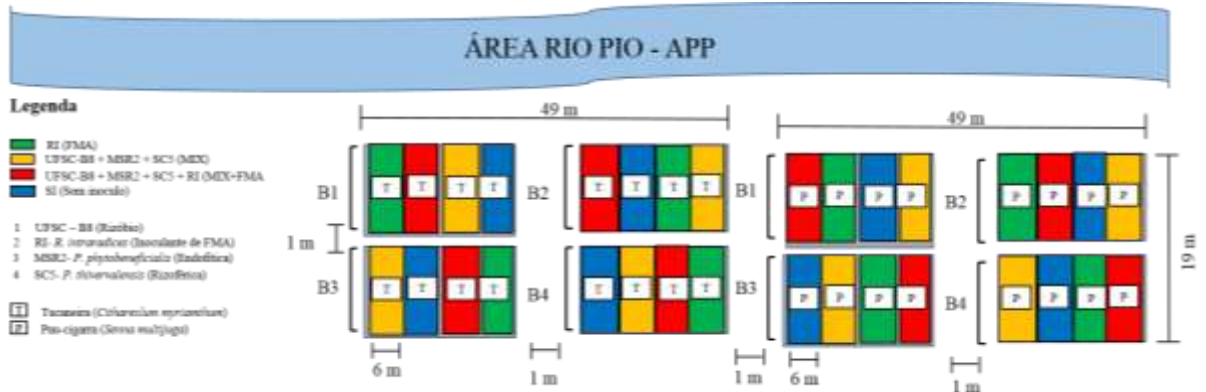


Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho (2021).

### 7.2.2 Delineamento experimental

Os experimentos implantados à campo consistiram em um delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos para cada uma das espécies. Os tratamentos foram: MIX (as três bactérias promotoras do crescimento vegetal – UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.), MSR2 (*Pantoea* sp.) e SC5 (*Pseudomonas* sp.)); FMA (inoculante comercial a base de fungo micorrízico arbuscular *Rizhophagus intraradices* – Rootella BR), MIX+FMA (*Rhizobium* sp. + *Pantoea* sp. + *Pseudomonas* sp. + *Rizhophagus intraradices*); e tratamento controle sem inoculação (SI). Foram utilizadas 15 plantas por parcela, sendo quatro blocos, totalizando 60 plantas por tratamento. Ao total, foram utilizadas 240 unidades amostrais para cada espécie, (2 espécies = 480 mudas ao total) (Figura 22).

Figura 22. Croqui do delineamento em blocos casualizados do experimento a campo com introdução de mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em uma APP – Área III/Rio Pio, Treviso-SC.

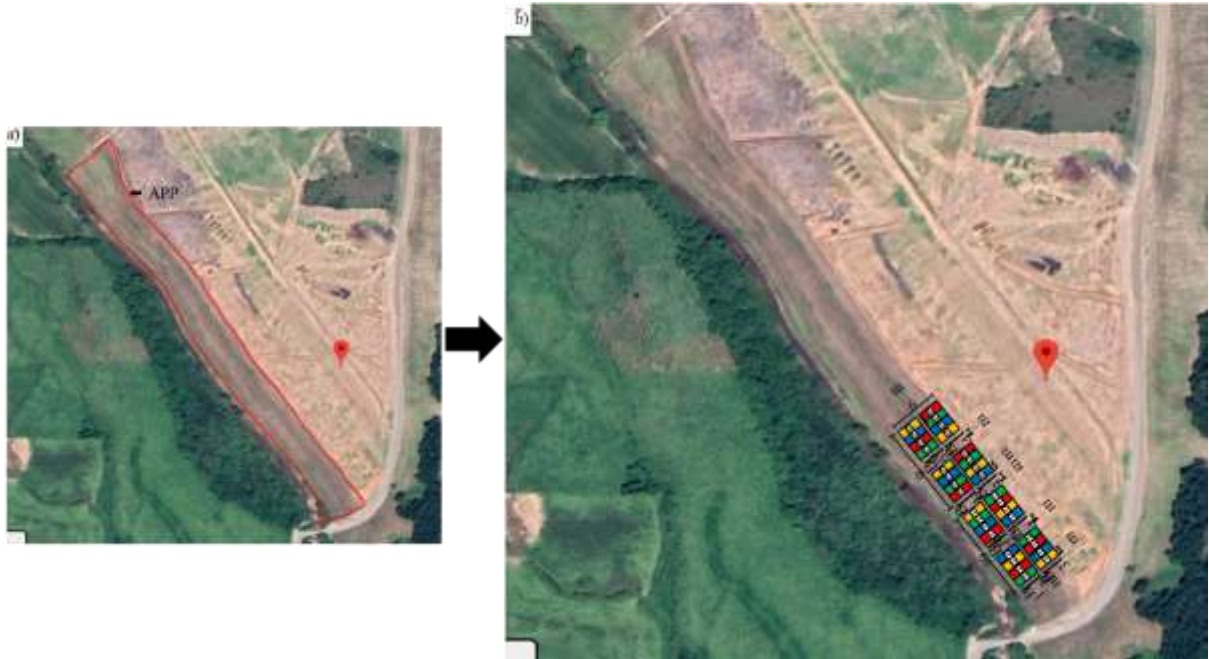


Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho (2021).

As mudas foram levadas para o campo após 180 dias de crescimento em viveiro onde receberam a inoculação, como descrito anteriormente no Capítulo II. Antes de serem transferidas para o campo, todas as mudas foram identificadas com placa de alumínio, e posteriormente avaliadas em relação à altura e ao diâmetro do colo.

O preparo das covas para plantio das mudas foi realizado com o uso de um perfurador de solo Branco BPS-52 2.0 HP com broca de 15 cm de diâmetro. As covas ficaram com uma profundidade de 40 cm por 17 cm de diâmetro. O espaçamento entre as mudas foi de 2 m x 2 m. Na Figura 23 é possível ver uma imagem da área onde foram montados os ensaios com a representação gráfica da distribuição dos blocos na área.

Figura 23. Área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação – Área III/Rio Pio, Treviso-SC. a) A linha vermelha representa a delimitação da área de APP onde o experimento com mudas de espécies arbóreas pioneiras inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal foi instalado. B) Representação gráfica do delineamento em blocos casualizados dos ensaios com mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga*. Coordenadas: 28°31'54.1" S e 49°27'45.8" W.

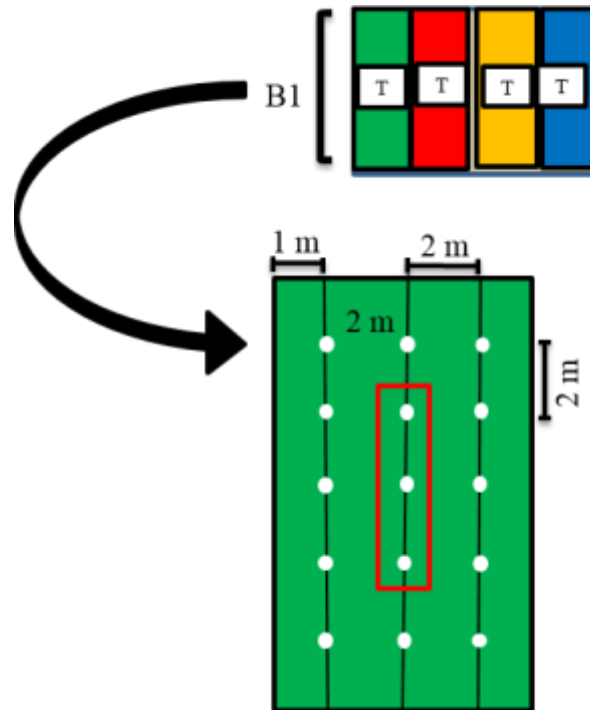


Fonte: Adaptada de Google Earth (2019).

### 7.2.3 Avaliações das mudas no campo

As mudas foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros de crescimento: altura e diâmetro do coleto em dois tempos distintos – zero dias após o plantio (DAP) no momento que foram transplantadas para o campo e 300 DAP. As avaliações foram realizadas nas mudas centrais a cada parcela, como é possível observar na Figura 24.

Figura 24. Representação esquemática da distribuição das mudas (pontos brancos) nas respectivas parcelas do experimento a campo. As avaliações foram realizadas nas mudas centrais de cada parcela (retângulo vermelho).



Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho (2019).

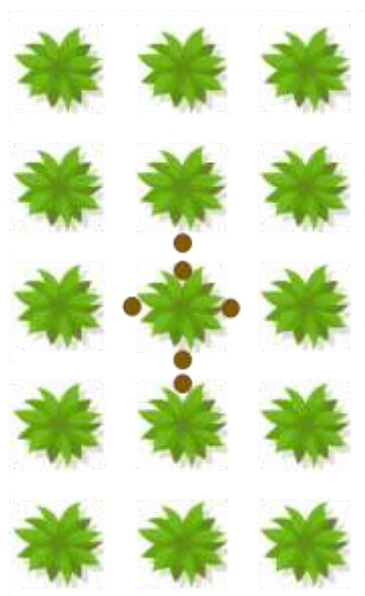
A taxa de mortalidade das mudas no campo foi realizada de acordo com Brancalion et al. (2015), por meio da proporção de plantas mortas presentes nas parcelas aos 300 DAP. A taxa de mortalidade foi calculada considerando as mudas totais (número total de mudas mortas de cada tratamento aos 300 DAP\*100/número total de mudas de cada tratamento no tempo 0 DAT) e outro cálculo considerando apenas as mudas centrais de cada parcela (número de mudas mortas nas parcelas centrais de cada tratamento \*100/número de total de mudas centrais de cada tratamento no tempo 0 DAT) como representado na figura 24.

#### 7.2.4 Coleta de solo

Anteriormente a realização das coletas de solo nas áreas experimentais foram realizadas roçadas da vegetação herbácea e coroamento ao redor das mudas, sempre um mês antes de cada coleta. As roçadas e os coroamentos das mudas foram necessários para conter o crescimento da vegetação herbácea, a fim de evitar o sufocamento das mudas durante o período inicial de transplante e adaptação as condições de campo.

Foram realizadas coletas de solo na área experimental em três tempos distintos: antes da implantação do experimento – zero dias após o plantio das mudas (DAP) (agosto/2019), 300 DAP (maio/2020) e 420 DAP (outubro/2020). As amostras de solo foram coletadas com o auxílio de um trado na camada de 0-20 cm de profundidade. O trado foi flambado com o uso de chama e álcool entre a coleta de cada parcela. Foi coletada uma amostra composta por seis subamostras em cada parcela, com espaço mínimo de 0,5 metros entre cada subamostra (Figura 25). As amostras foram coletadas e homogêneas e, posteriormente separadas para as análises químicas e microbiológicas. As amostras de solo destinadas para as análises químicas foram mantidas em temperatura ambiente e aquelas destinadas às análises dos atributos microbiológicos (atividades enzimáticas, respiração basal microbiana e nitrogênio e carbono da biomassa microbiana) foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram armazenadas a 4 °C até a realização das análises. As amostras de solo destinadas as análises químicas foram posteriormente secas à temperatura ambiente e, após passadas em peneira de 2 mm.

Figura 25. Representação esquemática de como foi realizada a coleta das subamostras (pontos marrons) de solo para as análises em cada parcela.

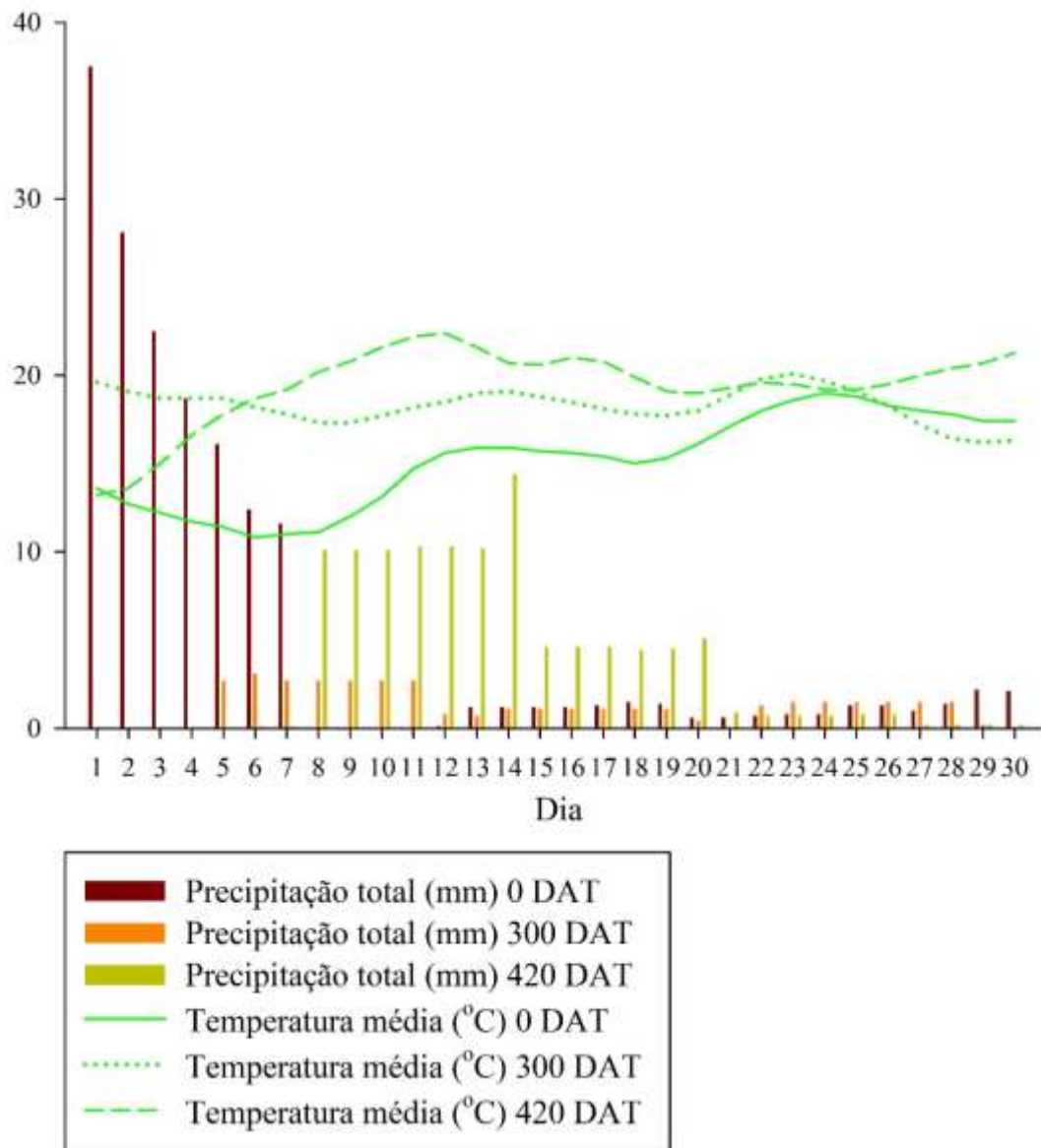


Fonte: Elaborada pela autora deste trabalho (2021).

Na figura 26 é possível verificar a precipitação total e temperatura durante o período de um mês que antecedeu a coleta do solo para análises em cada um dos três tempos (0, 300 e 420 DAT).



Figura 26. Dados meteorológicos de precipitação total e temperatura média no município de Treviso – SC durante o período de um mês antecedente a cada coleta de solo no campo.



Fonte: Adaptado de Agritempo (2021).

Adicionalmente, foram selecionadas duas áreas de preservação permanente (APP) como áreas referências, uma APP sem histórico de mineração e com cobertura florestal estabelecida (APP - Remanescente florestal) e outra APP degradada pela mineração de carvão em estágio de recuperação avançado (APP- ERA). A coleta de solo nessas áreas se deu no tempo 0 DAT na camada de 0-20 cm com o uso de trado, e assim, como para as demais amostras coletadas, foram separadas amostras para as análises químicas e para a avaliação dos atributos microbiológicos seguindo porcedimentos de armazenamento descritos anteriormente.

### 7.2.5 Caracterização química do solo

O solo foi submetido à determinação do pH H<sub>2</sub>O e teor de carbono orgânico total (TEIXEIRA et al., 2017) e teor de fósforo disponível (extraído por Mehlich -1) (Tedesco et al., 1995).

### 7.2.6 Atributos microbiológicos do solo

As amostras de solo coletadas foram submetidas as avaliações dos atributos microbiológicos: carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), atividade enzimática da arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidase, fosfatase ácida e hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF), além da respiração basal (RB) e o quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ), como descritos a seguir.

#### 7.2.6.1 Biomassa microbiana

A determinação do C e N da biomassa microbiana foi realizada de acordo com o método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). O método de fumigação-extração se baseia na lise celular causada pelo clorofórmio (agente fumegante), liberando assim os constituintes celulares. Para a realização do procedimento foram utilizados 20 g de solo. O solo foi previamente incubado por um período de seis dias a temperatura ambiente e protegido da luz. A fumigação foi realizada sob vácuo com uso de dessecador. Amostras não fumigadas foram submetidas ao mesmo procedimento, exceto à exposição ao clorofórmio. A fumigação se deu pela adição de clorofórmio livre de etanol, mantendo as amostras no dessecador e protegidas da luz por um período de 24 h. Posteriormente, foi realizada a extração de CBM e NBM com solução de sulfato de potássio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, com relação solo e extrator 1:2,5. As amostras foram agitadas por um período de 30 min e após procedeu-se a filtragem.

A digestão das amostras para a determinação do CBM foi realizada segundo Alef e Nannipieri (1995) e a determinação do NBM foi realizada segundo metodologia proposta por Silva, Azevedo, De-Poli (2007). Foi adotado o fator de conversão de 0,40 e 0,54 para a determinação do CBM e NBM, respectivamente (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g g solo seco}^{-1}$ .

### 7.2.6.2 Atividade enzimática

A atividade das enzimas arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidase e fosfatase ácida, foram determinadas por espectrofotometria a 410 nm por meio da quantificação do *p*-nitrofenol liberado após a hidrólise do substrato correspondente. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g PNF g solo seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

A atividade da arilsulfatase foi determinada segundo a metodologia proposta por Tabatabai e Bremmer (1972) onde em 1 g de solo será adicionado 0,25 mL de tolueno, 4 mL de tampão acetato ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) pH 5,8 e 1 mL de *p*-nitrofenil sulfato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e incubado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por uma hora. A reação também foi interrompida pela adição de 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 4 mL de  $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), e posteriormente filtrada. Após, precedeu-se a leitura em espectrofotômetro.

Para determinar a atividade das enzimas  $\beta$ -glicosidase foi utilizado 1 g de solo. O solo foi incubado em banho maria a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por uma hora contendo 0,25 mL de tolueno, 4 mL do tampão universal modificada (MUB pH 6) e 1 mL de *p*-nitrofinil  $\beta$ -D glicopiranosideo ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Após esta reação, foi adicionado 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 4 mL do tampão THAM (pH 12). Em seguida as amostras foram filtradas, e precedeu-se a leitura em espectrofotômetro (TABATABAI, 1982; EIVAZI, TABATABAI, 1988).

Para a mensuração da atividade da fosfatase ácida também foi utilizado 1 g de solo, onde foram adicionadas as seguintes soluções: 0,25 mL de tolueno, 4 mL de tampão universal modificado (MUB pH 6,5) e 1 mL de *p*-nitrofenil fosfato ( $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) incubado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por uma hora. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 4 mL de  $\text{NaOH}$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ), e posteriormente filtrada. Em seguida, a leitura foi feita em espectrofotômetro (TABATABAI e BREMNER, 1969; EIVAZI e TABATABAI, 1977).

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) também foi determinada utilizando-se 1 g de solo. Foi adicionada ao solo 20 mL de solução tampão fosfato de sódio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$   $60 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 7,6) e 100  $\mu\text{L}$  de solução de diacetato de fluoresceína. As amostras foram mantidas por 2 horas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação. A reação foi interrompida pela adição de 20 mL de acetona. Após, foi feita a centrifugação a 5000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi filtrado e foi realizada a leitura a 490 nm em espectrofotômetro (DICK, BREAKWELL; TURCO, 1996). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g Fluoresceína (F) g solo seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Todas as análises enzimáticas foram realizadas com seus respectivos controles e

consistiram na adição dos respectivos substratos de hidrólise somente após a etapa de interrupção da reação.

### 7.2.6.3 Respiração basal e $qCO_2$

A respiração basal microbiana foi determinada por meio do método de captura de  $CO_2$  produzido pelos microrganismos presentes nas amostras de solo durante o período de incubação utilizando NaOH (ALEF; NANNIPIERI, 1995). Para quantificar a respiração basal microbiana, foram feitas triplicatas de 50 g de cada amostra de solo. As amostras foram transferidas para frascos de 300 mL e mantidas em temperatura ambiente por seis dias. Após esse período, dentro de cada frasco foi adicionado um becker contendo 20 mL de NaOH  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , o frasco foi fechado e vedado em plástico filme para evitar qualquer saída de  $CO_2$ . Os frascos foram mantidos em local protegido de luz e em temperatura ambiente por seis dias. Posteriormente, foi adicionado ao becker contendo NaOH, 2 mL de  $BaCl_2$  10% e duas gotas de fenolftaleína 1%, e em seguida procedeu-se a titulação com HCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g solo seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

O quociente metabólico ( $qCO_2$ ) foi obtido a partir da razão entre a respiração basal por unidade de carbono da biomassa microbiana do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1993), sendo o resultado expresso em  $\text{mg C} - \text{CO}_2 \text{ g CBM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### 7.2.7 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos nas avaliações de crescimento vegetal e atributos microbiológicos foram submetidos às provas de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade pelo teste de Bartlett. Para cumprir os pressupostos da análise de variância (ANOVA), os dados de nitrogênio da biomassa microbiana do solo do local com mudas de *S. multijuga* e carbono da biomassa microbiana do solo, atividade enzimática da fosfatase ácida,  $\beta$ -glicosidase, arilsulfatase, DAF, pH em  $H_2O$ , carbono orgânico total (COT), fósforo (P) e altura e diâmetro das mudas de ambas as espécies foram submetidos a transformação de  $\log(x+1)$  e os dados de respiração basal e quociente metabólico foram submetidos a transformação de  $\sqrt{x}$ . Posteriormente, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com parcela subdividida no tempo, diferentes tempos de coletas correspondentes a parcela e os tratamentos de inoculação correspondentes às subparcelas. Quando os resultados da ANOVA

foram significativos, as médias foram submetidas ao teste de separação de médias SNK com significância de 5%. Para a realização dos testes de normalidade e homogeneidade foi utilizada a extensão do Excel Action Stat, para a ANOVA e teste de separação de médias SNK foi utilizado o programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011) e os gráficos elaborados no software Sigma Plot (SYSTAT SOFTWARE, 2008).

## 7.3 RESULTADOS

## 7.3.1 Avaliação do crescimento das mudas em área de mineração em processo de recuperação

Na tabela 8 é possível observar o resumo da Análise de variância (ANOVA) dos resultados para a avaliação da altura e do diâmetro das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* inoculadas com MPCV na revegetação de uma área degradada pela mineração de carvão na implantação do experimento (0 e 300 dias após o transplante (DAT)).

Tabela 8. Resumo ANOVA para a altura e diâmetro das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* inoculadas com MPCV em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação.

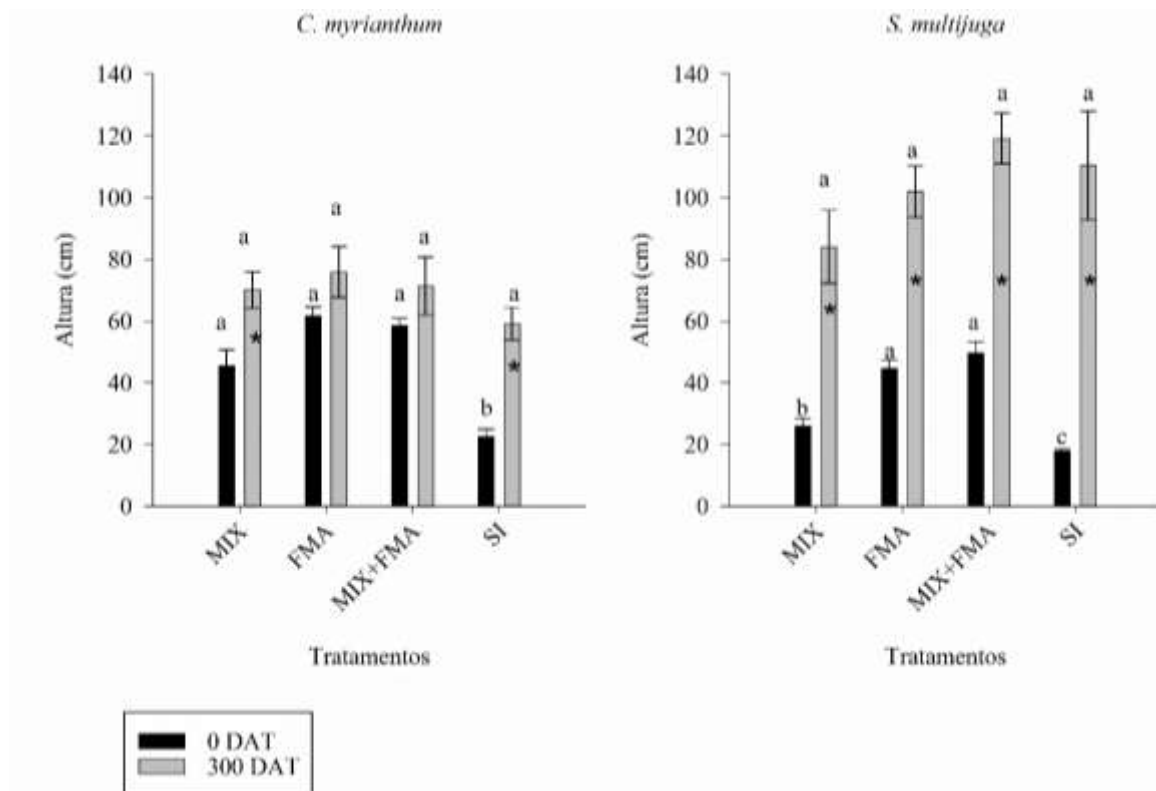
	Variáveis	G.L.	Valor F	P ≤
<i>C. myrianthum</i>	<b>Altura</b>			
	Bloco	3	0,841	ns
	Tempo (Tp)	1	84,228	0,01
	Tratamento (Tt)	3	34,750	0,01
	Tp x Tt	3	6,320	0,01
	C.V.= 4,19%			
	<b>Diâmetro</b>			
	Bloco	3	3,935	ns
	Tempo (Tp)	1	382,557	0,001
	Tratamento (Tt)	3	6,962	ns
Tp x Tt	3	0,113	ns	
C.V.= 5,90%				
<i>S. multijuga</i>	<b>Altura</b>			
	Bloco	3	0,716	ns
	Tempo (Tp)	1	181,346	0,001
	Tratamento (Tt)	3	10,244	ns
	Tp x Tt	3	9,122	0,001
	C.V.= 5,39%			
	<b>Diâmetro</b>			
	Bloco	3	2,567	ns
	Tempo (Tp)	1	202,904	0,001
	Tratamento (Tt)	3	1,481	ns
Tp x Tt	3	0,530	ns	
C.V.= 10,53%				

Fonte: Elaborada pela autora desse trabalho (2021).

Notas: ns = valor de  $p > 0,05$  não significativo

Na altura das mudas de *C. myrianthum* é possível verificar diferenças significativas em função do tempo de avaliação, entre os tratamentos de inoculação e interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação) (Figura 27). Aos 300 DAT apenas as mudas inoculadas com MIX e as mudas do tratamento sem inoculação (SI) apresentaram aumento significativo em relação a altura, com incrementos médios de 54 e 163%, respectivamente. Durante o período de implantação, as mudas que não receberam inoculação (SI) foram as que apresentaram a menor média de altura dentre os tratamentos avaliados, no entanto, após 300 DAT não foram verificadas diferenças entre os tratamentos com ou sem inoculação.

Figura 27. Altura das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação (n = 4). MIX= UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA= RootellaBR + UFSC-B8 + SC5 + MSR2; SI= sem inoculação. T0= 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); e T1= 300 DAT (maio/2020). Barras de erro indicam o erro padrão da média. \* Efeito significativo da inoculação pelo teste SNK 5% de probabilidade entre os diferentes tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste SNK a 5%.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Nas mudas de *S. multijuga* também foi verificada diferença significativa em função do tempo de avaliação e interação entre as fontes de variação na variável altura (Figura 27).

Diferentemente do que foi observado nas mudas de *C. myrianthum*, aos 300 DAT nas mudas de *S. multijuga*, todos os tratamentos avaliados apresentaram aumento significativo em relação a altura, com incrementos de 131, 140, 226 e 524% nos tratamentos inoculados com FMA, MIX+FMA, MIX e SI, respectivamente. Também foi observada diferenças significativas na altura das mudas entre os tratamentos durante o momento da implantação do experimento, sendo que após 300 DAT não houve diferença na altura em relação aos tratamentos de inoculação ou sem inoculação.

Em relação ao diâmetro, tanto nas mudas de *C. myrianthum* como nas mudas de *S. multijuga* foram verificadas diferenças significativas apenas em relação ao tempo de avaliação. Observou-se aumento no diâmetro das mudas das espécies avaliadas após 300 DAT, com incrementos de 106 e 206% para *C. myrianthum* e *S. multijuga*, respectivamente.

A taxa de mortalidade das mudas no campo foi muito baixa em *C. myrianthum*, sendo que nas parcelas centrais não houve nenhuma perda e, no ensaio todo, só houve perda de 3,3% das mudas no tratamento MIX + FMA (Tabela 9). Já em *S. multijuga*, a taxa de mortalidade das mudas foi alta no tratamento sem inoculação (SI), com 48,3% de mortalidade nos 300 DAT. Houve perdas para *S. multijuga* também nos tratamentos MIX (15,0%), FMA (3,3%) e em MIX+FMA (1,6%). Levando em consideração só as mudas centrais de cada parcela, em *S. multijuga*, só houve mortalidade aos 300 DAT no tratamento MIX (33,3%) e no controle SI (16,6%). Os resultados demonstram que houve resposta da inoculação dos tratamentos FMA e MIX+FMA na sobrevivência das mudas de *S. multijuga* durante o período de avaliação de 300 DAT.

Tabela 9. Dados de mortalidade das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* após 300 DAT da implantação do experimento a campo em Treviso - Área III/Rio Pio.

Espécie	Tratamentos	Mortalidade geral		Mortalidade mudas centrais	
		Número de mudas mortas	% de mortalidade	Número de mudas mortas	% de mortalidade
<i>C. myrianthum</i>	MIX	0	0	0	0
	FMA	0	0	0	0
	MIX + FMA	2	3,3	0	0
	SI	0	0	0	0
<i>S. multijuga</i>	MIX	9	15,0	4	33,3
	FMA	2	3,3	0	0
	MIX+FMA	1	1,6	0	0
	SI	29	48,3	2	16,6

Fonte: Elaborada pela autora (2021).



### 7.3.2 Caracterização química do solo

Na tabela 10 é possível verificar os resultados obtidos em relação a caracterização química do solo para áreas com plantio de *C. myrianthum* inoculadas com MPCV em diferentes tempos de avaliação (0, 300 e 420 DAT). Não foram verificadas diferenças significativas em função do tempo de avaliação, entre os tratamentos de inoculação ou interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação). As análises indicam solos com pH ácido, baixos teores de matéria orgânica (<2,5%) e fósforo no intervalo entre 12,41 e 27,58 mg kg<sup>-1</sup> (CQFS-RS/SC, 2016). Os valores das áreas de referência também indicam pH ácido e valores similares para P, mas por sua vez, a área APP-Remanescente florestal possui o dobro do valor para o carbono orgânico total (COT) dos que os valores observados na área experimental do ensaio com *C. myrianthum* independente do tempo de avaliação.

Tabela 10. Caracterização química do solo de uma área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação com mudas de *C. myrianthum* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação.

Tratamentos	pH H <sub>2</sub> O				COT (g.kg <sup>-1</sup> )				P (mg kg <sup>-1</sup> )			
	CV% = 6,50				CV% = 18,84				CV% = 12,63			
	0 DAT	300 DAT	420 DAT	Média	0 DAT	300 DAT	420 DAT	Média	0 DAT	300 DAT	420 DAT	Média
<b>MIX</b>	5,05	4,93	5,19	5,06ns	10,73	6,05	7,64	8,14ns	27,58	21,57	16,09	23,74ns
<b>FMA</b>	5,24	4,88	5,15	5,00ns	7,98	6,41	6,16	6,85ns	23,27	23,12	22,08	20,82ns
<b>MIX+FMA</b>	5,10	5,10	5,59	5,26ns	8,65	6,20	5,69	6,85ns	24,38	19,50	21,32	21,73ns
<b>SI</b>	5,18	4,99	5,00	5,06ns	6,17	6,58	3,06	5,27ns	23,70	23,59	12,41	19,90ns
<b>Média</b>	5,07ns	4,97ns	5,23ns		8,38ns	6,31ns	5,64ns		24,73ns	21,94ns	17,97ns	
<b>APP – Rem</b>	4,09				22,40				20,79			
<b>APP - ERA</b>	5,89				11,65				23,39			

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Notas: ns = Médias não diferem significativamente pelo teste SNK 5%; APP – Rem = APP-Remanescente florestal de mata nativa; APP – ERA = Área de preservação permanente em estágio de recuperação avançado; MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA = Inoculante Rotella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA = UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + Rotella BR; SI = sem inoculação; COT = carbono orgânico total; P = fósforo; DAT = dias após o transplantio;

Na tabela 11 é possível verificar os principais resultados para a caracterização química do solo onde foi implantado o experimento com mudas de *S. multijuga* inoculadas com MPCV. No solo da área revegetada com mudas de *S. multijuga* houve diferenças estatísticas significativas na caracterização química do solo para o pH e COT em relação ao tempo de avaliação e entre os tratamentos de inoculação e, para o P em relação ao tempo de avaliação, não houve interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação) para nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 11).

Tabela 11. Caracterização química do solo de uma área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação com mudas de *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação.

Tratamentos	pH H <sub>2</sub> O				COT (g.kg <sup>-1</sup> )				P (mg.kg <sup>-1</sup> )			
	CV% = 2,43				CV% = 10,62				CV% = 9,83			
	0 DAT	300 DAT	420 DAT	Média	0 DAT	300 DAT	420 DAT	Média	0 DAT	300 DAT	420 DAT	Média
<b>MIX</b>	4,89	5,13	5,01	5,01b	6,49	5,57	7,78	6,62a	29,60	21,08	17,71	22,80ns
<b>FMA</b>	5,32	5,31	5,32	5,31a	5,40	4,36	5,91	5,23b	24,72	24,48	16,00	21,73ns
<b>MIX+FMA</b>	5,01	5,45	5,23	5,23ab	5,98	5,96	7,80	6,58a	29,61	23,75	28,33	27,23ns
<b>SI</b>	5,07	5,24	5,12	5,14ab	10,14	5,74	7,07	7,65a	20,57	25,75	15,49	20,60ns
<b>Média</b>	5,07B	5,28A	5,17AB		7,00A	5,41B	7,14A		27,80A	25,06A	22,71B	
<b>APP-Rem</b>	4,09				22,40				20,79			
<b>APP-ERA</b>	5,89				11,65				23,39			

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Notas: n s= Médias não diferem significativamente pelo teste SNK 5%; APP – Rem = APP-Remanescente florestal de mata nativa; APP – ERA = Área de preservação permanente em estágio de recuperação avançado; MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); FMA = Inoculante Rotella BR (*R. intraradices*); MIX+FMA = UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + Rotella BR; SI = sem inoculação; COT = carbono orgânico total; P = fósforo; DAT = dias após o transplantio;

Em relação ao pH do solo foi observado um pequeno aumento do início da implantação do experimento para o segundo tempo de avaliação (300 DAT) (Tabela 11). O pH do solo na área que recebeu as mudas de *S. multijuga* foi maior no solo com as mudas inoculadas com FMA e, o menor pH foi observado no solo que recebeu as mudas inoculadas com as bactérias promotoras do crescimento vegetal (MIX).

Em relação ao COT os maiores valores foram observados nos tempos de avaliação 0 DAT e 420 DAT (Tabela 11). No tempo 300 DAT foi observado um decréscimo de 29,4% nos valores de COT em comparação com o tempo 0 DAT, mas aos 420 DAT esses valores voltaram a aumentar, com incrementos de 32% em comparação com o tempo 300 DAT. Diferenças significativas no COT também foram observadas entre os tratamentos de inoculação. Os tratamentos de inoculação MIX e MIX+FMA não diferiram do tratamento controle SI e apresentaram os maiores valores de COT, sendo os menores valores verificados no tratamento FMA. Incremento de 33% foi verificado nos tratamentos MIX e MIX+FMA e SI em comparação com o tratamento FMA.

O fósforo do solo na área onde foram implantadas as mudas de *S. multijuga* foi maior no tempo 0 DAT e no tempo 300 DAT. Aos 420 DAT foi observado um decréscimo de 16,38% no fósforo em comparação com os tempos de avaliação 0 DAT e 300 DAT (Tabela 11).

De uma forma geral, os valores de pH observados na área experimental com *S. multijuga* foram ácidos, assim como nas áreas referências. O COT também foi baixo e o fósforo entre 15,49 e 29,61 mg.kg<sup>-1</sup>. Assim como foi observado no ensaio com *C. myrianthum*, os

valores para COT estão muito abaixo dos observados na área referência APP-Remanescente florestal. Por outro lado, os valores para esse mesmo atributo estão próximos ou são muito similares aos observados na área referência APP-ERA, que possui atualmente aproximadamente 18 anos de recuperação.

### **7.3.3 Atributos microbiológicos do solo**

#### *7.3.3.1 Biomassa Microbiana*

Na tabela 12 é possível observar um resumo da ANOVA dos resultados referentes às avaliações do carbono da biomassa microbiana (CBM) e o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) do solo nos experimentos a campo com *C. myrianthum* e *S. multijuga* em função do tempo de avaliação, tratamentos de inoculação e as interações entre as fontes de variação (tempos de avaliação vs tratamentos de inoculação).

Tabela 12. Resumo da ANOVA para o carbono da biomassa microbiana (CBM) e nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) do solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal.

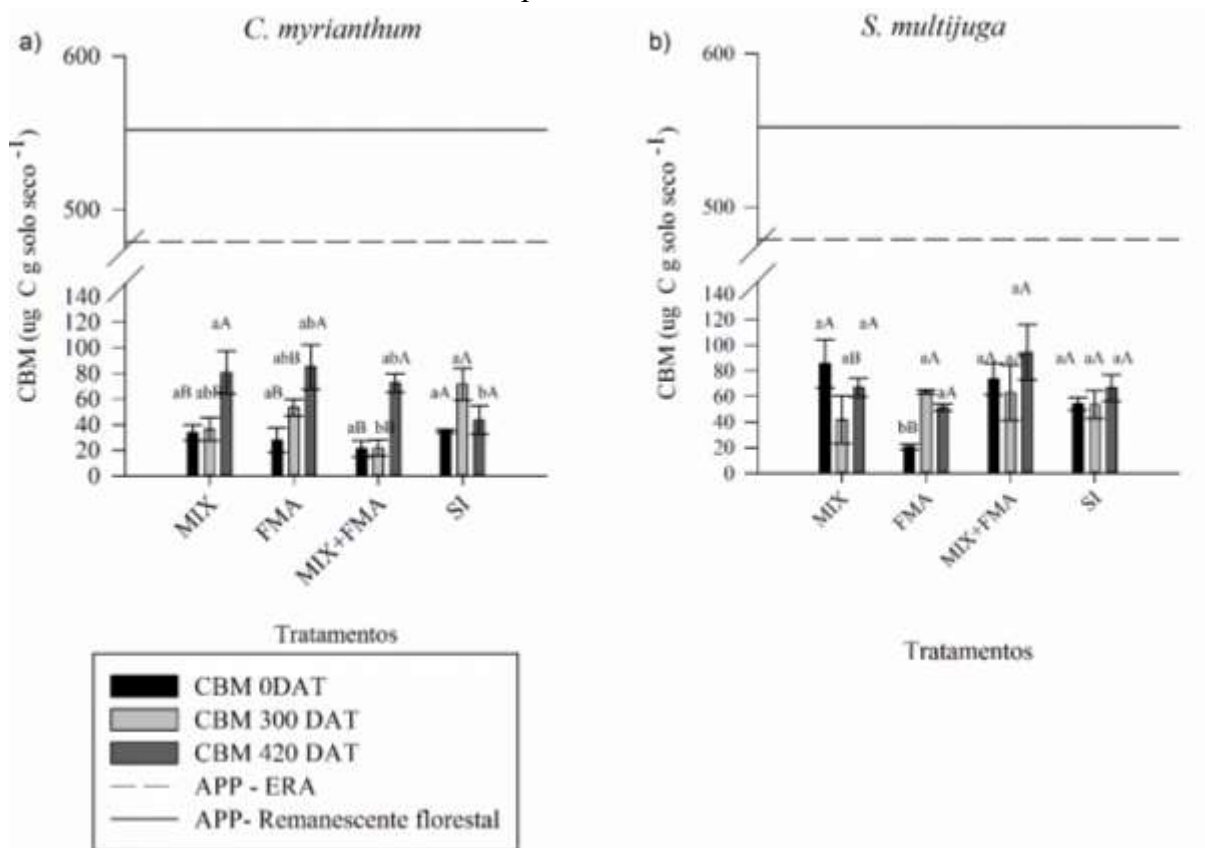
	Variáveis	G.L.	Valor F	P ≤
<b>C. myrianthum</b>	<b>CBM</b>			
	Bloco	3	0,111	ns
	Tempo (Tp)	2	14,502	0,01
	Tratamento (Tt)	3	1,385	ns
	Tp x Tt	6	3,142	0,01
	C.V.= 44,09%			
<b>S. multijuga</b>	<b>NBM</b>			
	Bloco	3	0,881	ns
	Tempo (Tp)	2	35,158	0,01
	Tratamento (Tt)	3	1,679	ns
	Tp x Tt	6	4,354	0,01
	C.V.= 16,18%			
<b>C. myrianthum</b>	<b>CBM</b>			
	Bloco	3	1,769	ns
	Tempo (Tp)	2	2,228	ns
	Tratamento (Tt)	3	2,602	ns
	Tp x Tt	6	3,941	0,01
	C.V.= 11,38%			
<b>S. multijuga</b>	<b>NBM</b>			
	Bloco	3	2,720	ns
	Tempo (Tp)	2	7,009	0,05
	Tratamento (Tt)	3	1,394	ns
	Tp x Tt	6	4,832	0,01
	C.V.= 17,14%			

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Notas: ns =  $p > 0,05$  efeito não significativo

O CBM do solo na área de plantio com mudas de *C. myrianthum* apresentou diferença significativa em função do tempo de avaliação, bem como a interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação) (Figura 28a). Não foram verificadas diferenças significativas entre às áreas experimentais em relação ao CBM aos 0 DAT. Aos 300 DAT, o tratamento sem inoculação (SI) apresentou maiores valores de CBM do solo em relação ao tratamento MIX+FMA, com incrementos de 230%. Pode se verificar que todos os tratamentos de inoculação MIX, FMA e MIX+FMA apresentaram um aumento significativo no CBM do solo aos 420 DAT sendo que esse incremento foi de 110%, 130% e 238%, respectivamente, em comparação com a média dos tempos 0 DAT e 300 DAT (Figura 28a). No tempo de avaliação 420 DAT só foi observado diferença significativa no CBM entre o tratamento de inoculação MIX e o controle SI, sendo que o tratamento MIX apresentou a maior média para o CBM no tempo 420 DAT, cerca 87% de incremento em comparação com o tratamento SI.

Figura 28. Carbono da biomassa microbiana (CBM) do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação nos com revegetação de mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n=4). a) CBM do solo com mudas de *C. myrianthum* e b) CBM do solo com mudas de *S. multijuga*. FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX= UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + Rootella BR; SI= sem inoculação. 0 DAT= 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). Barras representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos tratamentos de inoculação no mesmo tempo de avaliação. Letras maiúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento de inoculação entre os tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

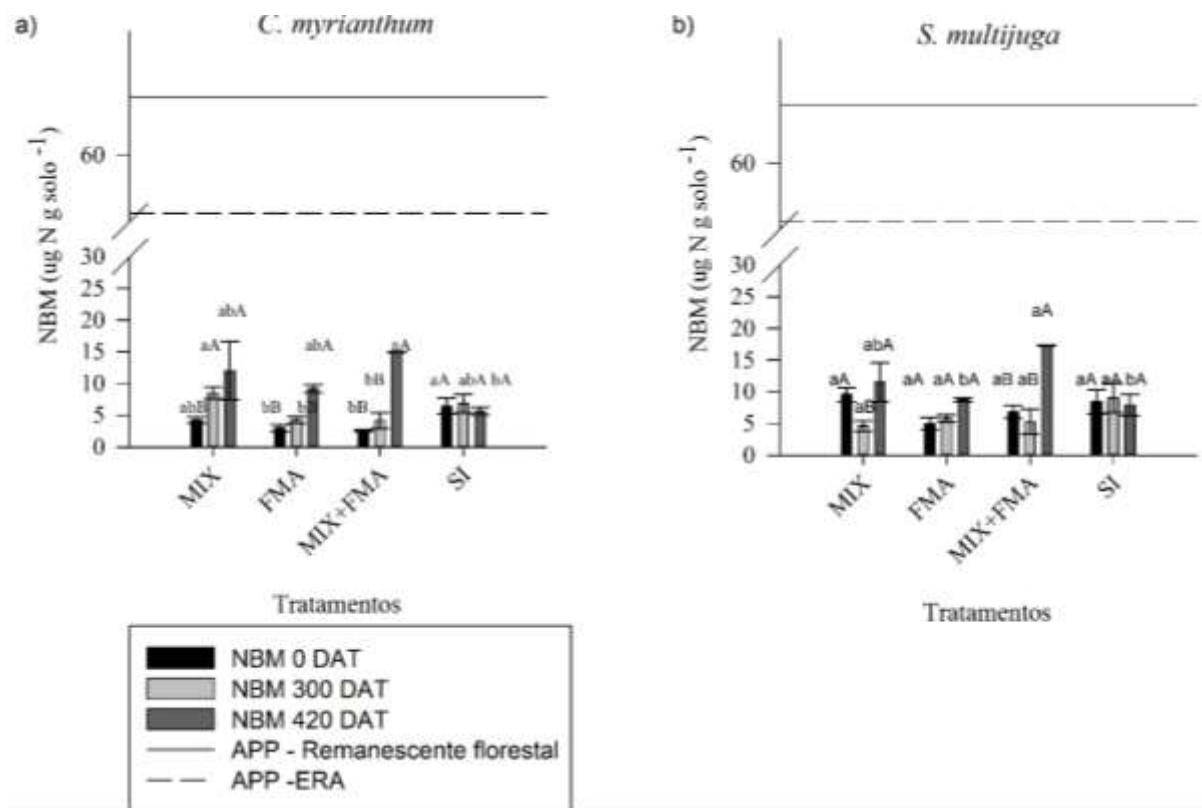
Em *S. multijuga* o CBM também apresentou diferença significativa na interação entre as fontes de variação (inoculação e tempo) (Figura 28b). Aos 0 DAT verificou-se diferença significativa no CBM no local de implantação dos tratamentos MIX, MIX+FMA e SI, que não diferiram estatisticamente entre si, e apresentaram um percentual de 246% maior em comparação com o tratamento FMA (Figura 28b). Nos demais tempos de avaliação não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos de inoculação. Assim como os resultados

obtidos para as áreas com plantio de *C. myrianthum*, para *S. multijuga* o tratamento SI não diferiu no CBM ao longo dos tempos avaliados, isso também foi observado no tratamento MIX+FMA (Figura 28b). Já para os tratamentos FMA e MIX foram observadas diferenças estatísticas significativas ao longo do tempo, sendo que no tratamento FMA os tempos 300 DAT e 420 DAT não diferiram entre si e tiveram um incremento no CBM de 180% em comparação com o tempo 0 DAT. Já o tratamento MIX apresentou um decréscimo no CBM aos 300 DAT e posterior aumento aos 420 DAT.

Podemos verificar na Figura 28 que os valores para o CBM do solo das áreas de referência, são muito superiores aos valores encontrados para CBM no solo das áreas de empréstimo com plantio de *C. myrianthum* e *S. multijuga*, sendo cerca de 480% e 570% maior na área APP-ERA e de 550% e 675% na APP-Remanescente florestal comparado a maior média obtida nos ensaios, respectivamente.

Em relação ao nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) do solo em área com plantio das mudas de *C. myrianthum* verificou-se diferenças significativas em relação ao tempo de avaliação e interação entre as variáveis tempo e inoculação (Figura 29). No tempo 0 DAT verificou-se que o NBM do solo apresentou diferença significativa entre as parcelas onde foi implantado o experimento com as mudas de *C. myrianthum*, sendo que, o tratamento SI apresentou o maior NBM em relação aos demais tratamentos de inoculação. Aos 300 DAT, o tratamento MIX apresentou um aumento significativo no NBM, apresentado a maior média dentre os tratamentos avaliados. Já no tempo 420 DAT, o tratamento MIX manteve o valor para o NBM e, observa-se que os tratamentos FMA e MIX+FMA apresentaram um aumento significativo no NBM. Aos 420 DAT o tratamento MIX+FMA apresentou os maiores valores para NBM, com um incremento de 164% em comparação com o tratamento SI. O tratamento controle (SI) foi o único tratamento que não apresentou diferenças significativas no NBM ao longo do tempo de avaliação (Figura 29a).

Figura 29. Nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação nos com revegetação de mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n=4). a) CBM do solo com mudas de *C. myrianthum* e b) CBM do solo com mudas de *S. multijuga*. FMA= inoculante Rootella BR (*R. intraradices*); MIX= UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + Rootella BR; SI= sem inoculação. 0 DAT= 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). Barras representam o erro padrão da média. Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos tratamentos de inoculação no mesmo tempo de avaliação. Letras maiúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento de inoculação entre os tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

No solo onde foi montado o experimento com mudas de *S. multijuga* inoculadas com MPCV, o NBM apresentou diferença significativa em relação ao tempo de avaliação e interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação) (Figura 29b). Em relação ao NBM do solo em área com plantio de *S. multijuga* foram verificadas diferenças significativas apenas entre os tratamentos no último período de avaliação. Aos 420 DAT o tratamento MIX+FMA apresentou um incremento médio de 109% no NBM comparado aos tratamentos FMA e ao controle SI (Figura 29b). Os tratamentos FMA e o controle SI, não apresentaram diferenças estatísticas

para o NBM ao longo dos tempos avaliados, mas é possível visualizar diferenças nos tratamentos MIX e MIX+FMA (Figura 29b). No tratamento MIX, o NBM não apresentou diferenças entre os tempos 0 DAT e 420 DAT, mas houve uma redução no NBM aos 300 DAT de 127%. Por sua vez, no tratamento MIX+FMA foi possível verificar um incremento de 187% no NBM após 420 DAT em comparação com a média do NBM nos tempos 0 DAT e 300 DAT.

Verificou-se que nas áreas referências os valores de NBM do solo foram cerca de 400% e 370% maiores na área APP-ERA e, de 550% e 500% maiores na área APP-Remanescente florestal comparativamente ao NBM do solo aos 420 DAT nos experimentos com *C. myrianthum* e *S. multijuga*, respectivamente (Figura 29).

### 7.3.3.2 Atividade enzimática

Na tabela 13 é possível observar um resumo da ANOVA dos resultados obtidos em relação a atividade enzimática da arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidade, hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) e fosfatase ácida no solo, referentes aos experimentos a campo com introdução de *C. myrianthum* e *S. multijuga* em função do tempo de avaliação, tratamentos de inoculação e as interações entre as fontes de variação (tempo e inoculação).



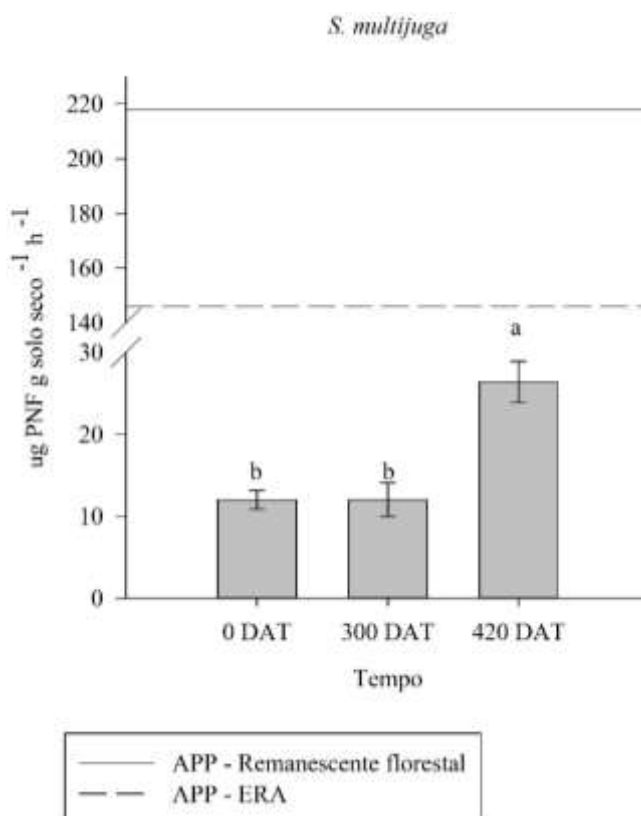
Tabela 13. Resumo da ANOVA para a atividade enzimática da arilsulfatase,  $\beta$ -glicosidase, hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) e fosfatase ácida em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação (Área III/Rio Pío) revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal.

	Variáveis	G.L.	Valor F	P $\leq$
<i>C. myrianthum</i>	<b>Arilsulfatase</b>			
	Bloco	3	1,870	ns
	Tempo (Tp)	2	1,656	ns
	Tratamento (Tt)	3	0,280	ns
	Tp x Tt	6	0,997	ns
	C.V.= 25,84%			
	<b><math>\beta</math>-glicosidase</b>			
	Bloco	3	2,265	ns
	Tempo (Tp)	2	32,944	0,001
	Tratamento (Tt)	3	0,504	ns
	Tp x Tt	6	1,487	ns
	C.V.= 21,78			
	<b>DAF</b>			
	Bloco	3	1,072	ns
	Tempo (Tp)	2	13,709	0,01
	Tratamento (Tt)	3	10,088	0,01
	Tp x Tt	6	3,725	0,01
C.V.= 18,51				
<b>Fosfatase ácida</b>				
Bloco	3	0,343	ns	
Tempo (Tp)	2	5,639	0,05	
Tratamento (Tt)	3	1,370	ns	
Tp x Tt	6	0,503	ns	
C.V.= 10,68				
<i>S. multijuga</i>	<b>Arilsulfatase</b>			
	Bloco	3	0,249	ns
	Tempo (Tp)	2	5,200	0,05
	Tratamento (Tt)	3	0,590	ns
	Tp x Tt	6	1,612	ns
	C.V.= 24,21%			
	<b><math>\beta</math>-glicosidase</b>			
	Bloco	3	0,534	ns
	Tempo (Tp)	2	2,669	ns
	Tratamento (Tt)	3	0,894	ns
	Tp x Tt	6	1,903	ns
	C.V.= 21,90%			
	<b>DAF</b>			
	Bloco	3	2,510	ns
	Tempo (Tp)	2	6,542	0,05
	Tratamento (Tt)	3	0,950	ns
	Tp x Tt	6	1,894	ns
C.V.= 15,38%				
<b>Fosfatase ácida</b>				
Bloco	3	11,188	ns	
Tempo (Tp)	2	8,363	0,01	
Tratamento (Tt)	3	1,377	ns	
Tp x Tt	6	1,885	ns	
C.V.= 20,64%				

Fonte: Elaborada pela autora (2021). Notas: ns= não significativo.

Na área com plantio de mudas de *S. multijuga* é possível verificar que houve diferenças significativas para a atividade de arilsulfatase em relação apenas ao tempo, não apresentando influência da inoculação e nem interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação) (Figura 30). Aos 420 DAT a atividade enzimática da arilsulfatase apresentou incrementos médios de 120% em comparação com os tempos 0 DAT e 300 DAT. Os valores da atividade dessa enzima na área com mudas de *S. multijuga* foram em média 727% menores que a área APP- Remanescente florestal e 454% menores que os verificados em APP- ERA.

Figura 30. Atividade enzimática da arilsulfatase em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de *S. multijuga* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n = 16). 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média dos tratamentos em cada tempo de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

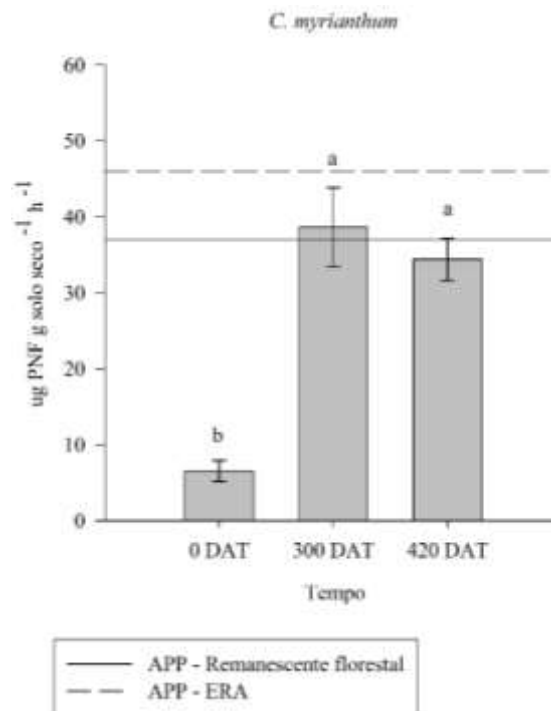


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

A inoculação de MPCV não influenciou a atividade da  $\beta$ -glicosidase, assim como não houve interação entre o tempo e a inoculação. Na figura 31 é possível observar que a atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase para *C. myrianthum* aumentou ao longo do tempo (Figura 30). Aos 300 DAT a atividade de  $\beta$ -glicosidase do solo apresentou um incremento de 452% em

comparação com o tempo 0 DAT de avaliação, e não apresentando diferenças significativas aos 420 DAT. Em comparação com os valores obtidos nas áreas de referência, a atividade da  $\beta$ -glicosidase no ensaio com *C. myrianthum* foi 3% maior em relação a área APP- Remanescente florestal comparado a maior média no tempo, e de apenas 34% menor em comparação com a área APP- ERA. Para *S. multijuga*, não houve diferenças estatísticas na atividade da  $\beta$ -glicosidase em relação aos tempos de avaliação, tratamentos ou interação entre as fontes de variação.

Figura 31. Atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de *C. myrianthum* inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n = 16). 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média dos tratamentos em cada tempo de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

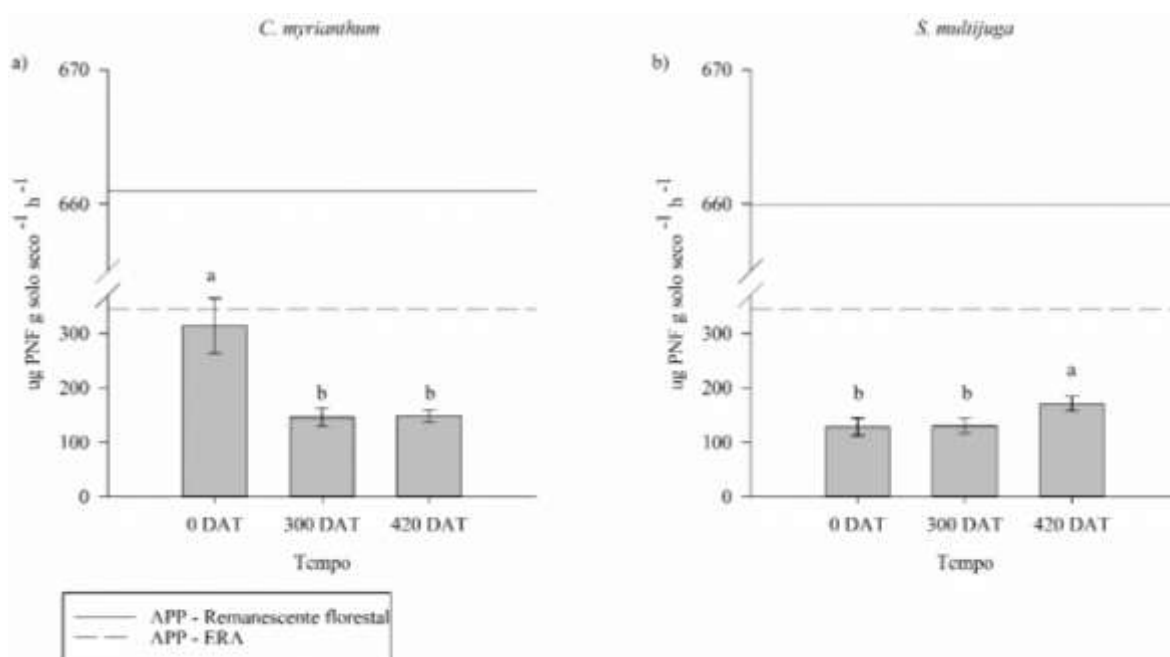


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em relação a atividade enzimática da fosfatase ácida foram verificados aumentos significativos em função do tempo de avaliação, tanto para *C. myrianthum* como para *S. multijuga* (Figura 32). A inoculação de MPCV não influenciou na atividade dessa enzima e não

houve interação entre as fontes de variação avaliadas (tempo e inoculação) tanto nas áreas com plantio de *C. myrianthum* como com *S. multijuga*.

Figura 32. Atividade enzimática da fosfatase (a) *C. myrianthum* e b) *S. multijuga*) em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n = 16). 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média dos tratamentos em cada tempo de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade.

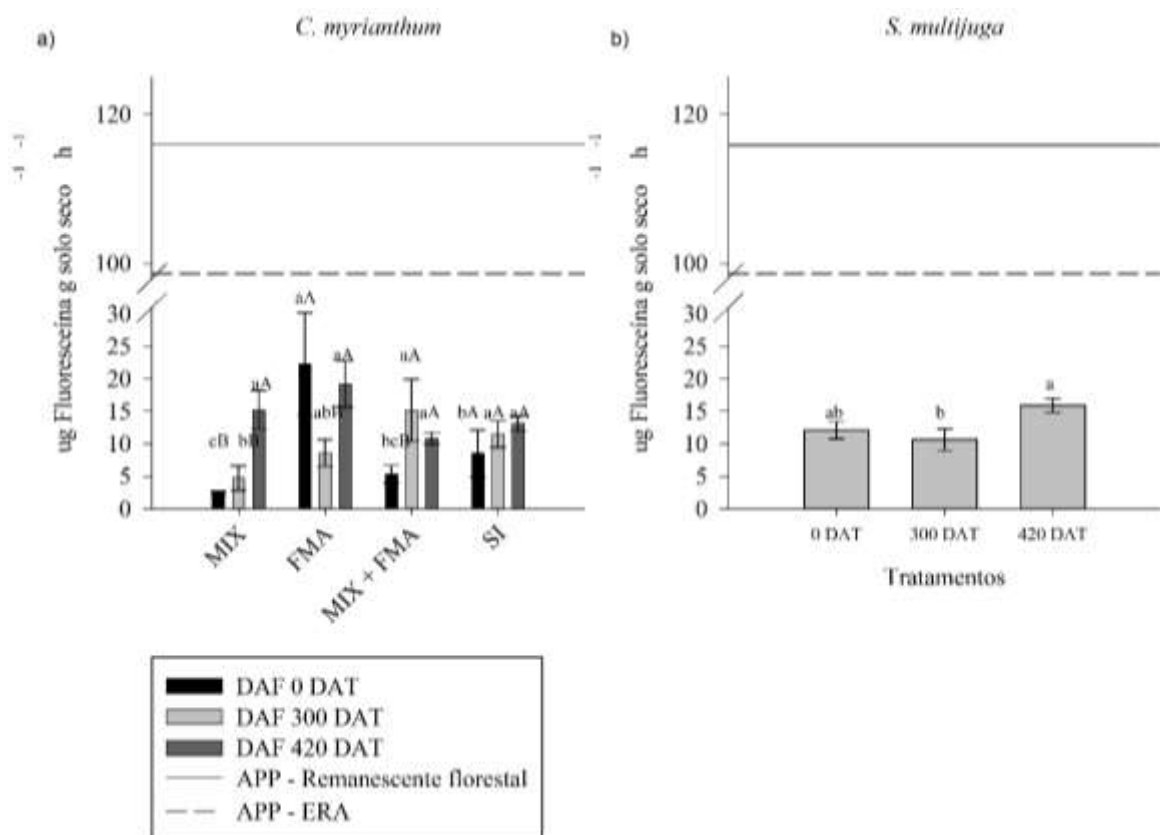


Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Para o ensaio com *C. myrianthum* foi observado um valor maior na atividade da enzima fosfatase ácida no solo no início do experimento (0 DAT), com valores semelhantes aos observados na área APP – ERA. Após esse período houve redução na atividade dessa enzima aos 300 DAT, não diferindo da atividade verificada aos 420 DAT (Figura 32a). Já no ensaio com *S. multijuga*, houve um aumento da atividade da fosfatase aos 420 DAT, com incremento médio de 40% em relação aos primeiros tempos de avaliação (Figura 32b).

Na figura 33 é possível observar a atividade das enzimas envolvidas na hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) em solo de área de mineração de carvão em estágio inicial de recuperação com revegetação de mudas de espécies arbóreas inoculadas com MPCV. No solo com *C. myrianthum* foi verificada diferenças significativas na atividade da DAF em função do tempo de avaliação, nos tratamentos de inoculação e interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação) (Figura 33a).

Figura 33. Atividade das enzimas envolvidas na hidrólise do diacetato de flouoresceína (DAF) em solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas (a) *C. myrianthum* e b) *S. multijuga*) inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação. FMA= inoculante *Rootella* BR (*R. intraradices*); MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + *Rootella*BR; SI= sem inoculação. 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). a) n= 4; b) n= 16. A barra representa o erro padrão da média. Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos tratamentos de inoculação no mesmo tempo de avaliação. Letras maiúsculas representam comparações dentro do mesmo tratamento de inoculação entre os tempos de avaliação. Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste SNK a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

No tempo 0 DAT houve diferenças significativas na atividade da DAF no solo onde foi implantado o experimento com *C. myrianthum*, sendo verificados os maiores valores no tratamento inoculado com FMA (Figura 33a). Após o plantio das mudas, na avaliação aos 300 DAT, foi verificado um aumento significativo na atividade da DAF no tratamento MIX+FMA, não diferindo do controle SI. Por outro lado, nesse mesmo tempo de avaliação observa-se que o tratamento FMA apresentou uma redução nos valores de DAF em comparação com o tempo 0 DAT. No último tempo de avaliação os tratamentos não diferiram entre si, mas é possível

verificar que o tratamento MIX e o tratamento FMA apresentaram um aumento significativo na atividade da DAF aos 420 DAT. O tratamento SI, por sua vez, não diferiu significativamente em relação a atividade da DAF nos diferentes tempos de avaliação.

Por outro lado, para *S. multijuga* não houve diferença nas interações entre os tratamentos e os tempos de avaliação na atividade enzimática da DAF, mas foram verificadas diferenças significativas na DAF em função do tempo de avaliação (Figura 33b). A atividade enzimática da DAF para *S. multijuga* não diferiu estatisticamente entre os tempos 0 DAT e 300 DAT e, apresentou um incremento de 41% no último tempo avaliado (420 DAT).

A atividade enzimática da DAF nas áreas referências foi cerca de 650% e 590% maior na área APP-ERA e, de 670% e 605% maior na área APP-Remanescente florestal em comparação com os valores obtidos nos ensaios com *C. myrianthum* e *S. multijuga*, respectivamente (Figura 33).

#### 7.3.3.3 Respiração basal e quociente metabólico

Na tabela 14 podemos observar o resumo da ANOVA para os resultados de respiração basal (RB) e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) do solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* inoculadas com MPCV. Em *C. myrianthum* foi possível observar diferenças significativas no solo para RB e para o  $qCO_2$  em razão apenas do tempo de avaliação, não havendo diferença significativa nos tratamentos de inoculação e nem interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação). Já no solo revegetado com mudas de *S. multijuga* houve diferença significativa em relação ao tempo de avaliação e interação entre as fontes de variação (tempo e inoculação) para a RB e, para o  $qCO_2$  houve diferença significativa apenas na interação entre as fontes de variação.

Tabela 14. Resumo da ANOVA para os dados de respiração basal microbiana e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação (Área III/Rio Pio) revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal.

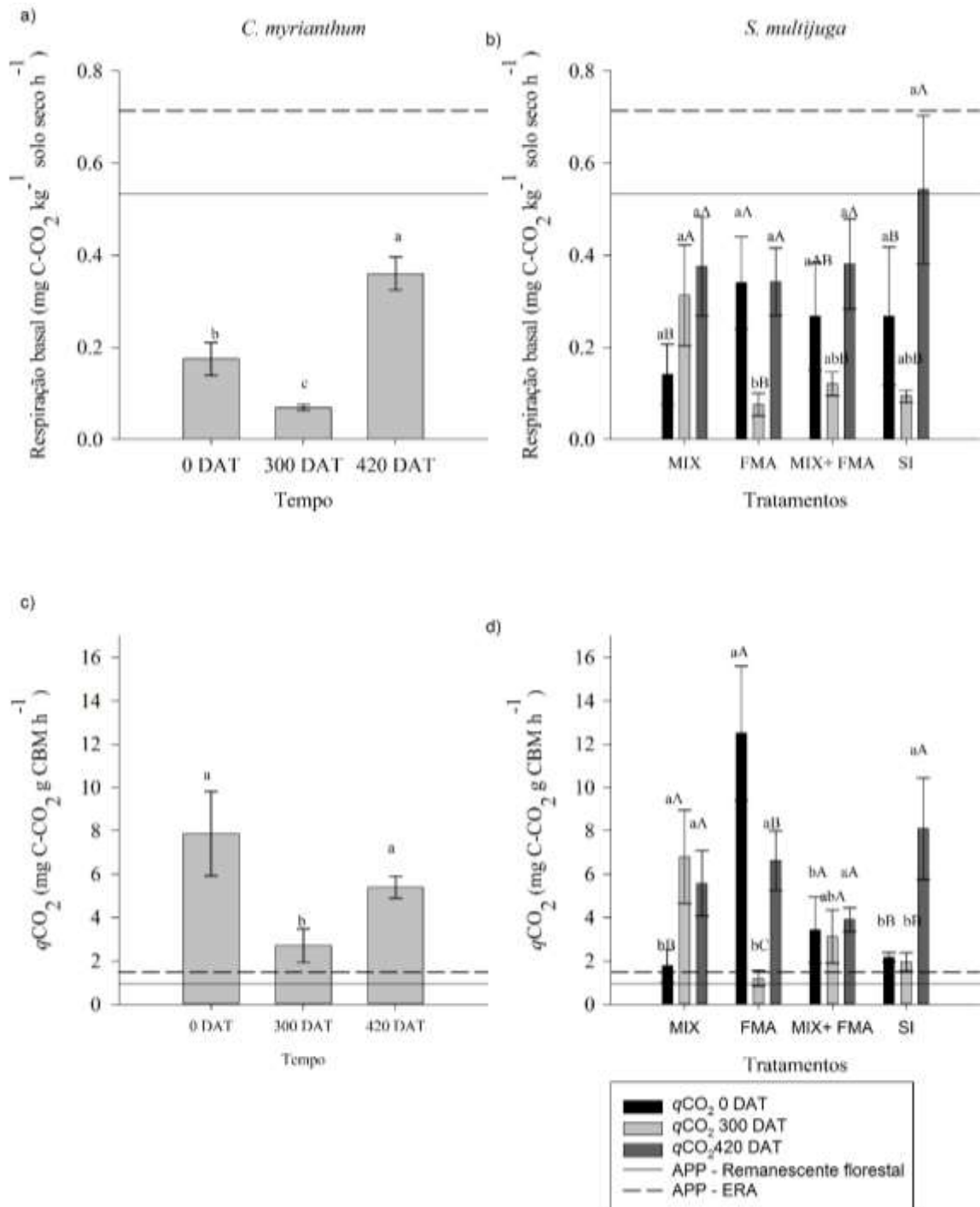
	Variáveis	G.L.	Valor F	P ≤
<i>C. myrianthum</i>	<b>Respiração Basal</b>			
	Bloco	2	2,221	ns
	Tempo (Tp)	2	133,646	0,01
	Tratamento (Tt)	3	3,199	ns
	Tp x Tt	6	1,737	ns
	C.V.= 17,43%			
	<b><math>qCO_2</math></b>			
	Bloco	2	0,238	ns
	Tempo (Tp)	2	8,865	0,05
	Tratamento (Tt)	3	4,024	ns
Tp x Tt	6	1,351	ns	
C.V.= 33,36%				
<i>S. multijuga</i>	<b>Respiração Basal</b>			
	Bloco	2	8,509	ns
	Tempo (Tp)	2	10,147	0,01
	Tratamento (Tt)	3	0,079	ns
	Tp x Tt	6	4,434	0,005
	C.V.= 28,20%			
	<b><math>qCO_2</math></b>			
	Bloco	2	2,250	ns
	Tempo (Tp)	2	4,166	ns
	Tratamento (Tt)	3	1,373	ns
Tp x Tt	6	9,273	0,0001	
C.V.= 31,81%				

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Notas: ns= não significativo

A respiração basal do solo no experimento revegetado com mudas de *C. myrianthum* foi maior no último tempo de avaliação, com um incremento de 107% em relação ao tempo 0 DAT e, de 422% em comparação com o tempo 300 DAT, isso significa que durante o tempo de avaliação 300 DAT houve uma queda na respiração basal, mas que no segundo tempo de avaliação (420 DAT) a RB aumentou significativamente (Figura 34a). Já para *S. multijuga*, a RB também apresentou suas maiores médias no tempo de avaliação 420 DAT, entretanto, a RB no tempo 300 DAT não diferiu do tempo de implantação do experimento (0 DAT), ou seja, foram necessários 420 DAT para que houvesse um aumento significativo na RB do solo avaliado, sendo esse incremento de 105%.

Figura 34. Respiração basal (RB) (a e b) e quociente metabólico ( $qCO_2$ ) (c e d) do solo de área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação revegetada com mudas de espécies arbóreas inoculadas com microrganismos promotores do crescimento vegetal em diferentes tempos de avaliação (n=16). FMA= inoculante *Rootella* BR (*R. intraradices*); MIX = UFSC-B8 (*Rhizobium* sp.) + SC5 (*Pseudomonas* sp.) + MSR2 (*Pantoea* sp.); MIX+FMA= UFSC-B8 + SC5 + MSR2 + *Rootella* BR; SI= sem inoculação. 0 DAT = 0 dias após transplante (DAT) (agosto/2019); 300 DAT (maio/2020); e 420 DAT (outubro/2020). A barra representa o erro padrão da média (Área III- Rio Pio), Treviso, SC. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste SNK a 5%.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).



No solo revegetado com mudas de *S. multijuga*, a RB só apresentou diferenças significativa entre os tratamentos aos 300 DAT, sendo verificados os maiores valores no solo que recebeu as mudas inoculadas com o tratamento MIX (Figura 34b). Nos tempos 0 DAT e 420 DAT não houve diferenças significativas entre os tratamentos na RB do solo. O tratamento de inoculação MIX apresentou diferença significativa na RB aos 300 DAT e se manteve aos 420 DAT, com incremento de 146% em comparação como o tempo 0 DAT. No tratamento de inoculação FMA foi verificado uma queda na RB aos 300 DAT, mas voltou a aumentar significativamente aos 420 DAT, sendo que esses valores não diferiram em relação ao tempo 0 DAT. Já para o tratamento MIX+FMA, a maior média na RB foi observada aos 420 DAT, com incremento de 217% em comparação com o tempo 300 DAT. O tratamento controle SI também apresentou aumento significativo na RB ao longo do tempo, com incremento de 200% em comparação com os tempos 0 DAT e 300 DAT.

A respiração basal nas áreas referências foi maior que os valores obtidos nos ensaios com *C. myrianthum* e *S. multijuga*, cerca de 100% e 47% maior na APP - ERA e de 47% e 8% na APP- Remanescente florestal, respectivamente (Figura 34a e 34b).

O  $qCO_2$  do solo na área revegetada com mudas de *C. myrianthum* apresentou diferença estatística significativa em relação ao tempo de avaliação (Figura 34c). O  $qCO_2$  do tempo anterior a implantação do experimento (0 DAT) e no último tempo de avaliação (420 DAT) não apresentaram diferença, sendo que, o  $qCO_2$  foi 146% maior que o tempo 300 DAT (Figura 34c).

Já para *S. multijuga*, o  $qCO_2$  não apresentou diferença significativa em relação ao tempo de avaliação, no entanto, houve interação entre as fontes de variação (inoculação e tempo) (Figura 34d). O  $qCO_2$  no solo revegetado com mudas de *S. multijuga* apresentou diferenças significativas entre os tratamentos no tempo 0 DAT, ou seja, antes da implantação do experimento. O local que recebeu as mudas inoculadas com o tratamento FMA foi 410% maior que os demais tratamentos de inoculação e o tratamento controle SI. Já no tempo 300 DAT verificou-se um aumento significativo no  $qCO_2$  no tratamento MIX, com um incremento de 249% em comparação com o controle SI. No tempo 300 DAT o tratamento FMA não diferiu significativamente do controle SI. Aos 420 DAT não foi observada diferença significativa entre os tratamentos em relação ao  $qCO_2$ . O  $qCO_2$  do solo referente ao tratamento MIX apresentou aumento significativo ao longo do tempo de avaliação, sendo que aos 300 DAT o incremento foi de 249% em comparação com o tempo 0 DAT e, não diferiu significativamente aos 420 DAT. O tratamento de inoculação FMA apresentou valores altos antes da implantação do experimento no tempo 0 DAT e, após a implantação das mudas, aos 300 DAT, verificou-se um

decremento de 942%. Aos 420 DAT os valores verificados para  $qCO_2$  voltaram a aumentar, com incremento de 452%. No tratamento MIX+FMA por sua vez, não houve diferença significativa no  $qCO_2$  ao longo do tempo. No tratamento controle SI também se verificou diferença significativa no  $qCO_2$  em relação ao tempo, com incremento de 293% aos 420 DAT em comparação com os tempos 0 DAT e 300 DAT.

Os valores de  $qCO_2$  observados nos ensaios com *C. myrianthum* e *S. multijuga*, de forma geral, foram maiores do que os valores observados nas áreas referências, sendo que, os valores obtidos no ensaio com *C. myrianthum* foram cerca de 343% e 575% maiores que as áreas APP - ERA e APP - Remanescente florestal, respectivamente, e de 373% (APP-ERA) e 620% (APP-Remanescente florestal) no ensaio com *S. multijuga* (Figura 34).

## 7.4 DISCUSSÃO

A recuperação de áreas degradadas, especialmente por mineração, pode levar muitos anos para ocorrer, mas como já demonstrou Rocha-Nicoleite et al. (2018) e Bizuti (2017) é possível alcançar resultados de melhorias satisfatórias nas condições físicas, químicas e biológicas do solo em tempo menor do que costumava se estimar para ambientes tropicais, por meio de intervenções antrópicas bem planejadas.

Uma das primeiras ações para recuperação de uma área degradada pela mineração consiste na construção do solo, a fim de tentar simular as condições necessárias para o estabelecimento vegetal, uma vez que, durante a extração de carvão a céu aberto as camadas do solo sofreram inversão em relação às suas posições estratigráficas originais, na qual a vegetação e o solo ficam depositados na base e os estereis de mineração nas camadas superiores (ROCHA-NICOLEITE, 2015). No entanto, um solo construído apresenta características químicas, físicas e biológicas distintas ao observado em um solo natural, dentre essas características que geralmente são verificadas podemos citar: pH ácido, baixos teores nutricionais, baixo teor de matéria orgânica (INDA et al., 2010; CAMPOS et al., 2010), solo compactado devido ao maquinário pesado que é empregado durante o processo de construção de solo, baixa capacidade de infiltração de água, (CAMPOS et al., 2010; STUMPF et al., 2016) e atividade biológica alterada (DOS SANTOS et al., 2008). Como resultado pode haver dificuldade de estabelecimento e sobrevivência de espécies vegetais nesses solos (COSTA; ZOCHE, 2009).

A inoculação de MPCV pode facilitar a adaptação, sobrevivência e crescimento de mudas arbóreas nessas condições de solo. No presente estudo, todavia, no período de 300 DAT não foi verificada diferenças significativas da inoculação de MPCV no crescimento das mudas de *C. myrianthum* e de *S. multijuga* a campo. Resultados distintos aos encontrados neste trabalho para *C. myrianthum* foram observados por Pasqualini (2013) em estudo de inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato + FMA em mudas de *C. myrianthum* em área degradada. Nesse estudo, o autor verificou que a coinoculação foi vantajosa e favoreceu a sobrevivência e o crescimento das mudas em condições de campo. Por outro lado, no presente estudo, tanto em *C. myrianthum*, como em *S. multijuga*, apesar das mudas terem sofrido rebrota ocasionada pela geada logo após a implantação do experimento à campo, estas expressaram crescimento significativo aos 300 DAT em relação à altura e diâmetro do caule. Vieira, Feistauer e Silva (2003) verificaram em trabalho com *C. myrianthum* que a espécie apresentou pouca tolerância à geada, porém também apresentou alta taxa de rebrota. Segundo Ferreira et al. (2019), os valores

de temperatura basal inferior, ótima e basal superior, para o desenvolvimento vegetativo de *C. myrianthum*, são 11,4, 18,1 e 36,6°C, respectivamente.

Em estudo a campo, em área degradada por mineração de bauxita, MORAIS JUNIOR et al. (2019) avaliaram o crescimento de 25 espécies no período de 29 meses. Nesse estudo as espécies que apresentaram maior crescimento foram as leguminosas pioneiras *S. multijuga*, *S. macranthera* e *S. parayba*. Os autores atribuíram o crescimento acelerado dessas espécies ao fato de não serem muito exigentes quanto a fertilidade do solo e, portanto, se adaptarem a diferentes ambientes com maior facilidade.

De uma forma geral, a taxa de mortalidade nas mudas de *S. multijuga* foi maior no tratamento sem inoculação e no tratamento MIX. A inoculação de FMA e MIX+FMA favoreceram a sobrevivência das mudas no transplântio e durante o período inicial de adaptação em solo construído. Estudo realizado por Cotarelli et al. (2008) com *S. multijuga* também em área degradada, observaram uma taxa de mortalidade alta para as mudas após 26 meses de avaliação. Os autores desse estudo não realizaram a prática de inoculação de microrganismos durante a produção das mudas de *S. multijuga* e, encontraram taxa de mortalidade semelhante (37,5%) as observadas neste estudo (48,3%) nas mudas do tratamento sem inoculação. Outro estudo de recuperação de área degradada no litoral paranaense envolvendo *C. myrianthum* e *S. multijuga*, por um período de 10 anos, verificou alta taxa de mortalidade em *S. multijuga* (SCHÄFFER et al., 2020). Os autores atribuíram em parte a alta taxa de mortalidade de *S. multijuga*, ao fato de o experimento só ter sido avaliado após um longo período e que muitos dos indivíduos de *S. multijuga* já haviam cumprido seu ciclo de vida nesse período de avaliação. A presença de muitas árvores desenvolvidas e mortas na área experimental subsidiaram a hipótese dos autores. Resende et al. (2015) observaram em experimento em área de recuperação com modelo de plantio com espécies de leguminosas, baixa sobrevivência das mudas (<50%), dentre as espécies de leguminosas utilizadas estava *S. multijuga*. Como foi verificado no presente trabalho, os FMA podem desempenhar um papel fundamental na sobrevivência de espécies arbóreas sensíveis à solos degradados como a *S. multijuga*, por exemplo, por meio de mecanismos que melhoram a nutrição vegetal e amenizam o estresse ambiental sofrido pelas mudas no transplântio para áreas degradadas (SOARES e CARNEIRO, 2008).

As mudas de *C. myrianthum*, por sua vez, apresentaram elevada taxa de sobrevivência em todos os tratamentos, não sendo possível, portanto, relacionar a sobrevivência das mudas a inoculação de MPCV. Schäffer et al. (2020) observaram em *C. myrianthum* alta taxa de mortalidade, porém a espécie apresentou o segundo melhor desenvolvimento dentre as espécies

avaliadas. Cotarelli et al. (2008) por outro lado, observaram excelente desempenho das mudas de *C. myrianthum* no período de avaliação de 26 meses e, assim como neste trabalho, observaram elevada taxa de sobrevivência das mudas (89,1%). Corroborando com esses resultados, Durigan (1990) também observou alta taxa de sobrevivência das mudas de *C. myrianthum* (91%) em área de mata ciliar.

Em relação aos atributos do solo, uma das características químicas muito importante é o pH. Uma das funções do pH do solo está relacionada com a regulação dos processos biogeoquímicos do solo (HONG et al., 2018), com efeitos na estrutura e funções de todos os ecossistemas terrestres, como equilíbrio da hidrólise de íons (TYLER; OLSSON, 2001), nas comunidades microbianas (BÅÅTH et al., 1995) e no conteúdo de matéria orgânica (LAMBKIN et al., 2011). A acidificação do solo tem sido relatada em diversos ecossistemas e diferentes regiões do mundo (YANG et al., 2015), em decorrência, especialmente, de ações antrópicas. Nesse estudo também foi verificado solos com pH ácido em ambas as áreas experimentais que podem dificultar o estabelecimento e desenvolvimento vegetal. Alguns nutrientes em solos ácidos podem se tornar tóxicos para as plantas, como é o caso do Al, Fe e Mn, e outros nutrientes como é o caso do P, Mo e K, se tornam pouco disponíveis para as plantas (LONDO et al., 2006).

O uso de espécies vegetais arbóreas pode modificar o pH do solo. Estudo realizado por Hong et al. (2018) sugerem que dependendo da condição inicial de pH do solo, o plantio de espécies arbóreas pode alterar o pH. Nesse estudo, os autores verificaram que em solos alcalinos, o florestamento levou a redução do pH do solo e, em solos ácidos houve um aumento no pH, ou seja, houve uma tendência a neutralização do solo promovida pelas espécies vegetais (HONG et al., 2018). As espécies vegetais, primeiramente, por meio da produção de serapilheira e da associação com os microrganismos do solo na região da rizosfera, podem apresentar um papel muito importante em neutralizar o pH do solo por meio da decomposição da matéria orgânica (DE SCHRIJVER, 2012; RUKSHANA et al., 2013). Dessa forma, a inoculação de MPCV nas mudas de espécies arbóreas pode trazer benefícios na adaptação inicial e desenvolvimento das mudas em solo construído.

Outros parâmetros químicos determinados no presente estudo, como é o caso do COT, levam um tempo muito maior para alcançarem valores similares aos observados às áreas adjacentes que não sofreram com a mineração. Resultados semelhantes relacionados a matéria orgânica (MO) também foram observados por Costa e Zocche (2009). Nesse estudo os autores observaram em área de mineração em estágio inicial de recuperação sob solo construído,

valores baixos para a MO. Silva et al. (2019) em estudo realizado em áreas de mineração de carvão degradadas com diferentes tempos de recuperação, verificaram que dentre os atributos químicos avaliados, o COT foi aquele que mais se destacou em relação ao tempo de recuperação, sendo que os menores valores para o COT foram observados na área avaliada com menor tempo de recuperação (2 anos) e apresentou valores similares aos observados neste estudo.

Em estudo realizado em área degradada, mas pela mineração de bauxita em Minas Gerais, foi observado que o carbono orgânico só apresentou mudanças significativas e similares ao ambiente natural após 18 anos de implantação do processo de recuperação do local (CARNEIRO et al., 2008). Esses mesmos autores verificaram uma relação linear entre os teores de COT e o tempo de reabilitação da área. Silva et al. (2019) em áreas de mineração de carvão em recuperação, também observaram que ao longo do tempo de recuperação ocorre um aumento no COT, mas os ganhos não ocorreram de forma proporcional.

Como levantado por Venson et al. (2017), a maioria dos planos de recuperação ambiental apresentam um custo elevado e, o fracasso na recuperação de áreas degradadas só é observado a longo prazo. Como já demonstrado em vários estudos, os atributos microbiológicos são variáveis sensíveis na predição de melhorias na qualidade do solo em um curto espaço de tempo (DORAN e PARKIN, 1994; CHAER e TÓTOLA, 2007; CARNEIRO et al., 2008; SILVA et al., 2018; DILLY, POMPILI, BENEDETTI, 2018), sendo uma alternativa interessante para ser empregada no monitoramento da recuperação de áreas degradadas ao longo do tempo e, dessa forma, garantir que os projetos de recuperação ambiental estão sendo executados de forma a garantir a recuperação do local. Segundo os resultados obtidos por Teixeira et al. (2020), os processos microbiológicos do solo que estão relacionados com a ciclagem de C e de outros nutrientes apresentaram uma recuperação acentuada nos primeiros 15 anos de sucessão secundária e, após, tendem a alcançar estabilidade ao nível de floresta primária.

Os atributos microbiológicos do solo como o nitrogênio e o carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico ( $qCO_2$ ), segundo Silva et al. (2019), apresentam grande potencial, em conjunto com outros atributos, para serem utilizados na avaliação da recuperação de áreas degradadas pela mineração. Neste trabalho, apesar do curto tempo de avaliação e início da recuperação de uma área degradada pela mineração de carvão é possível verificar melhorias em determinados atributos microbiológicos do solo que foram avaliados, bem como a influência da inoculação de MPCV. No experimento com *C.*

*myrianthum*, embora o tempo de recuperação seja ainda muito recente, foi possível verificar diferença significativa no CBM do solo após 420 DAT. Mesmo que os valores para CBM do solo com plantio de *C. myrianthum* e *S. multijuga* estejam ainda muito distantes dos observados nas áreas referências, esse aumento no CBM em um curto espaço de tempo de recuperação, pode ser um indicativo de que o CBM é uma variável sensível e, portanto, interessante para ser considerada no diagnóstico e monitoramento de recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão. Silva et al. (2019) observaram em estudo realizado em áreas de mineração de carvão em SC com diferentes tempos de recuperação que alguns atributos microbiológicos, como o CBM e o NBM, foram sensíveis em detectar mudanças ao longo do tempo de recuperação. Os valores de CBM observados neste trabalho, são próximos aos observados por Silva et al. (2019) na área com menor tempo de avaliação (2 anos), sendo que a área experimental deste trabalho tinha aproximadamente dois anos desde o início da revegetação da área até o último período de avaliação. Resultados distintos foram encontrados em estudo realizado por Carneiro et al. (2008) que verificaram mudanças no CBM e no NBM em pouco tempo após o início da revegetação em áreas degradadas pela mineração de bauxita, com cerca de um ano já foram verificados valores próximos ou iguais as áreas referências.

Estudos em áreas de mineração em nível mundial têm demonstrado que a recuperação de atributos microbiológicos como o CBM, pode levar mais de 40 anos para alcançar valores próximos aos observados em áreas adjacentes, que não sofreram perturbações. Em estudo realizado por Block (2018) em área de mineração de carvão a céu aberto em Dakota do Norte (EUA), durante um período de cronosequência de 42 anos foi verificado que o CBM da última avaliação (329 mg C/kg de solo) era metade do valor verificado na área referência (647 mg C/kg de solo). Anderson, Stahl e Ingram (2004) também encontraram valores muito menores para o CBM em uma área de mineração de carvão após 30 anos do início do processo de recuperação em comparação com uma área referência adjacente que não sofreu perturbação. Neste trabalho, os autores concluíram que os dados indicavam que a biomassa microbiana do solo estava passando por um processo de recuperação de forma lenta. Esses trabalhos são importantes por demonstrarem que o CBM é uma variável sensível a ser considerada no monitoramento de áreas degradadas, mas é preciso salientar que a dinâmica da matéria orgânica no hemisfério norte é distinta da que se observa no hemisfério sul, com climas bastante distintos.

Adicionalmente, no presente trabalho verificou-se interação entre os tratamentos de inoculação nos tempos avaliados em relação a biomassa microbiana para as duas espécies

estudadas, tanto em relação ao CBM, como em relação ao NBM. Em *C. myrianthum* é possível verificar que o tratamento com a inoculação das três bactérias (MIX) apresentou média superior para o CBM do solo após 420 DAT em comparação com o tratamento sem inoculação. Vale ressaltar que a biomassa microbiana do C e do N para o tratamento SI não sofreu alteração em relação ao tempo de avaliação em ambas as espécies arbóreas avaliadas. Valores mais altos de biomassa microbiana indicam uma atividade microbiana mais intensa que podem resultar em melhoria da qualidade do solo e ciclagem de nutrientes, formação de agregados estáveis do solo e maior diversidade funcional (NOGUEIRA et al., 2006).

A coinoculação de MPCV (MIX+FMA) favoreceu também o NBM do solo nas duas espécies avaliadas, em comparação com o tratamento sem inoculação. Sabe-se que muitos MPCV também colonizam a região rizosfera das plantas, podendo contribuir para o aumento da biomassa microbiana no solo. Ju et al. (2019) avaliaram a coinoculação de uma rizobactéria promotora do crescimento vegetal e de um rizóbio em alfafa em solos contaminados com Cu. Os autores verificaram aumento significativo na biomassa microbiana do solo e na atividade enzimática quando comparado com o controle não inoculado. Adicionalmente, constataram que a coinoculação afetou a composição microbiana rizosférica, assim como também aumentou a diversidade microbiana nessa região.

A inoculação de MPCV nas mudas das espécies arbóreas também podem beneficiar as espécies espontâneas adjacentes e, dessa forma aumentar os efeitos sobre os atributos biológicos do solo. Estudos têm demonstrado que a diversidade de espécies vegetais é um fator importante para a biomassa microbiana, uma vez que, com uma maior diversidade de espécies vegetais, há uma maior disponibilidade de carbono e fontes de nutrientes para os microrganismos do solo, provenientes da serapilheira e pela mortalidade de outros tecidos vegetais no solo (LANGE et al., 2015; KHLIFA et al., 2017; CHEN et al., 2019). A vegetação e o tempo são parâmetros dominantes, influenciando a riqueza, diversidade, adesão e estrutura da comunidade bacteriana em áreas de mineração em processo de recuperação (BROOKS et al., 2019). Dessa forma, é esperado que com o desenvolvimento das mudas de *C. myrianthum* e *S. multijuga* na área de mineração de carvão em recuperação, as condições do solo estejam mais adequadas para o desenvolvimento de espécies mais exigentes, aumentando assim a diversidade de espécies vegetais no solo, e conseqüentemente a biomassa microbiana. Como foi demonstrado por Rocha-Nicoleite et al. (2018), o crescimento e estabelecimento de espécies arbóreas introduzidas influenciam positivamente a regeneração natural, sendo fundamentais nesse processo.



Em relação a atividade enzimática no solo, sabe-se que os atributos microbiológicos são sensíveis na percepção de mudanças na qualidade do solo, uma vez que se encontram diretamente relacionadas com a ciclagem dos nutrientes no solo. A atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase está relacionada com o ciclo do carbono no solo, atuando na etapa final da decomposição da celulose por hidrolisar os resíduos da celobiose (TABATABAI, 1994). Já a atividade da arilsulfatase está envolvida no ciclo do enxofre (S) e por meio da mineralização da forma orgânica libera sulfato, que é a forma assimilável pelas plantas (SCHINNER et al., 1996). A atividade enzimática da fosfatase ácida se encontra relacionada com o ciclo do fósforo (P) no solo.

De acordo com os resultados do presente estudo, a avaliação da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase não demonstrou ser um atributo promissor no monitoramento inicial dessas áreas, uma vez que os valores da atividade dessa enzima em áreas com estágio inicial de recuperação ou atingiram ou foram muito próximos daqueles encontrados nas áreas de referência. Diferentemente dos resultados verificados para a atividade da  $\beta$ -glicosidase, Silva et al. (2018) verificaram que mesmo após aproximadamente 11 anos do início da recuperação de uma área degradada pela mineração de ferro, os valores observados para a  $\beta$ -glicosidase eram metade dos encontrados em área de mata nativa que não sofreu processo de mineração. Chaer e Tótola (2007) também encontram valores para atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase muito superiores em área de mata nativa.

Por outro lado, a atividade da fosfatase em áreas de plantio de *S. multijuga* demonstram responder ao tempo de implantação do processo de recuperação, indo de acordo com resultados obtidos para a atividade dessa enzima em solos tropicais (HUANG et al., 2011; ZHANG et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2020). Entretanto, os resultados sugerem que atividade dessa enzima tenha sido influenciada pelo preparo da área, com alta atividade sendo detectada inicialmente em solos que receberam o plantio de *C. myrianthum*.

Áreas com plantio de *S. multijuga* demonstraram também responder à atividade da arilsulfatase ao longo do processo de revegetação, apresentando valores muito inferiores àqueles verificados nas áreas referências. Diferentemente, em áreas com plantio de *C. myrianthum*, não se verificou resposta desse atributo. Isso é um indicativo que essa enzima pode demorar mais tempo para sofrer modificações e um tempo mais prolongado de avaliação pode levar a conclusões mais robustas sobre essa variável. Em estudo realizado por Yada et al. (2015) em solos degradados pela mineração de estanho só verificaram valores semelhantes para a atividade da arilsulfatase entre uma área de mata nativa e uma área em processo de recuperação

após 10 anos do início da recuperação, demonstrando também a sensibilidade dessa enzima em captar mudanças na qualidade do solo.

No presente estudo foi também verificado uma atividade diferenciada das enzimas envolvidas na hidrólise do diacetato de fluoresceína nos solos construídos nas áreas de plantio do experimento. Em relação a hidrólise da DAF, no ensaio com *C. myrianthum* antes de implantar o experimento na área, havia uma heterogeneidade muito grande entre os locais de cada tratamento. Na segunda avaliação (300 DAT) foi possível observar que essa atividade passou por alterações em praticamente todos os tratamentos comparativamente ao tempo 0 DAT. Na última avaliação realizada (420 DAT) é possível verificar que os tratamentos de inoculação não modificaram significativamente os valores desse indicador de atividade microbológica. Esses resultados podem indicar que houve maior influência da espécie (*C. myrianthum*) nas mudanças verificadas na hidrólise do DAF no solo. Adicionalmente, essas diferenças no preparo da área podem também ter ocorrido nas áreas com plantio de *S. multijuga*, não havendo diferença do primeiro tempo de avaliação para as demais, porém diferenças significativas foram observadas entre as avaliações aos 300 e 420 DAT. Assim, é possível observar que a revegetação influenciou na atividade microbiana do solo indicada pela hidrólise do DAF mesmo com pouco tempo de recuperação. Adicionalmente, é também possível verificar que a hidrólise do DAF em solo com plantio de ambas as espécies arbóreas foi muito menor aquele verificado nas áreas referências, mostrando-se uma variável sensível a ser considerada no monitoramento da recuperação dessas áreas. Venson et al. (2017) observaram em estudo em áreas degradadas pela extração de areia aluvial em processo de restauração, que a avaliação da DAF foi sensível e que apresenta potencial de uso no monitoramento da recuperação dessas áreas degradadas como uma medida integrativa.

Já em relação a RB do solo, em áreas com plantio de *C. myrianthum*, os maiores valores foram verificados na última avaliação (420 DAT). Em áreas com plantio de *S. multijuga*, a maioria dos tratamentos apresentaram aumento da atividade aos 300 para os 420 DAT, não apresentando diferença entre esses tratamentos no último período de avaliação. Os menores valores observados nos resultados obtidos para RB em ambas as espécies, podem estar relacionados com uma menor precipitação verificada nesse período. De uma forma geral, os valores médios obtidos no presente trabalho são similares aqueles encontrados em uma área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação (2 anos) por Silva et al. (2019). Nesse estudo os autores verificaram que mesmo após 12 anos após início de recuperação de uma área degradada pela mineração de carvão, os valores de respiração basal do solo ainda eram pelo

menos quatro vezes menores que na área referência, que se tratava de uma APP com ocorrência natural de uma espécie arbórea (*Mimosa scabrella*), com altos teores de MO no solo.

O  $qCO_2$  apresentou comportamento semelhante à respiração basal do solo nas respectivas espécies vegetais. Segundo Anderson e Domsch (1990) baixos valores para  $qCO_2$  estão relacionados com áreas que se encontram em um estágio avançado de equilíbrio. Os resultados obtidos nesse trabalho em relação ao quociente metabólico estão dentro da faixa de valores observados por Silva et al. (2019). Nesse mesmo trabalho, os autores observaram que o quociente metabólico na área após 12 anos do início da recuperação atingiu os valores observados na área referência de remanescente florestal. Entretanto, no presente trabalho foi verificado aumento no  $qCO_2$  aos 420DAT em áreas com plantio de *C. myrianthum*, não sendo verificadas diferenças entre os tratamentos de inoculação. De uma forma geral, seja pelo curto tempo de avaliação desde o início da implantação do processo de revegetação, seja pelo intervalo sazonal de avaliação utilizado, os valores verificados são superiores àqueles encontrados nas áreas referências.

Na região carbonífera de Criciúma, os resultados encontrados dão indícios que o processo de vegetação vem recuperando com êxito determinados atributos microbiológicos do solo, os quais seriam os últimos a serem recuperados em áreas em processo de reversão da degradação. Estes por sua vez, tanto são influenciados pelo processo como também podem influenciá-lo pela sua participação na melhoria nos atributos químicos e físicos do solo e até mesmo pela própria interação existente no meio biótico do solo, fornecendo, portanto, suporte para a sucessão ecológica nestes locais.

## 7.5 CONCLUSÕES

A coinoculação de MIX+FMA aumentou a taxa de sobrevivência nas mudas de *S. multijuga*, bem como foi capaz de afetar positivamente, em um curto intervalo de tempo, a biomassa microbiana do solo, especialmente o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) com plantio das espécies avaliadas no presente estudo (*C. myrianthum* e *S. multijuga*).

A atividade da fosfatase, e da arilsulfatase e da hidrólise do DAF e a biomassa microbiana do solo demonstram ser potenciais indicadores sensíveis para o monitoramento de áreas degradadas pela mineração de carvão em processo de recuperação uma vez que não atingiram os valores das áreas referências e apresentaram incrementos significativos ao longo do tempo de avaliação. Variáveis relacionadas à atividade microbiana do solo como a respiração basal e o quociente metabólico demonstram ser mais sensíveis à sazonalidade.

O monitoramento das áreas à longo prazo pode demonstrar o potencial da inoculação de MPCV em variáveis biométricas das espécies vegetais utilizadas nos programas de revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão em processo de recuperação, bem como em melhorias nos atributos microbiológicos relacionados aos ciclos biogeoquímicos do solo, como a atividade enzimática, auxiliando a estabelecer relações com o processo de sucessão desses locais.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C. et al. Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 847-850, 2016.
- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial ecology**, v. 58, n. 4, p. 921-929, 2009.
- AGRITEMPO. Sistema de monitoramento agrometeorológico. Disponível em: <https://www.agritempo.gov.br/>. Acesso em: 20 de outubro de 2021.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, 1995.
- ALEXANDRE, F. S. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Rhizophagus clarus*) and Rhizobacteria (*Bacillus subtilis*) Can improve the clonal propagation and development of teak for commercial plantings. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.
- ALOO, B. N.; MAKUMBA, B. A.; MBEGA, E. R. The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. **Microbiological Research**, v. 219, p. 26-39, 2019.
- ANDERSON, T.; DOMSCH, K. H. Application of eco-physiological quotients ( $qCO_2$  and  $qD$ ) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil biology and Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 251-255, 1990.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient of  $CO_2$  ( $qCO_2$ ) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition, such as pH, on the microbial of forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.
- ANDERSON, J. D.; STAHL, P. D.; INGRAM, L. J. Influence of mineland reclamation practices on microbial community recovery and soil organic carbon accumulation. In: **Proceedings of a Joint Conference of American Society of Mining and Reclamation and 21st Annual National Conference and 25th West Virginia Surface Mine Drainage Task Force Symposium**. American Society of Mining and Reclamation, Lexington, KY. 2004. p. 74-86.
- BÅÅTH, E. et al. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 229-240, 1995.
- BAGYARAJ, D. J. Mycorrhizal fungi. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, n. 2, p. 415-428, 2014.
- BAKSHANDEH, E. et al. Plant growth promoting microorganisms can improve germination, seedling growth and potassium uptake of soybean under drought and salt stress. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 1, p. 123-136, 2020.

BARDGETT, R. D.; VAN DER PUTTEN, W. H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 505-511, 2014.

BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 171-189, 2012.

BIZUTI, D. T. G. **É possível reverter a degradação do solo provocada pela mineração de bauxita por meio da restauração florestal?** 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Esalq, Piracicaba, Universidade de São Paulo.

BLOCK, P. R. **Monitoring the Effects of Surface Coal-Mine-Reclamation on Soil Biological Properties**. 2019. Thesis (Master of Science) - Faculty of the North Dakota State University of Agriculture and Applied Science, North Dakota State University, 2019.

BRANCALION P. H. S. et al. Avaliação e monitoramento de áreas em processo de restauração. In: Martins SV, editor. **Restauração ecológica de ecossistemas degradados**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV; 2015.

BRASIL. Critérios para a recuperação ou reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão. Ação Civil Pública nº 93.8000533-4. 2008.

BRASIL. 12º Relatório de monitoramento dos indicadores ambientais. 2019. Disponível em: <<http://acpcarvao.com.br/login/index.php>> Acesso em: abril de 2021.

BROOKS, J. P. et al. Bacterial community structure recovery in reclaimed coal mined soil under two vegetative regimes. **Journal of environmental quality**, v. 48, n. 4, p. 1029-1037, 2019.

CAMPOS, M. L. et al. Impactos no solo provocados pela mineração e depósito de rejeitos de carvão mineral. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 2, p. 198-205, 2010.

CANEI, A. D. et al. Atributos microbiológicos e estrutura de comunidades bacterianas como indicadores da qualidade do solo em plantios florestais na Mata Atlântica. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1405-1417, 2018.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronosseqüências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 621-632, 2008.

CHAER, G. M.; TÓTOLA, M. R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1381-1396, 2007.

CHEN, Chen et al. Meta-analysis shows positive effects of plant diversity on microbial biomass and respiration. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2019.

COSTA, S. M. L.; MELLONI, R. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*). **Ciência Florestal**, v. 29, p. 169-180, 2019.

COSTA, S.; ZOCHE, J. J. Fertilidade de solos construídos em áreas de mineração de carvão na região sul de Santa Catarina. **Revista Árvore**, v. 33, n. 4, p. 665-674, 2009.

COTARELLI, V. M. et al. Comportamento de cinco espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica na restauração de áreas degradadas por pastagens em relevo de planície do litoral do Paraná, Brasil. In: **Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Simpósio Nacional Recuperação de Áreas Degradadas 7, 2008, Curitiba. Anais. Curitiba: SOBRAGE, 2008.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. **Science**, v. 359, n. 6373, p. 320-325, 2018.

DE SCHRIJVER, A. et al. Tree species traits cause divergence in soil acidification during four decades of postagricultural forest development. **Global Change Biology**, v. 18, n. 3, p. 1127-1140, 2012.

DICK, R. P.; BREAKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. **Methods for assessing soil quality**, v. 49, p. 247-271, 1997.

DILLY, O.; POMPILI, L.; BENEDETTI, A. Soil micro-biological indicators separated land use practices in contrast to abiotic soil properties at the 50 km scale under summer warm Mediterranean climate in northern Italy. **Ecological indicators**, v. 84, p. 298-303, 2018.

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

DOS SANTOS, D. C. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo construído após mineração de carvão e submetido a diferentes coberturas vegetais. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 3, 2008.

DURIGAN, G. Taxa de sobrevivência e crescimento inicial das espécies em plantio de recomposição da mata ciliar. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 35-40, 1990.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Phosphatases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Leicestershire, v. 9, n. 3, p. 167-172, 1977.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Leicestershire, v. 20, n. 5, p. 601-606, 1988.

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

FERREIRA, M. de C. et al. Cardinal temperatures and thermal requirements for the initial development of two Brazilian native species. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.

HERNÁNDEZ, A. G. et al. Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 7, p. 991-1001, 2017.

HERNÁNDEZ, A. G. et al. *Bradyrhizobium* and *Pseudomonas* strains obtained from coal-mining areas nodulate and promote the growth of *Calopogonium muconoides* plants used in the reclamation of degraded areas. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 2, p. 523-533, 2019.

HONG, S. et al. Afforestation neutralizes soil pH. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2018.

HUANG, W. et al. Effects of precipitation on soil acid phosphatase activity in three successional forests in southern China. **Biogeosciences**, v. 8, n. 7, p. 1901-1910, 2011.

INDA, A. V. et al. Atributos químicos relacionados ao processo de sulfurização em solos construídos após mineração de carvão. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1060-1067, 2010.

JU, W. et al. Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 218-226, 2019.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2010.

KHLIFA, R. et al. Do temperate tree species diversity and identity influence soil microbial community function and composition? **Ecology and evolution**, v. 7, n. 19, p. 7965-7974, 2017.

LANGE, M. et al. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2015.

LI, F. et al. Adaptation of plants to high-calcium content karst regions: possible involvement of symbiotic microorganisms and underlying mechanisms. **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, 2019.

LIMA, A. O. de S. **Respostas de paricá e clones de eucalipto à inoculação de fungos micorrízicos e rizobactérias em área de neossolo quartzarênico em São Domingos do Araguaia-PA**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018.

LONDO, A. J.; KUSHLA, J. D.; CARTER, R. C. Soil pH and tree species suitability in the south. **Southern Regional Extension Forestry**, v. 2, p. 1-5, 2006.



LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5ª edição. Nova Odessa: Editora Instituto Plantarum 352p, 2016.

MAIA, E. P. V. Respostas morfofisiológicas de Sabiá (*Mimosa Caesalpiniaefolia* Benth.) associado a Micorrizas arbusculares e rizóbios em solo de mineração de manganês. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal do Ceará, 2019.

MIRANDA, J. C. C.; MIRANDA, L. N. **Dependência micorrízica de diferentes culturas anuais, adubos verdes e pastagens em solos de cerrado**. Planaltina: Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2004.

MORAIS JUNIOR, V. T. M. et al. Early assessment of tree species with potential for carbon offset plantations in degraded area from the southeastern Brazil. **Ecological indicators**, v. 98, p. 854-860, 2019.

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

NOGUEIRA, M. A. et al. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 115, n. 1-4, p. 237-247, 2006.

PRAD – PLANO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. Planos de recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão, no estado de Santa Catarina, correspondentes às áreas da Extreviso S.A, de responsabilidade da União. Projeto Executivo Bloco 1 Área III Rio Pio. Criciúma, 2011.

PRIMIERY, S. et al. Soil carbon dynamics in native ecosystems and reforestation in Santa Catarina. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.

PROBANZA, A. et al. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 2, p. 140-148, 2001.

RAIESI, F.; SALEK-GILANI, S. The potential activity of soil extracellular enzymes as an indicator for ecological restoration of rangeland soils after agricultural abandonment. **Applied Soil Ecology**, v. 126, p. 140-147, 2018.

RESENDE, L. A. de et al. Crescimento e sobrevivência de espécies arbóreas em diferentes modelos de plantio na recuperação de área degradada por disposição de resíduos sólidos urbanos. **Revista árvore**, v. 39, p. 147-157, 2015.

ROCHA-NICOLEITE, E. **Processos iniciais de restauração ecológica em áreas degradadas por mineração de carvão**. 2015. Tese (Doutorado em Ecologia), Porto Alegre, 2015.

ROCHA-NICOLEITE, E.; OVERBECK, G. E.; MÜLLER, S. C. Degradation by coal mining should be priority in restoration planning. **Perspectives in ecology and conservation**, v. 15, n. 3, p. 202-205, 2017.

ROCHA-NICOLEITE, E. et al. Forest restoration after severe degradation by coal mining: lessons from the first years of monitoring. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 653-664, 2018.

RUKSHANA, F. et al. Organic anion-to-acid ratio influences pH change of soils differing in initial pH. **Journal of soils and sediments**, v. 14, n. 2, p. 407-414, 2013.

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

SANTOS, C. H. B. et al. Promoção do crescimento de mudas frutíferas por meio de microrganismos encapsulados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 3, 2018.

SCHÄFFER, L. H. et al. Crescimento de espécies arbóreas nativas em recuperação de área degradada no litoral do Paraná. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, 2020.

SCHINNER, F. et al. Methods in soil biology. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 4, n. 94, p. 311-312, 1996.

SILVA, E. E. da; DE AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. **Determinação do nitrogênio da biomassa microbiana do solo (BMS-N)**. Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007.

SILVA, D. K. A. et al. Soil microbial biomass and activity under natural and regenerated forests and conventional sugarcane plantations in Brazil. **Geoderma**, v. 189, p. 257-261, 2012.

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

SILVA, E. P. da et al. Soil attributes in coal mining areas under recovery with bracatinga (*Mimosa scabrella*). **Letters in applied microbiology**, v. 68, n. 6, p. 497-504, 2019.

SILVA, E. P. da. **Caracterização de bactérias endofíticas da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) e potencial aplicação em áreas de mineração de carvão em recuperação**. Tese (Doutorado em Ciências) – Recursos Genéticos Vegetais, UFSC. Florianópolis, 2020.

SOARES, C. R. F. S.; CARNEIRO, M. A. C. Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F. A.; CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**, v. 30, p. 441-474, 2010.

STOFFEL, S. C. G. et al. Micorrizas arbusculares no crescimento de leguminosas arbóreas em substrato contendo rejeito de mineração de carvão. **Cerne**, v. 22, n. 2, p. 181-188, 2016.

STUMPF, L. et al. Condição física e desenvolvimento radicular de gramíneas em solo construído após mineração de carvão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1078-1087, 2016.

SYSTAT SOFTWARE INC. SigmaPlot (r)-Scientific Data Analysis and Graphing Software. 2008.

TABATABAI, M. A.; BREMENER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Leicestershire, v. 1, p. 301-307, nov. 1969.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Assay of urease activity in soils. **Soil Biology and biochemistry**, v. 4, n. 4, p. 479-487, 1972.

TABATABAI, M. A. Soil enzyme. *In*: PAGE, A. L.; MILLER, E. M.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 903-947.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. *In*: WEAVER, R. V.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; SMITH, D. B. S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. **Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties**, v. 5, p. 775-833, 1994.

TEDESCO, M. J. et al. Análise de solo, plantas e outros materiais. *Boletim técnico*, 5. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

TEIXEIRA, P. C. et al. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: Embrapa. 573p, 2017.

TEIXEIRA, H. M. et al. Linking vegetation and soil functions during secondary forest succession in the Atlantic forest. **Forest Ecology and Management**, v. 457, p. 117696, 2020.

THOMLOUDI, E. E. et al. Multistrain versus single-strain plant growth promoting microbial inoculants-The compatibility issue. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 12, n. 2, p. 61-77, 2019.

TYLER, G.; OLSSON, T. Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. **Plant and Soil**, v. 230, n. 2, p. 307-321, 2001.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. Microbial biomass measurements in forest soils: determination of kc values and tests of hypotheses to explain the failure of the chloroform fumigation-incubation method in acid soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 689-696, 1987.

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

VIEIRA, A. R. R.; FEISTAUER, D; SILVA, V. P. da. Adaptação de espécies arbóreas nativas em um sistema agrossilvicultural, submetidas a extremos climáticos de geada na região de Florianópolis. **Revista Árvore**, v. 27, p. 627-634, 2003.

ZANON, J. A. et al. Impacto de la extracción de arena: Un estudio de caso del crecimiento inicial de especies forestales para la recuperación de áreas degradadas. **Bosque (Valdivia)**, v. 42, n. 1, p. 111-120, 2021.

ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. **AcS catalysis**, v. 5, n. 8, p. 4503-4513, 2015.

ZOUGARI-ELWEDI B. et al. Responses of date palm seedling to co-inoculation with phosphate solubilizing bacteria and mycorrhizal arbuscular fungi. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 581, 2019.

YADA, M. M. et al. Atributos químicos e bioquímicos em solos degradados por mineração de estanho e em fase de recuperação em ecossistema amazônico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 714-724, 2015.

YANG, Y. et al. Long-term changes in soil pH across major forest ecosystems in China. **Geophysical Research Letters**, v. 42, n. 3, p. 933-940, 2015.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A prática de coinoculação de MIX+FMA (*Rhizobium* sp. (UFSC-B8) + *Pseudomonas* sp (SC5) + *Pantoea* (MSR2) + inoculante comercial a base de fungo micorrízico *Rhizophagus intraradices*) deve ser avaliada para as demais espécies vegetais utilizadas em programas de revegetação de áreas degradadas pela mineração de carvão, uma vez que, apresentou resultados positivos na sobrevivência das mudas de *Senna multijuga* e na biomassa microbiana do solo em área de mineração de carvão em processo inicial de recuperação.

Estudos futuros visando a coinoculação de R+E1+F (*Rhizobium* sp. (UFSC-B8) + *Pseudomonas* sp (SC5) + inoculante comercial a base de fungo micorrízico *Rhizophagus intraradices*) em mudas de *Mimosa scabrella* e a coinoculação de E1+E2+F (*Pseudomonas* sp (SC5) + *Pantoea* (MSR2) + inoculante comercial a base de fungo micorrízico *Rhizophagus intraradices*) em mudas de *Schinus terebinthifolius* a fim de verificar o potencial dessas combinações em promover o crescimento das respectivas espécies em condições de viveiro e a campo.

O monitoramento das áreas experimentais a longo prazo pode trazer uma melhor compreensão sobre os efeitos da inoculação de microrganismos promotores do crescimento vegetal no crescimento das espécies arbóreas avaliadas e nas melhorias na qualidade do solo.

**ANEXO A – Autorização do Ministério Público Federal para a realização de  
experimento em Área de Preservação Permanente (APP) no município de Treviso –  
Área III/Rio Pio**



**MPF** Procuradoria  
do República em  
Santa Catarina  
Ministério Público Federal  
PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM CRICIÚMA

**ATA DE REUNIÃO**

Aos 26 dias do mês de junho de 2018, às 14 horas, estiveram presentes na Procuradoria da República de Criciúma, em reunião com o Procurador da República DERMEVAL RIBEIRO VIANNA FILHO e o engenheiro Ambiental Tiago Luiz Costa da Silva, representantes da CPRM, senhor Albert T. Cardoso e Giovani de Costa, da UFSC, Professor Cláudio Soares e Bióloga Edilane Rocha Nicolete, da empresa Retroterra Sr. Ney Colombo, para discutir uso de parte de uma área em recuperação sob responsabilidade da União (Área III-Rio Pio) para fins de pesquisa pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

**Resumo da reunião:** Iniciada a reunião, explanou-se o objetivo do estudo da UFSC: "visa verificar as melhores espécies vegetais para utilização em projetos de recuperação ambiental em áreas onde houve exploração de carvão". Solicitou-se a autorização de utilização de parte da área para realização de experimento em Rio Pio, deixando temporariamente parte da APP próxima ao Rio Pio apenas com vegetação rasteira, bem como um pequeno polígono fora da APP. O projeto de estudo visa promover a introdução de microorganismos para estimular o processo de crescimento de espécies vegetais. Seriam produzidas 2.000 mudas de 4 espécies pioneiras. Detalhou-se que as áreas de 215 x 28 metros de APP, onde houve a retirada de rejeitos, será utilizada para a introdução de arbóreas e a área de 50 x 50 metros, fora da APP, com recompactação de argila sobre camada de estêreis, somente para arbustivas e espécies herbáceas. Solicitou-se a dilação do prazo para conclusão das obras nessas áreas, para que ocorra o plantio das mudas em janeiro de 2019 (o restante das obras será finalizado ainda em 2018). Foi informado que o projeto piloto poderá, eventualmente, ser utilizado para recuperação ambiental em outras áreas degradadas. O Procurador da República sugeriu que a



**MPF** Procuradoria  
da República em  
Santa Catarina  
Ministério Público Federal

PROCURADORIA DA REPÚBLICA EM CRIÇIÚMA

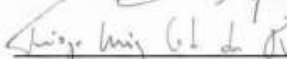
ação fosse comunicada à comunidade envolvida a fim de deixá-la ciente acerca das medidas e experimentos, além do que os proprietários devem estar cientes da intervenção.

Restou decidido que será concedida a prorrogação do prazo para conclusão das obras nas áreas mencionadas, devendo a CPRM e os representantes da UFSC apresentarem o projeto, com o cronograma, ao Procurador da República.

Nada mais havendo, foi encerrada a reunião.

  
DERMEVAL RIBEIRO VIANNA FILHO

Procurador da República



Tiago Luiz Costa da Silva

Engenheiro Ambiental/MPF



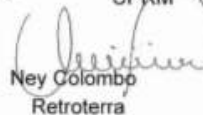
Cláudio Soares  
UFSC



Gibvani de Costa  
CPRM



Albert T. Cardoso  
CPRM



Ney Colombo  
Retroterra



Edilaine Rocha Nicolete  
Bióloga