



ANDRÉ ALVES DE SOUZA

**N₂-FIXATION AND PHOSPHATE SOLUBILIZATION
EFFICIENCIES, ADAPTABILITY AND RELATED
FUNCTIONAL GENES, IN BACTERIAL STRAINS ISOLATED
FROM SOILS WITH HIGH CONTENTS OF Fe**

**LAVRAS - MG
2023**

ANDRÉ ALVES DE SOUZA

**N₂-FIXATION AND PHOSPHATE SOLUBILIZATION EFFICIENCIES,
ADAPTABILITY AND RELATED FUNCTIONAL GENES, IN BACTERIAL
STRAINS ISOLATED FROM SOILS WITH HIGH CONTENTS OF Fe**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Microbiológicos do Solo, para a obtenção do título de Doutor

Prof^ª. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS –MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, André Alves de.

N₂-fixation and phosphate solubilization efficiencies,
adaptability and related functional genes, in bacterial strains isolated
from soils with high contents of Fe / André Alves de Souza. - 2022.
94 p.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.
Bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Solubilização de fosfato.
3. Prospecção de genes. I. Moreira, Fatima Maria de Souza. II.
Título.

ANDRÉ ALVES DE SOUZA

**N₂-FIXATION AND PHOSPHATE SOLUBILIZATION EFFICIENCIES,
ADAPTABILITY AND RELATED FUNCTIONAL GENES, IN BACTERIAL
STRAINS ISOLATED FROM SOILS WITH HIGH CONTENTS OF Fe**

**EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE N₂ E DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO,
ADAPTABILIDADE E GENES FUNCIONAIS RELACIONADOS, EM ESTIRPES DE
BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SOLOS COM ALTO TEOR DE Fe**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Microbiológicos do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 16 de novembro de 2022

Dra. Elaine Martins da Costa	UFPI
Dr. Rubens Manoel dos Santos	UFLA
Dra. Silvia Maria Oliveira Longatti	UFLA
Dr. Osnar Obede da Silva Aragão	UFLA

Prof^ª. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS –MG
2023**

A minha mãe Luzia, a grande responsável por esta conquista
A minha querida avó Margarida (in memoriam)
A meu querido tio João (in memoriam)
Ao meu pai Aparecido (in memoriam) por todo suporte
Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de estar aqui e concluir mais uma importante etapa em minha vida.

Aos meus familiares: minhas irmãs Katia e Eliana, meus sobrinhos Karine, Wanderson, Lidylaine, Renato, Felipe e Marco Antônio e meus cunhados Jacson e Sinomar

Agradeço a Prof^{ra}. Fatima Maria de Souza Moreira pela oportunidade de ter sido seu orientado durante estes 4 anos, e sempre ter sido tão paciente e compreensiva comigo

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq pelo apoio financeiro

A Universidade Federal de Lavras – UFLA, pelo apoio institucional

Ao Departamento de Ciência do Solo DCS – UFLA por todo suporte técnico/institucional

Ao Programa de Pós - Graduação em Ciência do Solo DCS – UFLA por todo suporte e acolhimento

A Aline de Oliveira, Juliana Volpi, Amanda Costa e Juliana Costa por terem me dado oportunidade em dar continuidades a seus respectivos trabalhos

Aos técnicos dos laboratórios do DCS, em especial a Marlene, o Paulo, a Aline e a Livia por todo o apoio, assim como toda equipe de apoio do DCS em especial o Pezão e o Milton por toda a ajuda

Aos professores do DCS por todo conhecimento compartilhado nas aulas assim como todo suporte durante esta trajetória, em especial ao Prof. Nilton, Prof. Douglas e ao Prof. Bruno Montoani

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Processos Microbianos do Solo, em especial ao Osnar, Daniele, Rafael, Damiane, Jordana, Lucas e Kaul, grandes amigos que foram fundamentais não só na parte prática de condução dos experimentos como nos momentos de descontração essenciais para a conclusão dessa importante etapa

Ao Viveiro de Mudas Nordeste pela concessão das sementes de *Machaerium Nictitans*

Ao Alisson da Acácia Amarela, produção de mudas e consultoria ambiental

A Vale S/A pelo fornecimento da lista de espécies utilizados em seus projetos de recuperação

Ao Professor Eduardo Gusmão por todo auxílio nos experimentos em casa de vegetação e pela concessão das sementes de *Paspalum Densum*

Ao Departamento de Ciências Florestais DCF – UFLA pela concessão das sementes de *Enterolobium contortisiliquum*

Aos meus grandes amigos Cesar e Arnon, essenciais na condução dos experimentos e também para os momentos de descontração

Aos meus amigos da disciplina de física do solo, Isabela, Everton e Pedro
Ao Instituto Federal do Pará pelo suporte principalmente nessa reta final
Enfim a todos de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa importante etapa de
minha vida

A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade; fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhorar a própria sorte”

Ernest Renan

RESUMO GERAL

Um dos grandes desafios no processo de recuperação de áreas degradadas é o fornecimento de nitrogênio (N) e fósforo (P) junto com a necessidade de aumentar os teores de matéria orgânica. Neste sentido o emprego de gramíneas nativas em associação com bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) junto com a associação simbiótica entre leguminosas arbóreas e bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN), aparece como uma boa alternativa para suprir esta necessidade. Porém a carência de estudos com espécies vegetais melhor adaptadas as condições onde serão empregadas em associação com estirpes nativas, se torna o grande empecilho para a expansão do emprego dessa combinação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de BFNN e BSF em associação com *Enterolobium contortisiliquum* e *Paspalum densum* respectivamente e a prospecção de genes de bactérias eficientes na FBN e na solubilização de P. A eficiência simbiótica das BFNN foi avaliada em casa de vegetação em condições axênicas com a inoculação de 39 estirpes do gênero *Bradyrhizobium* comparadas com uma estirpe eficiente e controles sem inoculação. Posteriormente, 12 estirpes selecionadas entre as 39, foram avaliadas em condição de solo não estéril proveniente de uma área de mineração de ferro, utilizando os mesmos controles do ensaio anterior. Para avaliar a eficiência das BSF, inicialmente foi realizado um teste de solubilização *in vitro* com 58 estirpes inoculadas em meio GELP contendo FePO₄, comparadas com um controle sem inoculação. Destas 58 estirpes, nove foram selecionadas para a realização de um ensaio com o solo de uma área de mineração, em associação com *Paspalum densum* e tendo como controles fontes solúveis ou insolúveis de P sem inoculação. Quatro estirpes foram selecionadas com base nos ensaios em solo para o estudo do DNA genômico. Os ensaios com BFNN mostraram que plantas inoculadas com as estirpes selecionadas para o sequenciamento do DNA genômico tiveram alta eficiência simbiótica em associação com *Enterolobium contortisiliquum*, evidenciado pelo bom desempenho nas variáveis analisadas. A análise do DNA genômico mostrou a presença de importantes genes ligados a tolerância as condições de altos teores de Fe e Mn, como os genes *pin5*, *acdS*, *sodA*, *bfr*, *gshB* e *gor*. Os ensaios com BSF mostraram um bom desempenho de três das quatro estirpes selecionadas para análise do DNA genômico, dentre elas a estirpe UFLA 219 do gênero *Burkholderia* havia apresentado também o melhor desempenho no teste *in vitro*. O DNA genômico das BSF mostrou a presença de um série de genes ligados ao mecanismo de solubilização de fosfato com destaque para os genes relacionados a liberação de ácidos orgânicos. Dessa forma foi demonstrado que o sucesso da associação entre bactérias promotoras de crescimento e as plantas inoculadas, dependem de genes relacionados a mecanismos mais específicos na promoção de crescimento, mais também de genes que conferem maior adaptabilidade as estirpes estudadas.

Palavras-chave: Genoma, Fixação biológica de nitrogênio. Solubilização de fosfato. *Enterolobium contortisiliquum*. *Paspalum densum*

GENERAL ABSTRACT

One of the great challenges in the recovery process of degraded areas is the supply of nitrogen (N) and phosphorus (P) together with the need to increase the levels of organic matter. In this sense, the use of native grasses in association with phosphate-solubilizing bacteria (BSF) together with the symbiotic association between tree legumes and noduliferous N₂-fixing bacteria (BFNN), appears as a good alternative to meet this need. However, the lack of studies with plant species better adapted to the conditions where they will be used in association with native strains, becomes the major obstacle to the expansion of the use of this combination. The objective of this work was to evaluate the efficiency of BFNN and BSF in association with *Enterolobium contortisiliquum* and *Paspalum densus* respectively and the prospection of genes of bacteria efficient in BFN and P solubilization. The symbiotic efficiency of BFNN was evaluated in a greenhouse under conditions axenic strains with the inoculation of 39 strains of the genus *Bradyrhizobium* compared with an efficient strain and controls without inoculation. Subsequently, 12 strains selected among the 39 were evaluated in non-sterile soil from an iron mining area, using the same controls as in the previous test. To evaluate the efficiency of BSF, an *in vitro* solubilization test was initially performed with 58 strains inoculated in GELP medium containing FePO₄, compared with a control without inoculation. Of these 58 strains, nine were selected to carry out a test with soil from a mining area, in association with *Paspalum densus* and having as controls soluble or insoluble sources of P without inoculation. Four strains were selected based on soil assays for the study of genomic DNA. Assays with BFNN showed that plants inoculated with strains selected for genomic DNA sequencing had high symbiotic efficiency in association with *Enterolobium contortisiliquum*, evidenced by the good performance in the analyzed variables. Genomic DNA analysis showed the presence of important genes linked to tolerance to high Fe and Mn conditions, such as *pin5*, *acdS*, *sodA*, *bfr*, *gshB* and *gor* genes. The tests with BSF showed a good performance of three of the four strains selected for genomic DNA analysis, among them the UFLA 219 strain of the genus *Burkholderia*, which had also presented the best performance in the *in vitro* test. The genomic DNA of the BSF showed the presence of a series of genes linked to the phosphate solubilization mechanism, with emphasis on the genes related to the release of organic acids. In this way, it was demonstrated that the success of the association between growth-promoting bacteria and the inoculated plants depends on genes related to more specific mechanisms in the promotion of growth, but also on genes that confer greater adaptability to the studied strains.

Keywords: Genome, Biological nitrogen fixation. Phosphate solubilization. *Enterolobium contortisiliquum*. *Paspalum densus*

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Impactos da atividade de mineração e legislação vigente.....	13
2.2	Técnicas empregadas no processo de recuperação de áreas degradadas.....	15
2.3	Uso de leguminosas no processo de restauração.....	17
2.3.1	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	19
2.4	Uso de gramíneas no processo de restauração.....	20
2.4.1	<i>Paspalum densum</i>	21
2.5	Papel das bactérias no processo de restauração.....	22
2.5.1	Solubilização de fosfatos e fixação biológica de nitrogênio por BPCPs.....	23
2.5.2	Prospecção de genes de BPCPs.....	26
	REFERÊNCIAS.....	29
	SEGUNDA PARTE.....	37
	ARTIGO 1 - N ₂ -fixation efficiency, adaptability and functional genes of <i>Bradyrhizobium</i> strains isolated from soils with high contents of Fe and Mn.....	37
1	INTRODUÇÃO.....	39
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3	RESULTADOS.....	44
4	DISCUSSÃO.....	47
5	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	50
	ARTIGO 2 - Promotion of growth and accumulation of P in <i>Paspalum densum</i> and genomic annotation of phosphate solubilizing bacteria isolated from iron mining areas.....	66
1	INTRODUÇÃO.....	68
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3	RESULTADOS.....	74
4	DISCUSSÃO.....	76
5	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	80
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A exploração mineral é uma das atividades que mais contribui para a qualidade de vida da sociedade contemporânea, sendo considerada um dos setores básicos para o desenvolvimento econômico e social de muitos países, inclusive o Brasil. Produtos minerais e derivados movem a economia da atualidade e estão presentes em necessidades básicas como agricultura, habitação, transporte, infra-estruturas de saneamento, meios de comunicação e desenvolvimento tecnológico (CARVALHO, 2011).

O Brasil é caracterizado por uma geodiversidade impressionante que confere uma capacidade substancial para a produção mineral, colocando o país em pé de igualdade com as principais potências mundiais em mineração, como EUA, Rússia, Canadá, Austrália e África do Sul (SOUZA et al., 2016). Segundo o Instituto Brasileiro de Mineração (IBRAM) em 2017 foram produzidos mais de 2 bilhões de toneladas de minérios gerando um faturamento de US\$ 32 bilhões, dos quais US\$ 28,3 bilhões foram provenientes das exportações, representando 4,2 % do PIB brasileiro. Esses valores mostram um pouco da importância do setor para a economia nacional.

Porém a mineração afeta diretamente os ecossistemas, causando alterações na topografia e nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, na vegetação e na dinâmica hídrica do solo. Também elimina muitas espécies da fauna silvestre ou modifica seus habitats. O rompimento dos ciclos de nutrientes e o empobrecimento do solo causado pela mineração é consequência do esgotamento da matéria orgânica e da perda de nutrientes pelo aumento da lixiviação e erosão. Assim, a reabilitação de solos degradados requer o suprimento de nutrientes e reposição de matéria orgânica (TEIXEIRA; JOSÉ DE MELO; TOMÉ SILVA, 2007)

A Organização das Nações Unidas (ONU, 2015) divulgou em 2015 a chamada Agenda 2030, um plano de ações composto por 17 objetivos e 169 metas, visando a implementação de um projeto de desenvolvimento sustentável em escala mundial. Entre os objetivos descritos neste plano está a ODS15 referente a proteção, recuperação e promoção do uso sustentável dos ecossistemas terrestres. Em resumo a ODS15 até 2030 assegura a conservação, recuperação e uso sustentável dos ecossistemas terrestres, promovendo a implementação de uma gestão sustentável de todos tipos de florestas, detendo o desmatamento e restaurando florestas degradadas.

Neste contexto o aumento da demanda global por metais em sociedades industriais impulsionando a crescente produção de minérios, junto com o compromisso com o processo de recuperação ambiental governado por lei, leva a necessidade de medidas que visem uma mitigação dos impactos negativos da mineração sobre o meio ambiente. Dentre estas medidas o emprego de bactérias com potencial na promoção de crescimento de espécies vegetais nativas utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas pela mineração, aparece como uma biotecnologia sustentável.

Em muitas áreas degradadas pela mineração o que se nota não é mais solo, mais uma matriz de material mineral, de pobre estrutura física, pouca ou nenhuma matéria orgânica e uma quantidade muito pequena de nutrientes para as plantas. Com isso nessas áreas se faz necessário um processo de formação do solo que é resultado de muitos processos e interações físicas, químicas e biológicas em condições climáticas locais por longos períodos de tempo. Se uma cobertura vegetal puder ser estabelecida, inicia este processo de formação do solo por meio das alterações químicas, físicas e biológicas do próprio solo, promovidas pela atividade no ambiente rizosférico das raízes (HUANG; BAUMGARTL; MULLIGAN, 2012).

Neste sentido os microrganismos exercem um importante papel uma vez que estão substancialmente envolvidos na decomposição da matéria orgânica, na transferência de energia e contribui para os ciclos biogeoquímicos de todos nutrientes importantes, sendo o restabelecimento das comunidades microbianas do solo um pré-requisito para a recuperação bem-sucedida de áreas degradadas pela atividade de mineração (CHODAK; NIKLI, 2010). Porém para que ocorra este restabelecimento muitas vezes se faz necessário a reintrodução de microrganismos adaptados as condições edafoclimáticas da área a ser reabilitada e compatíveis com espécies vegetais alvo.

O emprego de importantes espécies nativas utilizadas na recuperação de áreas degradadas como a leguminosa *Enterolobium contortisiliquum* e a gramínea *Paspalum densum* em associação com bactérias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato, aparece como uma importante alternativa para iniciar este processo de restabelecimento do ciclo biogeoquímicos de dois importantes nutrientes como o fósforo e o nitrogênio. Porém o sucesso dessa associação depende entre outros fatores da compatibilidade genética entre as estirpes e a planta hospedeira assim como da capacidade das bactérias em realizar uma boa colonização da rizosfera que é a região do solo que compreende 3-5 mm do rizoplano (HILTNER 1904).

A prospecção de genes de bactérias eficientes na FBN e na solubilização de P aparece como uma importante ferramenta no sentido de elucidar o que determina o sucesso dessa

associação. Entre estes genes acredita-se que genes relacionados a tolerância ao excesso de Fe e Mn, genes simbióticos nas bactérias diazotróficas e genes relacionados a solubilização de fosfatos nas BSF possam elucidar este fato.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas e solubilizadoras de fosfato sobre *Enterolobium contortisiliquum* e *Paspalum densum* respectivamente, utilizadas no processo de recuperação de áreas de mineração degradadas. Além disso o trabalho teve por objetivo através da análise do DNA genômico, a prospecção de genes de bactérias eficientes na FBN e na solubilização de P.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Impactos da atividade de mineração e legislação vigente

As atividades de mineração tem uma grande importância na geração de riquezas e bem estar socioeconômico, porém também são responsáveis por mudanças abruptas no uso da terra em todo o mundo. Embora a extensão espacial da degradação da terra pela mineração seja menor do que a de outras mudanças no uso da terra, tais como agricultura, pecuária, exploração florestal, projetos hidrelétricos e de transporte, entre outros, sua intensidade é maior na mineração devido à completa supressão da vegetação, remoção de camadas de solo superficial e eventual contaminação de solos por resíduos tóxicos (GASTAUER et al., 2019). Ainda impactos ambientais externos da mineração de superfície podem ser muito extensos, devido à erosão e ao escoamento, resultando em assoreamento e deterioração da qualidade da água em rios, lagos e reservatórios próximos (PARROTTA; KNOWLES, 2001).

A mineração também causa um desmatamento além da área de extração, sendo este muitas vezes mais extenso e impactante, podendo se estender a distâncias de mais de 10 km além dos limites das áreas de extração, isso devido aos efeitos combinados do deslocamento do uso da terra, expansão e desenvolvimento das cadeias e fornecimento de mercadorias e preocupações com a descarga de resíduos de minas (SONTER et al., 2017), podendo em alguns casos remover permanentemente ecossistemas inteiros, particularmente onde a biota co-evoluiu com substratos minerais (SONTER; ALI; WATSON, 2018).

De acordo com a Constituição Brasileira, uma empresa de mineração é responsável por reparar os danos ambientais causados por sua atividade. A obrigação é “recuperar o meio

ambiente degradado, de acordo com a solução técnica exigida pela organização pública competente” (GOMES; MENDES; COSTA, 2011).

Para se obter o licenciamento ambiental da exploração são requeridas avaliações de risco ambiental e socioeconômico que descrevam detalhadamente os impactos significativos causados pelo empreendimento planejado, incluindo os efeitos sobre a biodiversidade, perda de recursos naturais e efeitos sociais ou socioeconômicos (Decreto 99 274/90, Lei 6938/81, Resolução CONAMA 237/1997). Com base nessas avaliações, destaca-se a magnitude da compensação ambiental (Lei 9985/2000, Decreto 4340/2002, Resolução CONAMA 371/2002). O Plano de Reabilitação de Áreas Degradadas (PRAD do Projeto de Recuperação de Áreas Degradadas) é um documento que descreve detalhadamente todas as atividades de reabilitação planejadas e realizadas. Atividades planejadas de reabilitação e outros passivos ambientais, isto é, compromissos ambientais para evitar, indenizar ou compensar riscos ou impactos futuros, são apresentados às agências licenciadoras (GASTAUER et al., 2019).

Apesar da obrigatoriedade tem-se constatado que as obrigações nem sempre são cumpridas e em muitos casos, a implementação de um plano de recuperação que satisfaz os critérios do órgão ambiental relevante não garante uma recuperação satisfatória. Neste sentido tem-se discutido amplamente na literatura o pagamento por serviços ecossistêmicos como forma de encorajar as empresas a adotarem técnicas de recuperação que sejam mais benéficas para o meio ambiente natural e para a população afetada pelas atividades de mineração (SOUZA et al., 2016).

Em um estudo conduzido por Sonter et al. (2016) na reserva de Vermont – EUA, os autores utilizaram um conjunto de dados de mídias sociais como fotos georreferenciadas

carregadas em sites de compartilhamento de fotos (por exemplo, Flickr) para investigar as preferências dos visitantes, observando entre outros pontos que pessoas de fora do estado eram mais dispostos a pagar pela conservação da reserva do que moradores da região, mostrando assim que a abertura de áreas recuperadas para visitação pode não só ser uma forma de incentivar a recuperação de áreas degradadas mas também de melhorar o bem-estar humano sem destruir os recursos naturais do nosso planeta, sendo este o grande desafio do século XXI (RICKETTS et al., 2016)

2.2 Técnicas empregadas no processo de recuperação de áreas degradadas

A recuperação de áreas degradadas pelas atividades de mineração compreende um conjunto de técnicas que vão desde a compreensão do ambiente degradado até a aplicação de técnicas pesquisadas e ajustadas ao novo meio ambiente (LONGO et al., 2010).

Um conceito de degradação muito aceito é o de Willians (1990) que aplica o termo aos casos em que haja destruição da vegetação e da fauna nativa, remoção e perda dos solos ou quando há alteração quantitativa ou qualitativa dos recursos hídricos. O autor também trata sobre “degradação ambiental”, e diz que esta ocorre quando o ambiente perde suas características naturais, bióticas ou abióticas, inviabilizando o desenvolvimento socioeconômico da região (CARVALHO, 2011).

Extensa pesquisa tem sido realizada em todo o mundo em vários aspectos da reabilitação de terras mineradas. Existem práticas recomendadas para o manejo do solo, controle da erosão, estabilização de taludes, seleção de espécies, coleta de sementes, criação e manutenção de viveiros, estratégias e técnicas de semeadura e plantio, controle de plantas daninhas, atração de fauna e outros aspectos das técnicas de reabilitação (NERI; SÁNCHEZ, 2010).

A falta de matéria orgânica constituiu um dos principais desafios para a recuperação de áreas degradadas pela mineração, por esse motivo técnicas que visam aumentar ou manter os teores de matéria orgânica no solo vem sendo cada vez mais exploradas (LONGO; RIBEIRO; DE MELO, 2011). Entre as técnicas mais utilizadas está o uso do solo superficial, retirado antes do início da atividade de mineração, este material além de ser uma fonte de matéria orgânica e microrganismos, funciona como banco de sementes (MACHADO et al., 2013), exercendo um importante papel no estabelecimento de espécies nativas e na melhoria das condições de crescimento para as plantas (MENSAH, 2015).

No entanto, foi demonstrado que o armazenamento de solo superficial em montes durante a extração de minerais afeta as propriedades biológicas, químicas e físicas do solo reduzindo sua qualidade do solo. Além disso, os estoques tornam-se anaeróbios e outros propágulos vegetais e as populações de microrganismos benéficos do solo são reduzidos significativamente (ALBERT, 2015). Com isso técnicas alternativas vem sendo estudadas como o uso de laterita moída (MACHADO et al., 2013), technossols (AHIRWAL; MAITI, 2018), lodo de esgoto (TEIXEIRA; JOSÉ DE MELO; TOMÉ SILVA, 2007), biochar (MORENO-BARRIGA et al., 2017) e turfa (BÉASSE; QUIDEAU; OH, 2015). Porém estas técnicas sempre apresentam alguma limitação seja pela acessibilidade ao material ou por não melhorarem a microbiota no solo.

Foi observado por Figueiredo et al. (2018a), que o uso de pequenas quantidades de solos de superfície associados ao plantio da espécie nativa leguminosa *Periandra mediterrânea*, melhoram o desenvolvimento e estabelecimento da espécie, mostrando o efeito inoculante dos solos de superfície, mesmo em pequena quantidade. Isso mostra em um primeiro momento a importância de buscar alternativas para reintroduzir microrganismos essenciais para o processo de recuperação de áreas degradadas, entre eles as bactérias fixadoras de nitrogênio, em um segundo momento mostra a importância da escolha das espécies a serem introduzidas no processo de restauração (GASTAUER et al., 2018).

A revegetação definida como o processo de estabelecimento da vegetação e de cuidados posteriores, exerce um importante papel no processo de recuperação, reabilitação ou restauração (ALBERT, 2015). A revegetação destina-se a incentivar o desenvolvimento do solo das minas, a produzir paisagens agradáveis e a aumentar a produtividade dos ecossistemas para melhorar a sustentabilidade das operações de mineração. Como o rápido crescimento e fechamento da vegetação são necessários para o controle da erosão e a estabilização do local, as espécies vegetais de rápido crescimento são necessárias do ponto de vista técnico (GASTAUER et al., 2018). Neste sentido o uso de espécies pioneiras nativas é uma interessante estratégia em um primeiro estágio da restauração.

Espécies pioneiras são muito importantes no processo de sucessão ecológica, na medida em que são menos exigentes em relação ao solo e possuem ciclos de vida mais curtos que espécies secundárias. Estas espécies de crescimento rápido que fornecem proteção do solo e condições de microclima que são necessários para o estabelecimento de espécies que pertencem a etapas sucessionais posteriores. Estas espécies facilitam a sucessão natural e seus frutos servem como um atrativo para a fauna integrada, traz sementes de outras áreas (GRIS; TEMPONI; MARCON, 2012).

Um outro importante aspecto com relação a sucessão ecológica é de não empregar espécies exóticas, pois dependendo das condições do meio podem se tornar invasoras, causando danos à biodiversidade, ecossistemas, economia ou saúde humana. O domínio de plantas invasoras em áreas de mineração em processo de recuperação, geralmente são acompanhadas por um declínio das espécies nativas, que são cruciais para o processo de sucessão secundária (GASTAUER et al., 2018). Dessa forma tem sido cada vez mais priorizado nos programas recuperação de áreas degradadas, o emprego de espécies nativas, visando a restauração ecológica que são essenciais para acelerar a recuperação da estrutura do ecossistema e suas

funções em locais de pós mineração, alcançando assim ecossistemas auto sustentáveis (AHIRWAL et al., 2018; AHIRWAL; MAITI, 2018; GRIS; TEMPONI; MARCON, 2012).

No entanto, há pouco conhecimento sobre as espécies nativas mais indicadas para o reflorestamento local, especialmente em áreas pouco conhecidas floristicamente. Isso leva ao uso de espécies exóticas, favorecendo a contaminação biológica local e aumentando a degradação (GRIS; TEMPONI; MARCON, 2012). O uso de espécies nativas adaptadas a esses terrenos, que apresentam sérios problemas biológicos, físicos e químicos é um aspecto de grande importância, já que a não seleção dessas espécies mesmo que existam em abundância nas áreas circundantes implica em uma grande mortalidade dos indivíduos durante o plantio culminando em um baixo estabelecimento das espécies nativas empregadas (LONGO et al., 2010).

2.3 Uso de leguminosas no processo de restauração

A recolonização primária por espécies de leguminosas é uma estratégia natural do ecossistema para a recuperação de áreas florestais após o processo de desmatamento (CHAER et al., 2011). O principal desafio durante o processo de revegetação, é o estabelecimento de espécies vegetais nativas que rapidamente acumulem biomassa, matéria orgânica, nutrientes no solo, criando assim uma cobertura vegetal estável (SILVA et al., 2018). Espécies de leguminosas utilizadas como pioneiras cumprem bem deste papel uma vez que enriquecem o solo com matéria orgânica, com alto teor de nitrogênio e conseqüentemente permitem o estabelecimento de outras espécies no processo e sucessão ecológica (TOMA et al., 2017). Macedo et al. (2008) buscando avaliar as mudanças nos estoques de C e N de uma área em processo de reabilitação por 13 anos com o plantio de mudas das espécies leguminosas *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Paraserianthes falcataria*, observaram que os estoques de C e N na área em processo de recuperação era semelhante aos estoques na área nativa de referência (Tabela 1), mostrando a importância do emprego das leguminosas para restabelecer os processos de ciclagem dos nutrientes.

Leguminosas são consideradas importantes na revegetação de áreas degradadas pela mineração também pela sua capacidade de realizar interações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio pelo desenvolvimento de nódulos nas raízes. A fixação biológica de nitrogênio contribui significativamente para a incorporação de N no sistema degradado,

portanto a inclusão de espécies leguminosas nos programas de revegetação reduz os custos da restauração com fertilizantes nitrogenados (SILVA et al., 2018).

Tabela 1- Estoques de C e N em todo perfil de solo recuperado com as espécies *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Paraserianthes falcataria*, mata nativa e área não recuperada em Angra dos Reis -RJ

Profundidade	Área recuperada	Floresta Nativa	Área não recuperada
Estoque de C (Mg ha ⁻¹)			
0-5 ^{ns}	10,9	12,0	7,1
5-10 ^{ns}	10,6	10,9	7,2
10-20 ^{ns}	19,7	21,7	13,3
20-30 ^{ns}	15,9	16,8	11,0
30-40 ^{ns}	14,4	17,9	10,1
40-60 ^{ns}	21,5	34,1	19,8
0-30 ^{ns}	54,8	58,3	35,4
0-60	88,1ab	107,7a	65,1b
Estoque de N (Mg ha ⁻¹)			
0-5 ^{ns}	0,94	1,17	0,59
5-10 ^{ns}	0,92	1,00	0,52
10-20	1,67a	1,70a	0,99b
20-30	1,41ab	1,57a	0,94b
30-40 ^{ns}	0,98	1,27	0,97
40-60	1,75b	2,54a	1,96ab
0-30 ^{ns}	5,0a	5,4a	3,0b
0-60 ^{ns}	7,7ab	9,1a	6,0b

Os números seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes de acordo com o teste t de Bonferroni (P<0,05). Ns= não significativo pelo teste de Bonferroni

Fonte: Adaptada de Macedo et al. (2008)

Além disso o nitrogênio de leguminosas (N orgânico) é preferido nos processos de síntese microbiana de substâncias húmicas. Dessa forma o emprego de plantas leguminosas contribui para o aumento dos teores de carbono devido a presença de uma matéria orgânica mais protegida ou complexada (PAULUCIO et al., 2017). Um primeiro efeito deste incremento das substâncias húmicas seria uma melhoria da fertilidade do solo principalmente com o aumento da CTC, porém substâncias húmicas também são conhecidas por provocar um efeito similar nas plantas como dos fitormônios promotores de crescimento como as auxinas, por fim esta maior estabilidade do carbono serve como um serviço ecossistêmico com o sequestro de carbono (SOUZA et al., 2016).

Porém, como fontes de inoculo de rizóbio estão praticamente ausentes no subsolo, é importante o desenvolvimento de tecnologias para produzir mudas de leguminosas inoculadas com estirpes de rizóbio selecionados para a recuperação de áreas afetadas pela mineração

(CHAER et al., 2011). A seleção de estirpes é de fundamental importância porque alguns rizóbios tem uma especificidade estrita para determinada espécie leguminosa, sendo comum encontrar bactérias que tenham uma alta capacidade de fixar nitrogênio atmosférico quando associadas a uma dada leguminosa porém sendo incapazes de nodular ou fixar com outras espécies (MOURA et al., 2016).

Dessa forma espécies leguminosas que reúnem características como crescimento rápido das mudas, desenvolvimento no campo de rápido a moderado e uma eficiente associação com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas são de grande interesse principalmente nos estágios iniciais da recuperação de áreas degradadas, neste contexto espécies como *Enterolobium contortisiliquum*, que além de apresentar as características citadas acima apresenta características adicionais que valorizam seu emprego, mostrando seu grande potencial em projetos de restauração.

2.3.1 *Enterolobium contortisiliquum*

A *Enterolobium contortisiliquum* (orelha de negro) é uma espécie nativa com ampla distribuição no Brasil, tendo sua ocorrência relatada em quase todas regiões no Brasil exceto na região norte, abrangendo dessa forma os domínios fitogeográficos Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. A espécie pertence a subfamília Mimosoideae da família Leguminosae (LORENZI 2016).

Orelha de negro é uma espécie pioneira, muito empregada no reflorestamento de áreas degradadas, principalmente por seu rápido crescimento inicial, possui uma emergência de 10 a 20 dias com desenvolvimento no campo extremamente rápido (LORENZI 2016). Por possuir uma madeira leve, também é utilizada para fabricação de canoas, brinquedos, armação de moveis e caixotarias no geral, pois é de fácil manejo e acabamento (MELO et al., 2010; ARAÚJO; PAIVA SOBRINHO, 2017). Apresenta ainda uma boa capacidade de se estabelecer em áreas degradadas com excesso de metais (TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001) além de ser uma das leguminosas arbóreas tropicais com maior capacidade de estabelecer uma simbiose eficiente com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas, ao passo de possuir uma estirpe (BR 4406 *Bradyrhizobium* sp.) aprovada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2011).

Por toda sua importância a orelha de negro vem sendo bastante estudada buscando melhor compreender aspectos como a quebra de dormência de suas sementes (MALAVASI;

DE MATOS MALAVASI, 2004) germinação e produção de mudas (ARAÚJO; PAIVA SOBRINHO, 2017; ABREU et al., 2015) além de ensaios com bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas (JESUS et al., 2018; SOUSA et al., 2013).

Trannin, Moreira e Siqueira (2001) avaliando a eficiência simbiótica de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* em *Enterolobium contortisiliquum* observaram que tratamentos com a inoculação de estirpes *Bradyrhizobium* não diferiam do tratamento com adubação nitrogenada para os parâmetros matéria seca da parte aérea e da raiz. Além disso foi observado uma atividade da nitrogenase nos nódulos de até $2325 \text{ C}_2\text{H}_4 \text{ g nod}^{-1}\text{s}^{-1}$, confirmando a eficiência simbiótica de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* em *Enterolobium contortisiliquum*.

2.4 Uso de gramíneas no processo de restauração

Em complemento ao emprego das leguminosas o uso de gramíneas vem sendo amplamente usado em áreas degradadas. A combinação da mistura gramíneas e leguminosas criam um balanço de nitrogênio no solo auxiliada pela decomposição das partes secas das plantas que criam uma camada de serapilheira rica em nitrogênio. Gramíneas tem um sistema radicular fasciculado e fibroso que podem reduzir a erosão através da agregação das partículas soltas de solo (MAITI; MAITI, 2015). Já espécies leguminosas arbóreas possuem um sistema radicular pivotante e profundo, o que possibilita absorver elementos químicos de uma camada onde gramíneas não teriam acesso, melhorando os ciclos biogeoquímicos de importantes nutrientes para as plantas (PAULUCIO et al., 2017).

Gramíneas exibem um crescimento rápido e uma capacidade de gerar um grande número de descendentes dentro de um ciclo de vida curto (RIOS et al., 2017). Elas produzem uma grande quantidade de matéria seca, cobrindo o solo mais rápido, com sistema radicular com grande volume, são capazes de gerar bioporos transversais ao longo do perfil, minimizando os efeitos da compactação do solo. Estes bioporos podem melhorar a conectividade entre as camadas superficiais e subsuperficiais, favorecendo o fluxo vertical de água e a difusão de gás, além de servir como caminhos para a penetração das raízes das culturas subsequentes (STUMPF et al., 2014). Destaca-se ainda a importância das raízes finas na profundidade de 0 a 0,05 m, as quais juntamente com a matéria orgânica, envolvem os microagregados do solo, ao mesmo tempo em que atuam na formação e estabilização dos macroagregados (AMARAL et al., 2012). Stumpf et al. (2014), estudando o efeito do plantio de diferentes gramíneas na melhoria das propriedades físicas do solo de um área de mineração de carvão, observaram que

após 2 anos de implantação gramíneas nativas como a *Hemarthria altíssima*, quando comparado o controle com o solo nu, contribuíram significativamente para a melhoria de atributos como a estabilidade de macroagregados com um aumento de 16%, teor de matéria orgânica com um aumento de 27% e densidade do solo com uma redução de 10%, mostrando a importância do emprego das gramíneas na recuperação da estrutura física do solo.

Gramíneas apresentam uma grande riqueza de espécies, tendo a capacidade de se aclimatar a ambientes extremos, como solos rasos e distróficos, com baixa retenção de água, similar aos encontrados em ambientes degradadas. Por esta razão muitas destas espécies vem sendo indicadas no uso da recuperação de áreas degradadas. Porém o não uso de gramíneas nativas devido à falta de conhecimento sobre as práticas de manejo e a as formas de propagação, tem levado a utilização de espécies exóticas invasoras, o que pode trazer mais danos para as áreas em processo de recuperação (FIGUEIREDO et al., 2018b).

Como as gramíneas africanas amplamente utilizadas são selecionadas não apenas para a produção de forragem, mais também para a produção de sementes para o estabelecimento de novas pastagens, elas tem como potencial uma rápida colonização de áreas perturbadas deslocando gramíneas nativas de seu habitat natural. Ainda embora tenham uma mortalidade grande sua capacidade de germinação precoce torna-se um empecilho para o estabelecimento da gramíneas nativas (KLINK, 1996). Gramíneas nativas geralmente são de crescimento mais rasteiro, o que facilita a germinação e o estabelecimento de outras espécies em tais localidades, aumentando assim a diversidade na área e contribuindo para a eficiência do processo de sucessão local (FIGUEIREDO et al., 2018b).

Deste modo seria desejável em um processo inicial de restauração de uma área degradada, o emprego de gramíneas que reúnem características como serem nativas da área onde serão empregadas, terem estudos comprovando seu papel no processo de restauração e que preferencialmente tenham trabalhos mostrando uma eficiente associação com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Neste contexto gramíneas como *Paspalum densum* aparece como potencial espécie na recuperação de áreas degradadas nos Campos Rupestres Ferruginosos.

2.4.1 *Paspalum densum*

A *Paspalum densum* é uma espécie nativa com distribuição indo do estado do Paraná até o Pará, abrangendo os domínios fitogeográficos do Cerrado, da Mata Atlântica e da

Amazônia. A espécie pertence a subfamília Panicoideae da família das Poaceae (GOMES, 1995).

Levantamentos florísticos dos Campos Rupestres também tem apontado para a identificação de várias espécies do gênero *Paspalum* (MOURÃO et al., 2006; VIANA; LOMBARDI, 2007; VINCENT; MEGURO, 2008). Segundo Jacobi, Carmo e Vincent (2008), espécies rizomatosas como as gramíneas do gênero *Paspalum* contribuem para a estabilização de taludes, ao crescerem e espalharem pelo substrato.

Entre as espécies do gênero *Paspalum*, a espécie *Paspalum densum* se destaca por apresentar características favoráveis de resistência a níveis elevados de ferro disponível, com potencial uso para a revegetação de ambiente impactado pela deposição de rejeito e estéreis de mineração por ferro (SIQUEIRA-SILVA; RIOS; PEREIRA, 2019). Rios et al. (2017) avaliando a resistência de diferentes gramíneas a toxidez de ferro, observaram que mesmo em elevadas doses, plantas da espécie *Paspalum densum* não sofriam alterações nas taxas fotossintéticas, assim como na concentração de Fe nas folhas, mostrando o potencial da espécie na revegetação de áreas afetadas pela mineração de ferro.

O gênero *Paspalum* também é conhecido por suportar o crescimento de uma diversa comunidade de BPCPs, entre elas as fixadoras biológicas de nitrogênio. Dobereiner, Day e Dart (1972) descreveram uma específica associação entre uma bactéria fixadora de nitrogênio (*Azospirillum*) e a rizosfera de *Paspalum notatum*. Também há relatos na literatura de bactérias solubilizadoras de fosfato de gêneros como *Pseudomonas* e *Enterobacter* associadas com a rizosfera de *Paspalum atratum* (PAULA et al., 2022). Outros trabalhos como o conduzido por Zhou, Zhu e Yao (2018) mostram a abundante presença de bactérias envolvidas na solubilização de fosfato associadas com espécies do gênero *Paspalum*.

2.5 Papel das bactérias no processo de restauração

A comunidade microbiana no solo desempenha um papel fundamental no funcionamento e na estruturação de comunidades de plantas nativas (RAPAI et al., 2016). A formação e o desenvolvimento do solo são resultado de muitos processos e interações químicas e biológicas sob condições climáticas locais durante longos períodos de tempo. Para conseguir isso dentro de um prazo mais curto, estratégias eficazes e duradouras de remediação devem ser adotadas para reconstruir uma estrutura física estável e sustentável (HUANG; BAUMGARTL; MULLIGAN, 2012).

Assim a reabilitação da capacidade biológica do solo e as relações ecológicas na zona radicular são fundamentais para o desenvolvimento do solo, ciclagem biogeoquímica de nutrientes e a sustentabilidade de comunidades vegetais estabelecidas. Os processos ecossistêmicos do solo estão intimamente ligados ao desenvolvimento de comunidades vegetais em áreas degradadas (SANTOS et al., 2016).

As bactérias desempenham um papel importante na estabilidade ecológica durante o período inicial da restauração (LI et al., 2015). Um dos momentos mais críticos no processo de reflorestamento é o transporte de mudas da casa de vegetação para o campo, neste ponto a presença de BPCPs podem ser de grande ajuda considerando sua influência na mitigação do choque do transplante (KARLIČIĆ et al., 2017). BPCPs podem desempenhar diferentes mecanismos de promoção de crescimento que incluem aqueles que atuam diretamente no desenvolvimento das plantas, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato inorgânico insolúvel, produção de substância reguladoras do crescimento das plantas e mecanismos que atuam indiretamente no desenvolvimento de plantas, tais como antagonismo contra agentes fitopatogênicos ou antibiose (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014).

Dessa forma o uso de BPCPs pode ser uma estratégia útil para aumentar o crescimento das plantas e a resistência a múltiplos estresses. Neste sentido os rizóbios desempenham um papel significativo promovendo o crescimento das plantas através da sua capacidade de formar uma relação simbiótica e fornecer nitrogênio à planta hospedeira, além disso muitos rizóbios possuem outros mecanismos de promoção de crescimento como solubilização de fosfato e produção de auxina (HERNÁNDEZ et al., 2017; OLIVEIRA-LONGATTI; MARRA; MOREIRA, 2013; MARRA et al., 2011).

2.5.1 Solubilização de fosfatos e fixação biológica de nitrogênio por BPCPs

Os papéis das comunidades microbianas do solo, particularmente aquelas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio e fósforo, são relevantes para a avaliar a recuperação (MATIAS et al., 2009), pois a disponibilidade de N e P é o principal fator químico limitante para a recuperação da cobertura vegetal (RODRÍGUEZ-SEIJO et al., 2014), assim BPCPs com a habilidade de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio atmosférico são de grande interesse, pois melhoram o fornecimento de dois elementos essenciais para o estabelecimento das plantas em áreas degradadas.

A habilidade de solubilização de fosfato de microrganismos pode ser atribuída a interação de vários mecanismos. BPCPs secretam metabólitos tais como ácidos orgânicos de baixo peso molecular como ácidos glucônico e Keto-glucônico, que pode abaixar o pH do meio e assim solubilizar o fosfato insolúvel. Os grupos carboxila e hidroxila de ácidos orgânicos podem quelar os cátions ligados ao fosfato, que por sua vez é convertido na forma solúvel. Extrusão de prótons por bactérias também diminui o pH do meio e, conseqüentemente auxilia na solubilização de fosfato. Os ânions orgânicos liberados pelas BPCPs também competem por locais de absorção de fosfato no solo e impedem sua fixação (BHATTACHARYA et al., 2013). Além disso, expolissacarídeos sintetizados por BPCPs participam indiretamente na solubilização dos fosfatos tricálcicos pela ligação do P livre no meio, afetando a homeostase da solubilização de P (YI; HUANG; GE, 2008). Enzimas fosfatases liberadas por BPCPs também contribuem para o aumento de P solúvel no solo através do processo e mineralização do fósforo orgânico produzindo formas inorgânicas na forma de ortofosfatos (H_2PO_4^- e HPO_4^{2-}) (BAGEWADI et al., 2022), além dos sideróforos importantes no papel da queelação dos complexos de Fe-P aumentando a disponibilidade de P (RAWAT et al., 2021).

Costa et al. (2015), em um ensaio avaliando o efeito de bactérias solubilizadoras de fosfato na cultura de arroz, observaram que estirpes dos gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* aumentaram significativamente a produção de matéria da parte aérea, da raiz, e total além do número de perfilhos e a acumulação de nutrientes como P, N, Ca, Mg, S e B comparado com o tratamento com fonte de fosforo insolúvel. Gupta et al. (2011), avaliando a solubilização de P por *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter aerogenes* e *Serratia marcescens*, na presença de rocha fosfática Mussoorie, obtiveram aumentos na disponibilidade de fósforo no solo entre 86 e 576%, comparando solos inoculados com não-inoculados, já os aumentos de fósforo absorvido pelas plantas em solo inoculado com bactérias solubilizados de fosfato (BSF) variaram de 64 a 273%.

Os resultados obtidos por Gupta et al. (2011) e Costa et al. (2015) corroboram com os de Abou-EL-Seoud e Abdel-Megeed (2012), os quais trabalhando com rocha fosfática e bactéria solubilizadora de fosfato *Bacillus megaterium* na cultura do milho, obtiveram aumentos na absorção de fósforo na ordem de 89%, em relação aos tratamentos usando apenas a rocha fosfática sem adição do inoculante, melhorando a disponibilidade e absorção de fósforo nas plantas.

Também há relatos na literatura de estudos avaliando o efeito das bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, na solubilização de fosfato, assim como o trabalho realizado por Delaporte-

Quintana et al. (2017), que avaliando a solubilização de P por *Gluconacetobacter diazotrophicus* na cultura de morango, observaram um incremento no teor de P na parte aérea das plantas assim como uma maior produção de biomassa da parte aérea e da raiz em comparação com o tratamento com fonte de fosfato tricálcio insolúvel.

Além de fixar nitrogênio atmosférico, algumas estirpes do gênero *Rhizobium* também podem solubilizar fontes de fosfato insolúvel (OLIVEIRA-LONGATTI et al., 2014). Marra et al. (2011) avaliando o potencial de bactérias nodulíferas para solubilização de fosfato em meio líquido, observaram a solubilização de até 10 mg L⁻¹ de P em meio GELP (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) com as fontes de fósforo insolúvel CaHPO₄ e FePO₄.2H₂O inoculados com estirpes do gênero *Rhizobium*.

Bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) fixam nitrogênio atmosférico por meio da complexo enzimático nitrogenase, o qual catalisa a conversão do N₂ a amônia, promovendo a quebra da ligação tripla do N₂ e sua hidrogenização, sob condições normais de temperatura e pressão (KIM; REES, 1994). A energia utilizada na reação é proveniente de fonte renovável obtida através dos processos de foto ou quimiossíntese, os quais liberam energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O complexo nitrogenase é composto por duas proteínas: uma Fe-proteína, também conhecida por componente II ou dinitrogenase redutase, e uma MoFe-proteína, também chamada de componente I ou dinitrogenase (HINRICHSEN et al., 2012). Em resumo, o mecanismo de funcionamento da nitrogenase envolve 4 passos: no primeiro ocorre a formação do complexo entre a Fe-proteína reduzida com duas moléculas de ATP e a MoFe proteína; no segundo ocorre a transferência de elétrons entre as duas proteínas, acoplada à hidrólise de ATP; no terceiro a dissociação da Fe-proteína acompanhada da re-redução e hidrólise de ATP e finalmente a repetição desse ciclo até atingir o número de elétrons e prótons necessários para completar a redução do N₂ a amônia (8 e⁻ e 8 H⁺) (REES; HOWARD, 2000).

Dentre as bactérias capazes de sintetizar o complexo nitrogenase, o grupo dos rizóbios é o mais estudado. Estas bactérias sintetizam moléculas sinalizadoras que são responsáveis pelo desenvolvimento do nódulo após a estimulação de flavonoides exudados das raízes de leguminosas no solo. Estas moléculas sinalizadoras, chamadas de fator Nod, são lipo-quito-oligossacarídeos que tem várias substituições químicas. Os fatores Nod são responsáveis por iniciar o encurvamento dos pelos radiculares, dos canais de infecção e ativação da divisão celular das células corticais resultando na formação dos nódulos. Dentro desses nódulos, as

bactérias se diferenciam em bacteroides que realizam a fixação biológica de nitrogênio (BOMFETI et al., 2011).

Apesar dos benefícios oferecidos pelas BPCPs o sucesso da interação planta-bactéria depende de uma compreensão profunda da atividade microbiana na rizosfera. A rizosfera é a região com a maior fonte de compostos ricos energeticamente, essenciais para o estabelecimento da comunidade microbiana (PANPATTE et al., 2014), estes compostos, sendo em boa parte derivado dos exsudados, exercem uma forte influência na composição microbiota da rizosfera (SOMERS; VANDERLEYDEN; SRINIVASAN, 2004). A composição dos exsudados radiculares depende do tipo de solo, da disponibilidade de nutrientes, do genótipo da planta e do estágio de crescimento, e dos estresses bióticos e abióticos. Além disso, existem diferenças nos padrões de exsudação de raiz ao longo do sistema radicular que resultam em diferenças na composição das comunidades bacterianas na rizosfera (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

Dessa forma medidas como o manejo de plantas nativas combinado com BPCPs nativas, selecionadas previamente com relação a sua eficiência, podem ser medidas efetivas para o sucesso da recuperação de áreas degradadas, considerando que ambas serão melhor adaptadas as condições edafoclimáticas além de apresentar eficiente interação (FERNANDES et al., 2018).

2.5.2 Prospecção de genes de BPCPs

Para melhorar a tecnologia da produção de biofertilizantes, tem-se buscado cada vez mais compreender os mecanismos moleculares das BPCPs. A identificação de genes que contribuem para a atividade benéfica das BPCPs além de aumentar nossa compreensão sobre os mecanismos, ajudará no desenvolvimento de melhores biofertilizantes (GUPTA et al., 2014).

BSF possuem um complexo mecanismo que permite transformar fontes indisponíveis de P em formas disponíveis para a absorção das plantas. Este mecanismo compreende por exemplo o sistema regulatório do fosfato Pho envolvido na detecção e regulação do fosfato disponível. Governado por genes como o *phoR*, *phoB* e *phoU*, em condições de baixo P disponível *phoB* é ativado por *phoR*, enquanto sob condições de alto P, *phoU* é requerido por *phoB* (OLIVERIO et al., 2020). Com a ativação do *phoB* também é acionado o sistema de transporte específico de fosfato de alta afinidade *pstSCAB* (KAUR; SELVAKUMAR; GANESHAMURTHY, 2016). Somado a isso, o sistema Pho também está envolvido na síntese

das enzimas fosfatases de genes como *phoADX*, envolvidos no processo de mineralização do fosfato orgânico (FRASER et al., 2015).

Temos ainda importantes genes como o gene *Pepc* da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase responsável pelo aumento da oferta de oxaloacetato, um precursor anabolizante e intermediário na biossíntese de ácidos orgânicos (BUCH; ARCHANA; NARESH KUMAR, 2010). Entre estes vários ácidos orgânicos, o ácido glucônico parece ser o um dos principais. O ácido glucônico é produzido pelo metabolismo oxidativo da glicose pela glicose desidrogenase (GDH), que requer a pirroloquinolina quinina (PQQ) como cofator. Bactérias do gênero *Pseudomonas* podem formar o ácido glucônico através do metabolismo da glicose oxidativa e a superexpressão da biossíntese do PQQ e dos genes da GDH que podem tornar o mecanismo de solubilização mais eficiente (KHAN; ZAIDI; WANI, 2007). Temos ainda o ácido 2-ketoglucônico do gene *gad*, que tem por característica ser um ácido muito mais forte que o ácido glucônico (KUMAR et al., 2013). O ácido cítrico do gene *gltA* (VORNHAGEN et al., 2019), o ácido láctico dos gene *l-ldd*, o ácido málico dos genes *fumC e fumA, mdh*, (DAI et al., 2018) e o ácido acético do gene *aldH* também são importantes exemplos de ácidos orgânicos (SAICHANA et al., 2015).

Temos também o envolvimento de enzimas como a exopolifosfatase (*ppx*) e polifosfato quinase (*ppk*) que catalisam a hidrólise de polifosfatos inorgânicos para liberar ortofosfato (KAUR; SELVAKUMAR; GANESHAMURTHY, 2016), além da importância dos genes *sidCDE* responsáveis pela síntese dos sideróforos (REIBER et al., 2005) que tem a capacidade de quelar o Fe de complexos Fe-P do solo (RAWAT et al., 2021). Também é comum em BSF genes como *ugd* envolvido na síntese de muitos expolissacarídeos (WU et al., 2015) que formam complexos com íons metálicos presentes no solo como o Fe^{3+} . No entanto seu papel na dissolução do fosfato precise ser melhor investigado (RAWAT et al., 2021).

A fixação simbiótica de nitrogênio em rizóbios é controlada principalmente pelos genes *nod, nif e fix*. O complexo nitrogenase responsável pela redução do N atmosférico em NH_4 é produto dos genes *nifH* (codificando a Fe-proteína, também conhecida por componente II ou dinitrogenase) e dos genes *nifDK* (codificando a MoFe-proteína também conhecida por componente I ou dinitrogenase) (HINRICHSEN et al., 2012). Em resposta a concentração de nitrogênio ou presença de oxigênio a síntese da proteína NifA pelo gene *nifA*, controla a expressão dos genes estruturais do complexo nitrogenase (*nifHDK*) (HALBLEIB; LUDDEN, 2000). Em bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas, ainda existem os genes responsáveis pela nodulação os chamados genes *nod* (MARGARET et al., 2011).

As moléculas sinalizadoras de lipo-quitina-oligosacarídeos nos rizóbios chamadas fatores Nod são codificadas por um conjunto único de genes de rizóbios chamados genes *nod*, três genes *nod* são essenciais para a síntese da estrutura central do nódulo: i) *nodC* codifica uma N-acetil-glucosaminiltransferase que polimeriza UDP-N-acetil-D-glucosamina em cadeias de oligossacarídeos, ii) *nodB* codifica uma desacetilase que remove o fração N-acetil do terminal não redutor desses oligossacarídeos, e iii) *nodA* codifica uma aciltransferase que liga uma cadeia acil à extremidade não redutora dos oligossacarídeos (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2020).

Tem se tornado uma prática investigar em BPCPs a existência de genes relacionados a produção de moléculas antioxidantes que podem aliviar fatores estressantes diversos em plantas. Com isso se tornou importante estudar genes como *bfr* (SANKARI; O'BRIAN, 2016), *sodA* e *gshB* (HERNÁNDEZ et al., 2015) que sintetizam importantes moléculas antioxidantes como bacterioferritin, glutatona sintetase e superóxido dismutase [Fe]. Aliado a isso genes como *acdS* responsável pela síntese da ACC- deaminase tem a capacidade de degradar ACC, o precursor imediato do etileno em plantas, que em condições de condições de estresse é significativamente aumentado (GLICK, 2014) e o gene *pin5* ligado a síntese das auxinas hormônio do crescimento com a capacidade de contribuir para resistência a fatores de estresse biótico (BASHAN; DE-BASHAN, 2010) são importantes no processo de aliviar fatores estressantes diversos em plantas.

REFERÊNCIAS

- ABOU-EL-SEOUD, I. I.; ABDEL-MEGEED, A. Impact of rock materials and biofertilizations on P and K availability for maize (*Zea Maize*) under calcareous soil conditions. **Saudi journal of biological sciences**, v. 19, n. 1, p. 55–63, 2012.
- ABREU, A. H. M. DE et al. Produção de mudas e crescimento inicial em campo de *Enterolobium contortisiliquum* produzidas em diferentes recipientes. **Floresta**, v. 45, n. 1, p. 141–150, 2015.
- AHIRWAL, J. et al. Reclamation of coal mine spoil and its effect on Technosol quality and carbon sequestration : a case study from India. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 27992–28003, 2018.
- AHIRWAL, J.; MAITI, S. K. Development of Technosol properties and recovery of carbon stock after 16 years of revegetation on coal mine degraded lands, India. **Catena**, v. 166, n. March, p. 114–123, 2018.
- AMARAL, C. S. et al. Crescimento de *Brachiaria brizantha* pela adubação mineral e orgânica em rejeito estéril da mineração de quartzito. **Bioscience journal**, v. 28, p. 130–141, 2012.
- ARAÚJO, A. P.; PAIVA SOBRINHO, S. Germinação e produção de mudas de tamboril (*Enterolobium Contortisiliquum* (Vell.) Morong) em diferentes substratos. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3 suppl 1, p. 581–588, 2017.
- BAGEWADI, Z. K. et al. Response Surface Methodology Based Optimization, Partial Purification and Characterization of Alkaline Phosphatase Isolated from *Pseudomonas asiatica* Strain ZKB1 and its Application in Plant Growth Promotion. **Molecular Biotechnology**, v. 64, n. 9, p. 984–1002, 2022.
- BÉASSE, M. L.; QUIDEAU, S. A.; OH, S. W. Soil microbial communities identify organic amendments for use during oil sands reclamation. **Ecological Engineering**, v. 75, p. 199–207, 2015.
- BHATTACHARYA, S. S. et al. Phosphate solubilizing ability of *Emericella nidulans* strain V1 isolated from vermicompost. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 10, p. 840–848, 2013.
- BOMFETI, C. A. et al. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 657–671, 2011.
- BUCH, A.; ARCHANA, G.; NARESH KUMAR, G. Heterologous expression of phosphoenolpyruvate carboxylase enhances the phosphate solubilizing ability of fluorescent pseudomonads by altering the glucose catabolism to improve biomass yield. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 679–687, 2010.
- CARVALHO, R. P. B. Contribuições da análise de geossistemas na recuperação de áreas

degradadas por mineração Contributions of geosystems analysis in the recovery of areas degraded by mining activities. **Caderno de Geografia**, v. 21, n. 36, p. 13–28, 2011.

CHAER, G. M. et al. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, n. 2, p. 139–149, 2011.

CHODAK, M.; NIKLI, M. Effect of texture and tree species on microbial properties of mine soils. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 268–275, 2010.

COSTA, E. M. et al. Phosphate-solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate. **Ecological Engineering**, v. 83, p. 380–385, 2015.

DAI, Z. et al. Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains. **Bioresource Technology**, v. 258, n. January, p. 345–353, 2018.

DELAPORTE-QUINTANA, P. et al. Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition in strawberry plants. **Plant and Soil**, v. 419, n. 1–2, p. 335–347, 2017.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Nitrogenase Activity and Oxygen Sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* Association. **Journal of General Microbiology**, v. 71, p. 103–116, 1972.

FERNANDES, C. C. et al. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 489–502, 2018.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Growing *Periandra mediterranea* on post-mining substrate: native Fabaceae with potential for revegetation of degraded rupestrian grasslands in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 2, p. 232–239, 2018a.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Propagation and establishment of rupestrian grassland grasses for restoration of degraded areas by mining. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 41, n. 2, p. 287–295, 2018b.

FRASER, T. et al. Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial. **Geoderma**, v. 257–258, p. 115–122, 2015.

GASTAUER, M. et al. Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1409–1422, 2018.

GASTAUER, M. et al. Mine land rehabilitation in Brazil : Goals and techniques in the context of legal requirements. **Ambio**, p. 74–88, 2019.

GOMES, C. J. B.; MENDES, C. A. B.; COSTA, J. F. C. L. The Environmental Impact of Coal Mining: A Case Study in Brazil's Sangão Watershed. **Mine Water and the Environment**, v. 30, n. 3, p. 159–168, 2011.

GOMES, M. J. I. R. **Estudos Taxonômicos do gênero *Paspalum* L., grupos *Virgata* e**

Quadrifaria no Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

GRIS, D.; TEMPONI, L. G.; MARCON, T. R. Native species indicated for degraded area recovery in Western Paraná, Brazil. **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, p. 113–125, 2012.

GUPTA, A. et al. Whole genome sequencing and analysis of plant growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

GUPTA, M. et al. Enhanced biomass and steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* treated with phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. 3, p. 449–457, 2011.

HALBLEIB, C. M.; LUDDEN, P. W. Recent Advances in Nutritional Sciences. **American Society for Nutritional Sciences.**, v. 130, p. 1081–1084, 2000.

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, L. E. et al. Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 10, p. 2901–2911, 2015.

HINRICHSEN, S. et al. Recent developments in synthetic nitrogen fixation. **Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A: Inorg. Chem.**, v. 108, p. 17–47, 2012.

HUANG, L.; BAUMGARTL, T.; MULLIGAN, D. Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine tailings? **Annals of botany**, v. 110, n. 2, p. 223–238, 2012.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F.; VINCENT, R. C. Estudo fitossociológico de uma comunidade vegetal sobre canga como subsídio para a reabilitação de áreas mineradas no Quadrilátero Ferrífero, MG. **Revista Árvore**, v. 32, n. 2, p. 345–353, 2008.

JESUS, A. A. et al. Crescimento e nodulação de *Enterolobium contortisiliquum* cultivado em solos de diferentes sistemas de uso no Sudoeste do Piauí. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, p. 545–553, 2017.

KARLIČIĆ, V. et al. Use of overburden waste for London plane (*Platanus × acerifolia*) growth: The role of plant growth promoting microbial consortia. **IForest**, v. 10, n. 4, p. 692–699, 2017.

KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; GANESHAMURTHY, A. N. Draft genome sequence of phosphate-solubilizing bacterium *Paraburkholderia tropica* strain P-31 isolated from pomegranate (*Punica granatum*) rhizosphere. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. 3–4, 2016.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in

sustainable agriculture – A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, p. 29–43, 2007.

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

KLINK, C. A. Germination and seedling establishment of two native and one invading African grass species in the Brazilian cerrado. **Jornal of tropical ecology**, p. 139–147, 1996.

KUMAR, C. et al. 2-Ketogluconic acid secretion by incorporation of pseudomonas putida KT 2440 gluconate dehydrogenase (gad) operon in enterobacter asburiae psi3 improves mineral phosphate solubilization. **Current Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 388–394, 2013.

LI, J. et al. Effects of regenerating vegetation on soil enzyme activity and microbial structure in reclaimed soils on a surface coal mine site. **Applied Soil Ecology**, v. 87, p. 56–62, 2015.

LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1314–1335, 2020.

LONGO, R. M. et al. Environmental solutions of recovery of Amazonian forest mining operations. **WIT Transactions on Ecology and the Environment**, v. 141, p. 51–59, 2010.

LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. Í.; DE MELO, W. J. Uso da adubação verde na recuperação de solos degradados por mineração na floresta amazônica. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 139–146, 2011.

MACEDO, M. O. et al. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 5–6, p. 1516–1524, 2008.

MACHADO, N. A. M. et al. Growing Eremanthus erythropappus in crushed laterite: A promising alternative to topsoil for bauxite-mine revegetation. **Journal of Environmental Management**, v. 129, p. 149–156, 2013.

MAITI, S. K.; MAITI, D. Ecological restoration of waste dumps by topsoil blanketing, coir-matting and seeding with grass-legume mixture. **Ecological Engineering**, v. 77, p. 74–84, 2015.

MALAVASI, U. C.; DE MATOS MALAVASI, M. Dormancy breaking and germination of Enterolobium contortisiliquum (Vell.) Morong seed. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 851–854, 2004.

MAPA. Instrução Normativa SDA/MAPA 13/2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

MARGARET, I. et al. Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain Sinorhizobium fredii HH103 nodulating soybean. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 1, p. 11–19, 2011.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 5, p. 603–609, 2011.

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

MELO, R. R. et al. Crescimento inicial de mudas de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. sob diferentes níveis de luminosidade. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 2, p. 138–144, 2008.

MENSAH, A. K. Role of revegetation in restoring fertility of degraded mined soils in Ghana: A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 7, n. 2, p. 57–80, 2015.

MORENO-BARRIGA, F. et al. Organic matter dynamics, soil aggregation and microbial biomass and activity in Technosols created with metalliferous mine residues, biochar and marble waste. **Geoderma**, v. 301, n. October 2016, p. 19–29, 2017.

MOURA, G. G. D. et al. Rhizobia isolated from coal mining areas in the nodulation and growth of leguminous trees. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 40, p. 1–10, 2016.

MOURÃO, F. A. et al. Hospedeiras de *Struthanthus flexicaulis* (Loranthaceae) em campos rupestres ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. **Lundiana** 7, v. 7, n. 2, p. 103–109, 2006.

NERI, A. C.; SÁNCHEZ, L. E. A procedure to evaluate environmental rehabilitation in limestone quarries. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 11, p. 2225–2237, 2010.

OLIVEIRA-LONGATTI, S.M.; MARRA, L.M.; MOREIRA, F.M.S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 11, p. 948–959, 2013.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1239–1250, 2014.

OLIVERIO, A. M. et al. The Role of Phosphorus Limitation in Shaping Soil Bacterial Communities and Their Metabolic Capabilities. **Ecological and Evolutionary Science**, v. 11, n. 5, 2020.

PANPATTE, D.G et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria for sustainable agro-ecosystem. Plant Growth Promoting Rhizobacteria – A Promising Tool for Eco-Friendly Agriculture. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n.6, 2014.

PARROTTA, J. A.; KNOWLES, O. H. Restoring tropical forests on bauxite mined lands: lessons from the Brazilian Amazon. **Ecological Engineering**, v. 17, n. 2/3, p. 219–239, 2001.

- PAULA, A. F. et al. Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1–16, 2022.
- PAULUCIO, V. O. et al. Reforestation of a degraded area with *Eucalyptus* and *Sesbania*: Microbial activity and chemical soil properties. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 41, p. 1–14, 2017.
- RAPAI, S. B. et al. Soil inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi promotes the growth of boreal plant communities in gold mine overburden. **Ecological Restoration**, v. 34, n. 3, p. 216–224, 2016.
- RAWAT, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49–68, 2021.
- REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: Standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 559–566, 2000.
- REIBER, K. et al. The expression of selected non-ribosomal peptide synthetases in *Aspergillus fumigatus* is controlled by the availability of free iron. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 1, p. 83–91, 2005.
- RICKETTS, T. H. et al. Disaggregating the evidence linking biodiversity and ecosystem services. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2016.
- RIOS, C. O. et al. Assessment of iron toxicity in tropical grasses with potential for revegetating mined areas. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 5, p. 2167–2173, 2017.
- RODRÍGUEZ-SEIJO, A. et al. Limitations for revegetation in lead/zinc minesoils (NW Spain). **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 4, p. 785–793, 2014.
- SAICHANA, N. et al. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1260–1271, 2015.
- SANKARI, S.; O'BRIAN, M. R. Synthetic lethality of the *bfr* and *mbfA* genes reveals a functional relationship between iron storage and iron export in managing stress responses in *bradyrhizobium japonicum*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2016.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.
- SANTOS, J. V. DOS et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6735–6748, 2016.
- SILVA, J. R. et al. Initial growth of Fabaceae species: Combined effects of topsoil and fertilizer application for mineland revegetation. **Flora: Morphology, Distribution,**

Functional Ecology of Plants, v. 246–247, n. July, p. 109–117, 2018.

SIQUEIRA-SILVA, A. I.; RIOS, C. O.; PEREIRA, E. G. Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 78, p. 257–266, 2019.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 205–240, jan. 2004.

SONTER, L. J. et al. Mining drives extensive deforestation in the Brazilian Amazon. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2017.

SONTER, L. J.; ALI, S. H.; WATSON, J. E. M. Mining and biodiversity_ key issues and research needs in conservation science. - PubMed - NCBI. **Proceedings of the Royal Society**, v. 285, 2018.

SOUSA, W. C. et al. Nitrogen sources and mauritia flexuosa decomposed stem on nodulation and growth of *Enterolobium contortsiliquum*. **Revista Árvore**, v. 37, n. 5, p. 969–979, 2013.

SOUZA, C. A. et al. Environmental Services Associated With the Reclamation of Areas Degraded By Mining: Potential for Payments for Environmental Services. **Ambiente & Sociedade**, v. 19, n. 2, p. 137–168, 2016.

STUMPF, L. et al. Perennial grasses for recovery of the aggregation capacity of a reconstructed soil in a coal mining area in southern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 1, p. 327–335, 2014.

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

TEIXEIRA, S. T.; JOSÉ DE MELO, W.; TOMÉ SILVA, É. Plant nutrients in a degraded soil treated with water treatment sludge and cultivated with grasses and leguminous plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1348–1354, 2007.

TOMA, M. A. et al. Tripartite symbiosis of *Sophora tomentosa*, rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 680–688, 2017.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortsiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 3, p. 743–753, 2001.

VIANA, P. L.; LOMBARDI, J. A. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na serra da calçada, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 1, p. 159–177, 2007.

VINCENT, R. D. E. C.; MEGURO, M. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil 1. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 3, p. 377–388, 2008.

VORNHAGEN, J. et al. The *Klebsiella pneumoniae* citrate synthase gene, *gltA*, influences site specific fitness during infection. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. 1–25, 2019.

WU, M. M. et al. Biochemical characterization and functional analysis of Udp-glucose dehydrogenase, in the synthesis of biopolymer Ss from *Sphingomonas sanxanigenens* NX02. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 27–33, 2015.

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1059–1065, 2008.

ZHOU, Y.; ZHU, H.; YAO, Q. Contrasting P acquisition strategies of the bacterial communities associated with legume and grass in subtropical orchard soil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 10, n. 3, p. 310–319, 2018.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - N₂-fixation efficiency, adaptability and functional genes of *Bradyrhizobium* strains isolated from soils with high contents of Fe and Mn

Resumo: A associação simbiótica entre leguminosas arbóreas e bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas, exercem um importante papel no processo de recuperação de áreas degradadas. Porém para o sucesso da simbiose é fundamental o emprego de estirpes eficientes e adaptadas às condições edafoclimáticas onde serão empregadas, no entanto existe uma carência de trabalhos que abordem genes que expliquem esta capacidade adaptativa. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* provenientes de áreas de mineração de ferro (Fe) em simbiose com *Enterolobium contortisiliquum*, e a prospecção de genes de bactérias eficientes na FBN. A eficiência simbiótica foi avaliada na casa de vegetação em condições axênicas com a inoculação de 39 estirpes comparadas a controles sem inoculação ou com a estirpe eficiente para a espécie. Posteriormente, 12 estirpes selecionadas entre as 39, foram testadas em solo proveniente de uma área de mineração de ferro utilizando em comparação aos mesmos controles usados anteriormente. Cinco estirpes foram selecionadas com base nos ensaios com solo para o estudo do DNA genômico. Plantas inoculadas com as estirpes selecionadas para o sequenciamento do DNA genômico apresentaram bom desempenho nos parâmetros analisados nos ensaios em condições axênicas e em solo, mostrando uma alta eficiência simbiótica em associação com *Enterolobium contortisiliquum*. A análise do DNA genômico mostrou a presença dos genes *pin5*, *acdS*, *sodA*, *bfr*, *gshB* e *gor*, relatados na literatura como importantes genes em bactérias tolerantes as condições de altos teores de Fe e Mn. Assim foi demonstrado que a eficiência simbiótica é potencializada por genes que conferem maior adaptabilidade as estirpes estudadas.

Palavras-chave: fixação biológica de nitrogênio; *Bradyrhizobium*; *Enterolobium contortisiliquum*; genes de tolerância.

1 Introdução

A mineração é uma atividade humana essencial e contribui para a melhoria da qualidade de vida da sociedade. Entretanto, a exploração mineral, especialmente a mineração de metais, produz impactos ambientais significativos devido à intensa perturbação do solo (MONTALVÁN-OLIVARES et al., 2021). Por essa razão, os estudos que visam potencializar o processo de reabilitação das áreas mineradas são imprescindíveis. A revegetação é uma alternativa muito eficaz na reabilitação dessas áreas pois melhora e preserva a qualidade do solo (BUTA et al., 2019).

No entanto, um dos grandes desafios no processo de revegetação de áreas mineradas é a recomposição da fertilidade do solo ou do substrato, sendo o nitrogênio (N) um dos nutrientes mais limitantes nesse processo (RODRÍGUEZ-SEJO et al., 2014). Neste sentido a utilização de leguminosas arbóreas nativas com a capacidade de realizar simbiose com bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN), desempenha um importante papel na restauração de solos empobrecidos de N (DIABATE et al., 2005; FREITAS et al., 2010). Essas plantas contribuem para o processo de estabelecimento e crescimento de outras espécies vegetais, favorecendo a sucessão ecológica (CHAER et al., 2011).

Entre as leguminosas arbóreas com boa capacidade simbiótica com BFNN, destaca-se a *Enterolobium contortisiliquum* (Vell) Morong. (MOREIRA; DE CARVALHO; SIQUEIRA, 2010; TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001), uma espécie nativa de rápido crescimento e com ampla diversidade de usos (LORENZI 2016). Esta espécie tem apresentado grande potencial na revegetação e recuperação ambiental (ANGÉLICO et al., 2021), além de ser tolerante a metais pesados (TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001).

É relatado na literatura que *Enterolobium contortisiliquum* estabelece simbiose com o gênero *Bradyrhizobium* (MOREIRA et al., 1998), um dos gêneros simbióticos de maior ocorrência nos ecossistemas tropicais brasileiros (MOREIRA et al., 1993). Este gênero tem a maior parte de seus genes de nodulação e fixação de N₂ localizados no cromossomo, conferindo estabilidade genética (MASTERSON; PRAKASH; ATHERLY, 1985), que é característica importante para que uma estirpe selecionada mantenha sua eficiência ao longo do tempo (RODRIGUES et al., 2021).

A eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN) depende da compatibilidade genética entre a estirpe de rizóbio e a espécie leguminosa hospedeira, e a adaptação desses às condições edafoclimáticas predominantes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; COSTA et al.,

2021). Dessa forma, é mais provável que estirpes adaptadas a solos de mineração sejam encontradas nas comunidades de rizóbios nativos desses solos (SILVA et al., 2018).

O presente estudo utilizou estirpes do gênero *Bradyrhizobium* provenientes de áreas de mineração de ferro (Fe) localizadas no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil. Estudos anteriores com estas estirpes mostraram um grande potencial para FBN evidenciado pelos bons resultados do índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) tanto de estirpes isoladas (LOPEZ et al., 2022), como de comunidades oriundas desses solos (SILVA et al., 2020). Acredita-se que estas estirpes possuem genes que explicam sua capacidade adaptativa a estes solos com altos teores de Fe e Mn. Mais elucidativo sobre esse aspecto, nosso estudo além de avaliar a eficiência de diversas estirpes, traz o diferencial de mostrar os mecanismos envolvidos na eficiência das estirpes sob essas condições. Isso é particularmente importante pois garante maiores chances de terem eficiência consistentes.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de estirpes de BFNN do gênero *Bradyrhizobium* provenientes de áreas de mineração de ferro (Fe) em simbiose com *Enterolobium contortisiliquum* em condição axênica e em solo coletado no município de Itabira-MG na região do Quadrilátero Ferrífero, sob a hipótese de que estirpes isoladas de áreas de mineração de Fe possuem maior eficiência e capacidade adaptativa a estas áreas, determinada geneticamente, elevando as probabilidades de sucesso da simbiose.

2 Material e Métodos

Origem das estirpes

Nesse trabalho foram estudadas 39 estirpes do gênero *Bradyrhizobium* oriundas da coleção do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo (SBMPBS) da Universidade Federal de Lavras. Parte destas estirpes foi selecionada com base no trabalho realizado por Silva et al. (2020), que coletaram amostras de solo de uma área revegetada com capim (RA) na Mina Córrego do Feijão em Brumadinho/MG, pertencente à Vale S.A, localizada no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, sudeste do Brasil. Para realizar a captura das estirpes dessas amostras, Silva et al. (2020) utilizaram a espécie promíscua sirato (*Macroptilium atropurpureum*) como planta isca.

Outras estirpes utilizados neste estudo foram selecionados com base nos trabalhos de Costa (2018) e Costa (2014), que isolaram estirpes do gênero *Bradyrhizobium* a partir de nódulos provenientes das espécies *Enterolobium contortisiliquum* e *Machaerium nyctians*. Estas espécies foram cultivadas no viveiro pertencente à Mina de Córrego do Meio, propriedade da VALE, localizada no município de Sabará/MG e no viveiro do Centro de Tecnologia de

Ferrosos – CTF/ Miguelão da Vale S/A, na Zona Rural do município de Nova Lima/MG na Fazenda Rio do Peixe S/N (Table 2).

Eficiência das estirpes em condições axênicas

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no SBMPBS (UFLA) de setembro a novembro de 2019. Inicialmente as sementes de *Enterolobium contortisiliquum* foram submetidas à quebra de dormência por meio de escarificação mecânica. As sementes foram escarificadas com uma lixa de madeira nº 80 na área oposta ao embrião até a exposição do cotilédone (MALAVASI; MALAVASI, 2004). Posteriormente foram desinfestadas superficialmente em hipoclorito a 3% por 3 minutos, seguida do processo de lavagem em água destilada esterilizada. As sementes foram germinadas em uma bandeja contendo areia esterilizada em autoclave, sendo umedecidas com água destilada esterilizada. Após a formação do primeiro par de folhas, quatro dias após a germinação, as plântulas foram transplantadas para tubetes de 820 mL preenchidos com areia lavada e vermiculita (1:1, v/v), autoclavados duas vezes por 40 min em pressão de 1,5 kg cm⁻² a 127° C.

A adubação foi realizada com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada conforme descrito por Guimarães et al. (2012). Foi utilizada solução com baixa concentração de N mineral (5.25 mg L⁻¹) ou com alta concentração de N mineral (52.5 mg L⁻¹), dependendo do tratamento. A solução nutritiva foi autoclavada por 40 min sob pressão de 1,5 kg cm⁻² a 127° C antes do uso.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: inoculação de 39 estirpes (Table 2) com 5,25 mg L⁻¹ de N, controle negativo com 5,25 mg L⁻¹ de N sem inoculação, controle negativo com 52,5 mg L⁻¹ N mg L⁻¹ de N sem inoculação e controle positivo com a estirpe BR4406 recomendada pelo CNPAB/ EMBRAPA (FRANCO; FARIA, 1997) e aprovada pelo MAPA (MAPA, 2011) como inoculante para *Enterolobium contortisiliquum* com 5,25 mg L⁻¹ de N, resultando em 42 diferentes tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com 5 repetições, totalizando 210 unidades experimentais.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura 79 (FRED E WAKSMAN, 1928) por 6 dias a 28°C sob agitação de 110 rpm. Para cada tratamento inoculado, 1 mL de inóculo na concentração de 1x10⁹ células por mL, foi adicionado para cada plântula. Após a inoculação, uma camada de areia parafinada (10 kg de areia, 1 L de clorofórmio e 10 g de parafina) foi adicionada sobre a superfície de cada tubete para evitar possível contaminação. Adicionalmente foi inserido na camada de areia parafinada de cada tubete um mini cano de

PVC (1,1 cm Ø) para possibilitar a passagem da solução nutritiva para o substrato de areia e vermiculita.

Aos 90 dias após a inoculação foi determinado o índice SPAD, que representa uma medida indireta do teor de clorofila da folha (SILVEIRA; BRAZ; DIDONET, 2003). Foram realizadas 10 leituras na região do terço médio de cada planta com o auxílio do clorofilômetro Minolta SPAD-502. Após as leituras, as plantas foram coletadas e avaliados os seguintes parâmetros: número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e altura. Os nódulos, as raízes e a parte aérea foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 60° C até apresentar um peso constante, para posterior pesagem em balança analítica.

Eficiência das estirpes em tubetes com solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no SBMPBS (UFLA) de março a julho de 2020. O solo utilizado, classificado como *Plintossolo pétrico*, foi coletado no município de Itabira MG, em uma área adjacente a uma área de Canga, na região do Quadrilátero Ferrífero (19°36'41.2" S 43°12'59.5"W). A região de Itabira é conhecida por sua tradição na extração de minério de Fe, sendo o local da fundação da empresa Vale S.A (antiga Companhia Vale do Rio Doce) (GUIMARÃES et al., 2012 b).

Foram utilizados tubetes de 820 ml preenchidos com solo coletado na camada de 0 – 20 cm, previamente seco, homogeneizado e passado por uma peneira de 4 mm. Antes da implementação do ensaio foi realizado uma análise química do solo (Table 1), a qual serviu de base para realizar a seguinte adubação de base segundo Malavolta (1981): 150 mg.dm⁻³ de K, 200 mg.dm⁻³ de P, 75 mg.dm⁻³ de Ca, 20 mg.dm⁻³ de Mg, na forma de K₂HPO₄, Ca(H₂PO₄)₂ e MgSO₄.7H₂O respectivamente, e de micronutrientes correspondente a 0,5 mg.dm⁻³ de B, 1,5 mg.dm⁻³ de Cu, 0,1 mg.dm⁻³ de Mo, 5 mg.dm⁻³ de Zn na forma de H₃BO₃, CuSO₄.5H₂O, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O e ZnSO₄.7H₂O respectivamente. A irrigação foi realizada manualmente, mantendo a umidade do solo em cerca de 70% da capacidade de campo.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: inoculação sem adição de N de 11 estirpes de *Bradyrhizobium* que apresentaram no ensaio anterior alta eficiência simbiótica (UFLA 04-563; UFLA 04-567; UFLA 04-572; UFLA 04-571; UFLA 04-689; UFLA 04-709; UFLA 01-860; UFLA 01-873; UFLA 01-883), média eficiência (UFLA 04-715) ou baixa eficiência (UFLA 01-1171); controle negativo sem N e sem inoculação; controle negativo com 300 mg.dm⁻³ de N na forma de NH₄NO₃ sem inoculação; controle positivo com a estirpe BR4406, recomendada pelo CNPAB/ EMBRAPA (FRANCO; FARIA, 1997) e aprovada pelo MAPA

(MAPA, 2011) como inoculante para *Enterolobium contortisiliquum*, e inoculação mista com todas as estirpes de maior eficiência do ensaio anterior resultando em 15 diferentes tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com 10 repetições, totalizando 150 unidades experimentais.

O pré-tratamento das sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, o processo de formação das plântulas e transplante para os tubetes, assim como o preparo dos inoculantes seguiram a mesma metodologia do teste de eficiência em condições axênicas, descrita na seção anterior.

Aos 140 dias após a inoculação, foi medido o índice SPAD. Após as leituras, as plantas foram coletadas e avaliadas quanto às seguintes variáveis: número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e altura. As variáveis foram obtidas da mesma forma do ensaio anterior.

Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software R 4.1.1 (R Core Team, 2018). Os resíduos da análise variância para cada modelo foram testados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância. Quando essas pressuposições foram atendidas, a análise de variância foi realizada nos dados, e após observada a significância do modelo pelo teste de F ($p < 0,05$), as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o pacote *scott-knott* 1.3.0 (JELIHOVSCHI; FARIA; ALLAMAN, 2014). Foram realizadas também testes de correlação pelo test-t para correlação aos pares (correlation pairwise), utilizando a função *multicor.test* do pacote *biotools* 4.2 (SILVA; MALAFAIA; MENEZES, 2017) e a função *corrplot.mixed* do pacote *corrplot* 0.92 (WEI; SIMKO, 2017).

Extração e análise do DNA genômico

Cinco estirpes foram selecionadas com base na maior eficiência simbiótica, indicada pelo índice SPAD e produção da matéria seca da parte aérea, exibidas tanto no ensaio em condição axênica como em solo (UFLA 04- 567, UFLA 04- 571, UFLA 04- 572, UFLA 01- 860 e UFLA 01-883), para a realização da extração e análise do DNA genômico. As estirpes selecionadas foram novamente crescidas no meio de cultura líquido 79, posteriormente o DNA genômico das bactérias foi extraído pelo Wizard® Genomic Kit de Purificação de DNA (Promega, Wisconsin, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Os sequenciamentos de próxima geração (NGS) foram realizados pela Admera Health Biopharma Services, de New Jersey, USA. O DNA genômico isolado foi quantificado com

Qubit 2.0 DNA HS Assay (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) e a qualidade avaliada pelo TapeStation genomic DNA Assay (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). A preparação da biblioteca foi realizada usando o NexteraXT library kit (Illumina, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade final da biblioteca foi medida pelo KAPA SYBR® FAST qPCR com QuantStudio ® 5 System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e a qualidade da biblioteca avaliada pelo TapeStation HSD1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, EUA). Foram utilizados índices duplos Illumina® de 8 nt. O agrupamento equimolar de bibliotecas foi realizado com base nos valores de QC e sequenciado em um Illumina® HiSeq X (Illumina, Califórnia, EUA) com uma configuração de comprimento de leitura de 150 PE para leituras de 1,6 M PE (0,8 M em cada direção) por amostra. Com auxílio do software de código aberto e plataforma de dados KBASE (ARKIN et al., 2018), os fragmentos obtidos no sequenciamento foram montados para obtenção dos respectivos genomas utilizando o software SPAdes v3.13.0 (BANKEVICH et al., 2012). A qualidade dos genomas montados foi checada a partir do programa CheckM v1.0.18 (PARKS et al., 2015). Por fim as sequências foram anotadas funcionalmente utilizando a tecnologia RAST (Rapid Annotation Technology) (AZIZ et al., 2008). Após realizada a anotação dos genomas, sequências dos genes de interesse (*pin5*, *acdS*, *soda*, *bfr*, *gshB*, *gor*, *nodC* e *nifH*) foram extraídos e analisados através do RAST (AZIZ et al., 2008). Estes genes, com exceção do *nodC* e *nifH*, foram selecionados com base em trabalhos na literatura que relatam a sua importância na codificação de proteínas em bactérias tolerantes ao Fe e ao Mn (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ; LUCAS; FELIPE, 2002; HERNÁNDEZ et al., 2015; SOUZA et al., 2015; SANKARI; O'BRIAN, 2016; JINAL et al., 2019; CHANDWANI et al., 2022) Os genes *nodC* e *nifH* são essenciais para fixação biológica de N₂ simbiótica (LINDSTRÖM; MOUSAVI, 2020).

3 Resultados

Eficiência das estirpes sob condições axênicas

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em todas variáveis avaliadas. Para MSPA, 26 estirpes formaram o segundo grupo com maiores valores dessa variável ($p < 0,05$), ficando abaixo somente do controle negativo com alta concentração de N sem inoculação e sendo quase duas vezes maior que o controle negativo com baixa concentração de N sem inoculação (Fig. 1A). Destes 26, 12 estirpes (UFLA 04-571, UFLA 04-567, UFLA 04-572, UFLA04-563, UFLA01-811, UFLA01-883, UFLA04-689, BR4406, UFLA01-860, UFLA04-709, UFLA01-1164 e UFLA01-873) também exibiram junto com o

controle com alta concentração de N os maiores valores da variável índice SPAD, sendo quase três vezes superior ao controle com baixa concentração de N (Fig. 1B).

A MSR apresentou resultados similares a MSPA com 26 estirpes formando o segundo grupo com maiores valores dessa variável ($p < 0,05$), ficando abaixo do controle com alta concentração de N e sendo significativamente maior que o controle com baixa concentração de N (Fig. S1B). Estirpes como a UFLA04-563, UFLA01-860 e UFLA01-1164 que haviam composto o segundo grupo de maiores médias para MSPA, foram agrupadas no terceiro grupo de maiores médias para MSR. Já na variável altura das plantas merecem destaque as estirpes BR4406, UFLA01-873, UFLA 04-567, UFLA01-883, UFLA04-689, UFLA 04-571 e UFLA04-563 que além de apresentarem as maiores médias junto ao controle com alta concentração de N (Fig. S1A), também no geral estas mesmas estirpes apresentaram as maiores médias para as demais variáveis estudadas ($p < 0,05$).

Não ocorreu nodulação nos tratamentos não inoculados, indicando que não ocorreu contaminação no ensaio. Entre os tratamentos inoculados, o NN variou entre 106 (UFLA 04-702) e 13 nódulos (UFLA 01-816). Todas as estirpes que haviam apresentado melhores resultados para MSPA e SPAD também apresentaram os maiores valores para NN ($p < 0,05$), com exceção apenas da estirpe UFLA04-689 que foi incluída no segundo grupo com maiores valores dessa variável (Fig. 2). Na variável MSN o grupo de estirpes que havia apresentado melhores resultados nas variáveis anteriores foram agrupadas entre primeiro (UFLA01-1164, UFLA04-709) e segundo grupo de maiores médias (UFLA 04-571, UFLA 04-567, UFLA 04-572, UFLA04-563, UFLA01-811, UFLA01-883, UFLA04-689, BR4406, UFLA01-860 e UFLA01-873) ($p < 0,05$) (Fig. 2).

A análise de correlação mostrou que MSR não possui uma correlação significativa com NN, porém as demais variáveis apresentaram uma correlação positiva entre si ($p < 0,05$), com destaque para MSPA com SPAD, MSR e MSN, além de NN com MSN, apresentando as maiores correlações (Fig. 5A).

Eficiência das estirpes em tubetes com solo

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em todas variáveis avaliadas. Na variável MSPA destacou-se as estirpes UFLA 01-860, UFLA 04-715, UFLA 04-689, UFLA 01-883, UFLA 04-571 e BR-4406 além do tratamento com inoculação mista e do controle negativo com N sem inoculação que diferiram significativamente do controle negativo sem N sem inoculação ($p < 0,05$), que por sua vez não diferiu da estirpe UFLA 01-1171, tida como ineficiente no ensaio em condições axênicas (Fig. 3A). As mesmas estirpes e tratamentos

que apresentaram as maiores médias para MSPA também apresentaram os maiores valores para o índice SPAD com a inclusão das estirpes UFLA 04-572 e UFLA 04-563 ($p < 0,05$), as demais estirpes não diferiram do controle com baixa concentração de N (Fig. 3B).

As estirpes UFLA 04-715, UFLA 04-571, UFLA 01-860, UFLA 01-883, BR-4406 e UFLA 01-1171 além do tratamento inoculação mista formaram o grupo com as maiores médias para MSR, chegando a serem em média 22% e 97% superiores aos controles com N e controle sem N, respectivamente ($p < 0,05$) (Fig. S2A). Em altura da planta o destaque foi para as estirpes UFLA 01-860, UFLA 04-715, UFLA 04-689 e UFLA 04-567 que se equipararam ao tratamento com N além de serem em média 25% superiores ao controle sem N (Fig. S2B).

O NN variou entre 25 e 76 nódulos, com as estirpes UFLA 01-860, BR-4406, UFLA 04-571, inoculação mista, UFLA 04-689, UFLA 04-715 e UFLA 04-567 apresentando as maiores médias ($p < 0,05$), seguida das estirpes UFLA 04-709, UFLA 04-572, UFLA 01-873 e UFLA 01-883 que formaram o segundo de maiores médias. O controle sem N apresentou nodulação em média de 32 nódulos e o controle com N não apresentou nodulação (Fig. 4). Para a variável MSN as estirpes UFLA 01-860, UFLA 04-715, BR-4406 e UFLA 04-689 e o tratamento inoculação mista formaram o grupo com as maiores médias seguida das estirpes UFLA 01-883, UFLA 04-571, UFLA 04-567, UFLA 04-563 e UFLA 04-572. O controle sem N apresentou média significativamente menor ($p < 0,05$) em torno de $0,054 \text{ g.planta}^{-1}$ (Fig. 4).

A análise de correlação mostrou que todas as variáveis apresentaram correlação significativa entre si ($p < 0,05$), com destaque para MSPA com SPAD, MSR, altura e MSN, além de NN com MSN que exibiram as maiores correlações (Fig. 5B).

Análise do DNA genômico

A qualidade do DNA genômico das estirpes que mostraram maior eficiência (UFLA 04-567, UFLA 04-571, UFLA 04-572, UFLA 01-860 e UFLA 01-883) foi checada e apresentou uma completude entre 99,38 e 100,0 %. Foi encontrado em todas as estirpes analisadas genes envolvidos na rota da biossíntese da auxina como o gene *pin5* responsável pela codificação da proteína auxin efflux carrier. As estirpes também exibiram genes envolvidos na regulação do etileno como o gene *acdS* que codifica a proteína 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC-deaminase). Foram encontradas também nas estirpes analisadas, genes que codificam enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, as enzimas glutatona sintetase e glutatona redutase envolvidas na rota metabólica da glutatona e a proteína bacterioferritin envolvida no sistema de armazenamento de Fe (Table 3). Por fim o genoma das estipes

avaliadas apresentaram genes envolvidos na formação dos nódulos (*nodC*) e na constituição do complexo enzimático nitrogenase (*nifH*) (Table 3).

4 Discussão

Relações simbióticas eficientes entre plantas leguminosas e rizóbios possuem um grande potencial para recuperação de áreas degradadas, enriquecendo ecossistemas com nitrogênio e carbono, contribuindo para a proteção contra processos erosivos do solo em decorrência da maior cobertura vegetal e restaurando as funções do solo (DARY et al., 2010; MACEDO et al., 2008). Existem estudos voltados para o isolamento de estirpes originadas de áreas de mineração (BORGES et al., 2016; CASTRO et al., 2017; SILVA et al., 2020; RAHAL; CHEKIREB, 2021), porém poucos avaliaram a eficácia destas estirpes em simbioses com leguminosas arbóreas com potencial para recuperar estas áreas (LOPEZ et al., 2022; FAN et al., 2018).

As estirpes selecionadas para o ensaio em solo tiveram um melhor desempenho em todos parâmetros avaliados no ensaio com areia e vermiculita. Isso mostra uma alta eficiência simbiótica na FBN destas estirpes com *Enterolobium contortisiliquum*. A média de número de nódulos destas estirpes foi de 64 nódulos com massa seca média de 0,0338 g por planta (Fig. 2). NN e MSN são variáveis importantes para a seleção de rizóbios porque refletem a capacidade competitiva e eficiência simbiótica das estirpes (DOBEREINER, 1966), geralmente apresentando uma boa correlação com outros parâmetros de crescimento (FAVERO et al., 2021; RODRIGUES et al., 2021), assim como observado no presente trabalho onde MSN teve uma maior correlação com parâmetros como MSPA e índice SPAD.

As estirpes mais eficientes no ensaio com areia e vermiculita apresentaram um índice SPAD em torno de 46 (Fig.1 B), indicando segundo Rodrigues et al. (2021), uma boa nutrição de N para as plantas. O índice SPAD é uma medida indireta do teor de clorofila foliar e pode ser correlacionado com as concentrações de N na planta (FRITSCHI; RAY, 2007), sendo relatado que esta variável discrimina estirpes eficientes mais rápido que a matéria seca (JARAMILLO et al., 2013; LOPEZ et al., 2022). Isso torna o índice SPAD uma variável eficaz para avaliar a eficiência simbiótica de estirpes especialmente nas primeiras etapas onde um grande número de estirpes são testadas e o procedimento padrão de análise de N foliar torna-se muito caro.

A superioridade do controle com alta concentração de N em relação aos tratamentos inoculados com baixa concentração de N para MSPA e MSR no ensaio em condições axênicas (Fig.1A, Fig. S1B), pode estar associado a um menor gasto energético das plantas na absorção

do N prontamente disponível, comparado com fontes de N biologicamente disponíveis no mesmo espaço de tempo. De fato as diferenças entre as plantas inoculadas com as estirpes mais eficientes e controle com baixa concentração de N só começaram a ficar mais evidentes depois dos 75 dias após a inoculação, assim como observado por Silva et al. (2018), demonstrando dessa forma que este foi o período mínimo para a FBN passar a suprir as exigências nutricionais da planta com N.

No ensaio em solo, o melhor desempenho das estirpes UFLA 01-860, UFLA 04-715 e UFLA 04-689 e o tratamento inoculação mista em relação ao controle sem N para as variáveis MSN e NN (Fig. 4), demonstra uma importante característica no processo de seleção de estirpes que é sua capacidade de sobreviver no solo e competir com comunidades nativas pelo sítios de infecção (FERREIRA et al., 2019). O fato do controle com N não ter apresentado nodulação mesmo com a presença da população nativa de estirpes no solo, pode ser explicado por uma ausência de estímulo relacionado ao excesso de N (FIGUEIREDO et al., 2016). Dependendo da concentração do nitrato ocorre uma redução do número de pêlos radiculares inibindo a formação dos nódulos (XIA et al., 2017), além de interferir na atividade e na expressão da nitrogenase (complexo enzimático responsável pela conversão de N_2 em NH_3) (SALAS et al., 2020).

A alta eficiência simbiótica das estirpes UFLA 01-860, UFLA 04-715, UFLA 04-689, UFLA 01-883 e UFLA 04-571 foi comprovada nas variáveis MSPA e índice SPAD na condição com solo (Fig. 3A, 3B). Por outro lado, a testemunha sem nitrogênio e sem inoculação foi ineficiente em todos os parâmetros de crescimento avaliado, demonstrando que a comunidade nativa de bactérias não conseguiu suprir as necessidades nutricionais de N na planta, mostrando que além de competitivas as estirpes inoculadas agregam uma outra importante característica, a da alta eficiência na FBN (FERREIRA et al., 2019).

O destaque das estirpes UFLA 01-860, UFLA 04-715, UFLA 04-689 e UFLA 04- 567 na variável altura é uma relevante informação, levando em conta que a altura das plantas é uma variável que têm sido utilizado para avaliar da eficiência simbiótica de rizóbios em leguminosas arbóreas (CHAGAS JUNIOR et al., 2012; PRIMIERI et al., 2016; SILVA et al., 2018), sendo um dos parâmetros que compõem importantes índices de qualidade de mudas florestais como o índice Dickson e estando diretamente relacionado a sobrevivência e crescimento após o transplantio (ABREU et al., 2015). Já a variável MSR mostrou um resultado interessante com o controle com N não sendo destaque na variável (Fig. S2A), uma possível explicação seria um

efeito salino da adubação nitrogenada provocando um estresse na planta (FIGUEIREDO et al., 2016), ou mesmo a falta de necessidade de desenvolver seu sistema radicular em busca do N.

Acredita-se que os elevados teores de Mn e Fe no solo (Table 1) também foram fatores estressantes tanto para as plantas como para as bactérias. Por isso, pesquisamos nas estirpes estudadas, evidências de sua capacidade de liberar moléculas antioxidantes que podem reduzir o estresse na planta, provocado por estes elevados teores (CHANDWANI et al., 2022). O resultado dessa busca mostrou através da análise do DNA genômico das estirpes UFLA 04-567, UFLA 04-571, UFLA 04-572, UFLA 01-860 e UFLA 01-883, genes ligados a síntese de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, glutatona redutase, glutatona sintetase e da proteína bacterioferritin (Table 3). Embora o Fe e Mn sejam considerados micronutrientes, sua presença em excesso leva a alterações no metabolismo levando a um maior acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (JINAL et al., 2019). A geração de ROS, como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), quando o equilíbrio redox celular está comprometido, promove a oxidação de lipídios, proteínas e/ou ácidos nucleicos, afetando o metabolismo da planta (HERNÁNDEZ et al., 2015). A glutatona sintetase está ligada a síntese da glutatona, já a glutatona redutase está ligada a sua regeneração, juntas glutatona e superóxido dismutase agem diretamente na remoção do superóxido e do peróxido de hidrogênio (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ; LUCAS; FELIPE, 2002). Já a bacterioferritin está ligada ao sistema de armazenamento de Fe intracelular (SOUZA et al., 2015), participando diretamente do manejo do Fe no solo e consequente redução do estresse oxidativo (SANKARI; O'BRIAN, 2016).

Solos com elevadas taxas de metais pesados, como o do presente estudo (Table 2), tendem a selecionar uma comunidade bacteriana capaz de fixar N e produzir ACC desaminase e auxina (RANGEL et al., 2017). A análise do DNA genômico das estirpes com alto desempenho nas variáveis estudadas mostrou a presença de genes ligados a síntese da ACC-deaminase e auxina (Table 3). Auxina é um conhecido hormônio do crescimento com a capacidade de contribuir para resistência a fatores de estresse biótico (BASHAN; DEBASHAN, 2010). A ACC-deaminase tem a capacidade de degradar ACC, o precursor imediato do etileno em plantas, que em condições de condições de estresse é significativamente aumentado (GLICK, 2014). Dessa forma, o bom desempenho destas estirpes pode ser explicada pela sua potencial capacidade de sintetizar auxina e ACC deaminase como forma de aliviar a toxicidade do Fe e Mn no sistema (CHANDWANI et al., 2022) além de melhorar o desenvolvimento do sistema radicular.

O próprio mecanismo da FBN contribui para melhorar a tolerância das plantas a estresses ambientais através da incorporação de N no sistema (RANGEL et al., 2017b). O fato curioso é que em condições de estresses pode ocorrer um aumento da atividade da nitrogenase, como um mecanismo de defesa da simbiose contra os efeitos tóxicos dos metais pesados, em uma tentativa de suprir o fornecimento de N para a planta (TRANNIN; MOREIRA; SIQUEIRA, 2001). A glutatona também exerce influência na atividade da nitrogenase, com a proteção da leghemoglobina, uma importante proteína responsável pelo transporte do oxigênio dentro dos nódulos, que é uma função de essencial importância para evitar a inibição da nitrogenase (HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ; LUCAS; FELIPE, 2002). Bactérias que reúnem as características de estirpes tolerantes a metais pesados também melhoram a síntese de clorofila sob condição de estresse de metais pesados (JINAL et al., 2019; CHANDWANI et al., 2022). Assim estas informações aliadas podem explicar os altos valores do índice SPAD das plantas inoculadas com as estirpes que tiveram seu DNA genômico analisado.

5 Conclusão

Todas as estirpes selecionadas de áreas com altos teores de Fe e Mn para o ensaio em solo apresentaram alta eficiência simbiótica na FBN em simbiose com *Enterolobium contortisiliquum* no ensaio em condições axênicas. No ensaio em solo com altos teores de Fe e Mn as estirpes selecionadas para a análise do DNA genômico exibiram alto desempenho na maioria das variáveis analisadas. As estirpes com o DNA genômico analisado possuem genes que estão associados a tolerância a altos níveis de Fe e Mn apresentando alta eficiência em fixar N₂ simbioticamente com *Enterolobium contortisiliquum*

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. H. M. et al. Produção de mudas e crescimento inicial em campo de *Enterolobium contortisiliquum* produzidas em diferentes recipientes. **Floresta**, v. 45, n. 1, p. 141–150, 2015.
- ANGÉLICO, T. DOS S. et al. Soil effects on stem growth and wood anatomy of tamboril are mediated by tree age. **Forests**, v. 12, n. 8, p. 1–14, 2021.
- ARKIN, A. P. et al. KBase: The United States department of energy systems biology knowledgebase. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566–569, 2018.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–15, 2008.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.

- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium azospirillum promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, n. C, p. 77–136, 2010.
- BORGES, W. L. et al. Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 314–321, 2016.
- BUTA, M. et al. Soil reclamation of abandoned mine lands by revegetation in Northwestern part of Transylvania: A 40-Year retrospective study. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 12, 2019.
- CASTRO, J. L. et al. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 41, p. 1–20, 2017.
- CHAER, G. M. et al. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**, v. 31, n. 2, p. 139–149, 2011.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Effect of natural nodulation in the development of leguminous trees on soils of cerrado in Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 38–44, 2012.
- CHANDWANI, S. et al. Bacterial inoculations mitigate different forms of iron (Fe) stress and enhance nutrient uptake in rice seedlings (*Oryza sativa* L.). **Environmental Technology & Innovation**, v. 26, p. 102326, 2022.
- COSTA, J. D. S. **Diversidade fenotípica, genética e simbiótica de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas florestais em viveiro**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- COSTA, A. M. **Simbioses de rizóbio com espécies leguminosas arbóreas em viveiro florestal no Quadrilátero Ferrífero**. Monografia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- COSTA, E. M. DA et al. Acid and high-temperature tolerant Bradyrhizobium spp. strains from Brazilian soils are able to promote *Acacia mangium* and *Stizolobium aterrimum* growth. **Symbiosis**, v. 83, n. 1, p. 65–78, 2021.
- DARY, M. et al. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 323–330, 2010.
- DIABATE, M. et al. Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African tropical rainforest and inoculation response of native species useful in reforestation. **New Phytologist**, v. 166, p. 231–239, 2005.
- DOBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression. **Nature**, 1966.
- FAN, M. et al. Isolation, characterization, and selection of heavy metal-resistant and plant

growth-promoting endophytic bacteria from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a Pb/Zn mining area. **Microbiological Research**, v. 217, n. September, p. 51–59, 2018.

FAVERO, V. O. et al. Characterization and nodulation capacity of native bacteria isolated from mung bean nodules used as a trap plant in Brazilian tropical soils. **Applied Soil Ecology**, v. 167, p. 104041, nov. 2021.

FERREIRA, P. A. A. et al. New rhizobia strains isolated from the Amazon region fix atmospheric nitrogen in symbiosis with cowpea and increase its yield. **Bragantia**, v. 78, n. 1, p. 38–42, 2019.

FIGUEIREDO, M. A. DE et al. Nitrogen and molybdenum fertilization and inoculation of common bean with *Rhizobium* spp. in two oxisols. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 1, p. 85–92, 2016.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. DE. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 897–903, 1997.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. Laboratory Manual of General Microbiology: With Especial Reference to the Microorganisms of the Soil. **McGraw-Hill**, New York, NY, USA, USA, 1928.

FREITAS, A. D. S. et al. Biological nitrogen fixation in tree legumes of the Brazilian semi-arid caatinga. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 3, p. 344–349, 2010.

FRITSCHI, F. B.; RAY, J. D. Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll a/b ratio. **Photosynthetica**, v. 45, n. 1, p. 92–98, 2007.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6726–6733, 2012.

HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M. J.; LUCAS, M. M.; FELIPE, M. R. DE. Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 645–657, 2002.

HERNÁNDEZ, L. E. et al. Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 10, p. 2901–2911, 2015.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station. University of California, Berkeley, CA**, n. circular no. 347, 1950.

JARAMILLO, P. M. D. et al. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 6, p.

397–404, 2013.

JELIHOVSCHI, E.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, I. B. ScottKnott: A Package for Performing the Scott-Knott Clustering Algorithm in R. **Trends in Applied and Computational Mathematics**, v. 15, n. 1, p. 3–17, 2014.

JINAL, H. N. et al. Phytoextraction of iron from contaminated soils by inoculation of iron-tolerant plant growth-promoting bacteria in Brassica juncea. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 32815–32823, 2019.

LINDSTRÖM, K.; MOUSAVI, S. A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 1314–1335, 2020.

LOPEZ, B. D. O. et al. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia nodulating legumes in a mining area in southeast Brazil. **Scientia Agricola**, v. 79, n. 2, 2022.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum**, v. 1, n. 3, 2016.

LPWG, T. L. P. W. G. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44–77, 2017.

MACEDO, M. O. et al. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 5–6, p. 1516–1524, 2008.

MALAVASI, U. C.; MALAVASI, M. DE M. Dormancy breaking and germination of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong seed. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 851–854, 2004.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: adubos e adubação**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981.

MAPA. Instrução Normativa SDA/MAPA 13/2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

MASTERSON, R. V.; PRAKASH, R. K.; ATHERLY, A. G. Conservation of symbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 1, p. 21–26, 1985.

MONTALVÁN-OLIVARES, D. M. et al. Multi-element contamination in soils from major mining areas in Northeastern of Brazil. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 43, n. 11, p. 4553–4576, 2021.

MOREIRA, F. M. DE S.; CARVALHO, T. S. DE; SIQUEIRA, J. O. Effect of fertilizers, lime, and inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on the growth of four leguminous tree species in a low-fertility soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 8, p. 771–779, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 7, p. 889–895, 1998.

MOREIRA FMS.; SIQUEIRA JO. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2a ed. Lavras: UFLA; 2006.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from. **Cold Spring Harbor Laboratory Press Method**, v. 1, p. 1–31, 2015.

PRIMIERY, S. et al. Variability in symbiotic effectiveness of N₂ fixing bacteria in Mimosa scabrella. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 19–25, 2016.

RAHAL, S.; CHEKIREB, D. Diversity of rhizobia and non-rhizobia endophytes isolated from root nodules of Trifolium sp. growing in lead and zinc mine site Guelma, Algeria. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 3839–3849, 2021.

RANGEL, W. M. et al. Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of Leucaena leucocephala on contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 2, p. 142–156, 2017.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.

RODRIGUES, T. L. et al. Diversity and biotechnological potential of rhizobia isolated from lima bean nodules collected at a semiarid region. **Soil Science Society of America Journal**, v. 85, n. 5, p. 1663–1678, 2021.

RODRÍGUEZ-SEIJO, A. et al. Limitations for revegetation in lead/zinc minesoils (NW Spain). **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 4, p. 785–793, 2014.

SALAS, A. et al. The Hemoglobin B_{jgb} From Bradyrhizobium diazoefficiens Controls NO Homeostasis in Soybean Nodules to Protect Symbiotic Nitrogen Fixation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–11, 2020.

SANKARI, S.; O'BRIAN, M. R. Synthetic lethality of the bfr and mbfA genes reveals a functional relationship between iron storage and iron export in managing stress responses in bradyrhizobium japonicum. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2016.

SILVA, A. O. et al. Plant growth-promoting rhizobacterial communities from an area under the influence of iron mining and from the adjacent phytophysionomies which have high genetic diversity. **Land Degradation and Development**, v. 31, n. 16, p. 2237–2254, 2020.

SILVA, V. S. G. et al. Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree Leucaena leucocephala derived from several soil classes of Brazilian Northeast region. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 3, p. 478–485, 2018.

SILVA, A. R. DA; MALAFAIA, G.; MENEZES, I. P. P. Biotools: An R function to predict spatial gene diversity via an individual-based approach. **Genetics and Molecular Research**,

v. 16, n. 2, p. 1–6, 2017.

SOUZA, R. et al. Genome of *Pseudomonas* sp. FeS53a, a Putative Plant Growth- Promoting Bacterium Associated with Rice Grown in Iron-Stressed Soils. **Genome Announcements**, v. 3, n. 2, p. 14–15, 2015.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia mangium*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, n. 3, p. 743–753, 2001.

WEI, T.; SIMKO, V. R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). 2017.

XIA, X. et al. Effects of nitrogen concentrations on nodulation and nitrogenase activity in dual root systems of soybean plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 63, n. 5, p. 470–482, 2017.

Table 1. Chemical properties and interpretation of the soil sample, collected at a depth of 0-20 cm in Itabira-MG

pH	P rem	P avail	K	S	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	
H₂O	----- mg dm⁻³ -----				----- cmol_c dm⁻³ -----					
6.4	7.0	1.1	28.2	115.0	0.01	1.1	0.2	0.0	1.6	
H	VL	VL	L	VG	VL	L	L		L	
B	Cu	Fe	Mn	Zn	BS	CEC	V%	O.M.	m	N
----- mg dm⁻³ -----				-cmol_c dm⁻³		----- % -----				
0.07	0.5	79.1	23.2	1.0	1.38	2.98	46.31	1.5	0.0	0.0
VL	L	VH	VH	M	L	L	M	L		

pH in water: 1:2.5 (relation soil:water); P rem- Remaining P; P avail- Available P; BS – Base saturation
 O.M.- Organic Matter; BS – Base saturation; CEC – Cation Exchange Capacity at pH 7.0; V% - Base
 saturation index; m%- Aluminium saturation index; L: low; VL: very low; M: medium; H: high; VH:
 very high

Table 2. Origin of *Bradyrhizobium sp.* strains tested in the experiments

Strain	Origin			Contents in the soil or substrate of origin mg dm ³		Reference
	Region/State	LUS	Host Plant	Fe	Mn	
UFLA 04-526; UFLA 04-533 UFLA 04-548; UFLA 04-563 UFLA 04-567; UFLA 04-571 UFLA 04-572; UFLA 04-575 UFLA 04-686; UFLA 04-687 UFLA 04-689; UFLA 04-694 UFLA 04-698; UFLA 04-700 UFLA 04-702; UFLA 04-704 UFLA 04-706; UFLA 04-707 UFLA 04-709; UFLA 04-710 UFLA 04-711; UFLA 04-715 UFLA 04-717; UFLA 04-725 UFLA 04-726; UFLA 04-728 UFLA 04-735	Brumadinho- MG	RA	<i>M. atropurpureum</i>	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	Silva et al.(2020)
UFLA 01-1163; UFLA 01-1164 UFLA 01-1169; UFLA 01-1171	Nova Lima- MG	TSN	<i>M. nycitans</i>	100.41 ^(VH)	29.88 ^(VH)	Costa (2018)
UFLA 01-811; UFLA 01-814 UFLA 01-816; UFLA 01-834 UFLA 01-839; UFLA 01-860 UFLA 01-883; UFLA 01-873	Sabar-MG	TSN	<i>M. nycitans and E. schomburgkii</i>	34.58 ^(M)	84.73 ^(VH)	Costa (2014)

LUS: Land use system from which the strain was isolated; RA: Rehabilitated Area revegetated with grass; TSN: tree seedling at nursery; MG: Minas Gerais; M: medium; VH: very high

Table 3. Genes found in genomes of selected NFNB strains native from soils with high Fe and Mn contents

Strain	Genome Size	Genome Completeness	Gene							
			<i>pin5</i>	<i>acdS</i>	<i>sodA</i>	<i>bfr</i>	<i>gshB</i>	<i>gor</i>	<i>nodC</i>	<i>nifH</i>
			Encode Protein							
			Auxin efflux carrier	ACC-deaminase	Superoxide dismutase [Fe]	Bacterioferritin	Glutathione synthetase	Glutathione reductase	Nodulation protein c	Nitrogenase Fe protein
UFLA 04- 567	8,758,772	100								
UFLA 04- 571	8,170,827	99.87								
UFLA 04- 572	8,175,804	99.83								
UFLA 01-860	9,231,234	99.84								
UFLA 01-883	9,250,428	99.38								

Genomic DNA analysis done with the help of open source software and KBASE data platform (ARKIN et al., 2018); + = have the corresponding gene

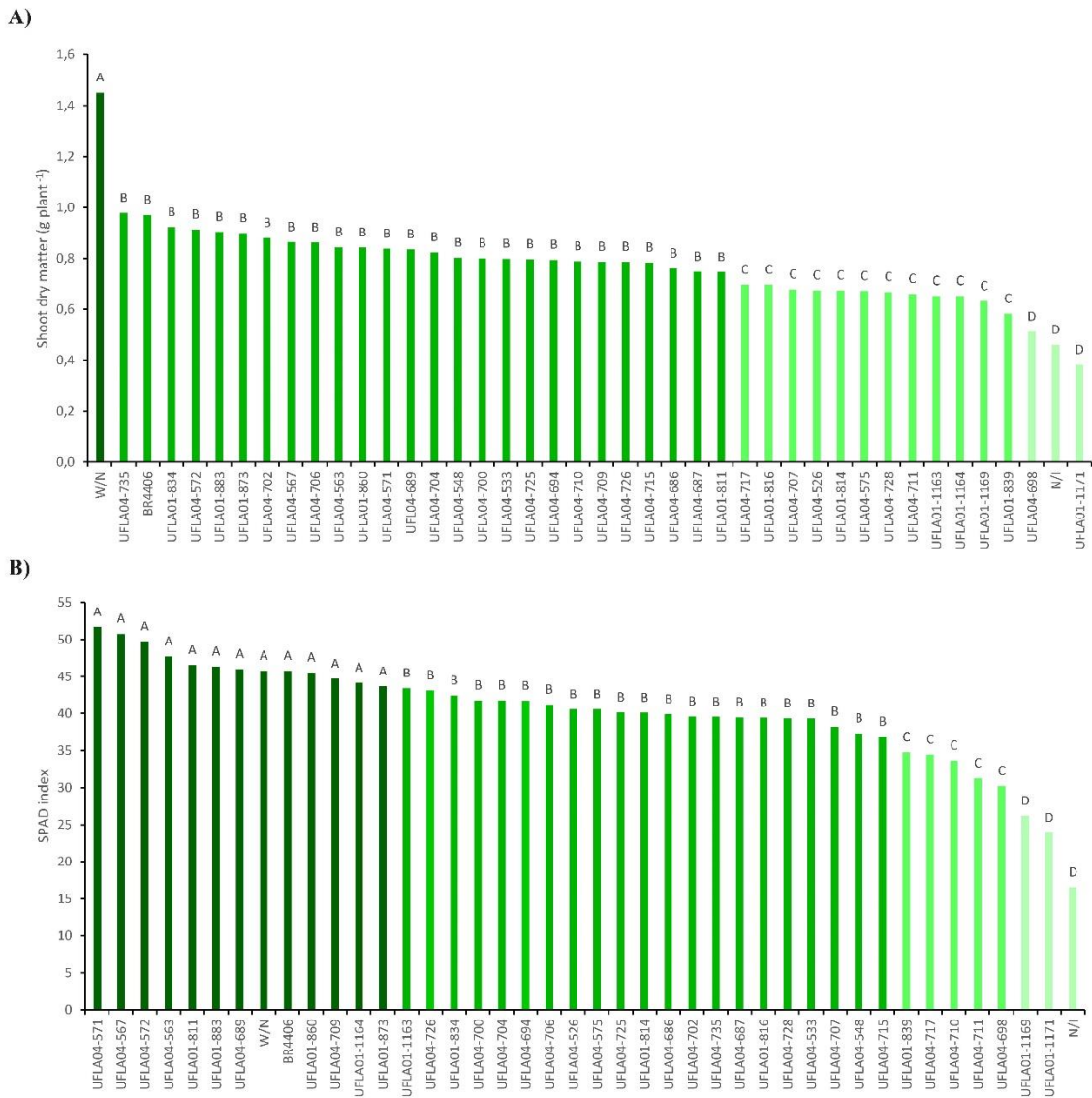


Fig. 1. Shoot dry matter (A) and SPAD index (B) in function of the different treatments inoculated with *Bradyrhizobium* strains or not inoculated without N addition (N/I) or with N addition (W/N). Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Different shades represent the different means grouping by the Skott-Knott test.

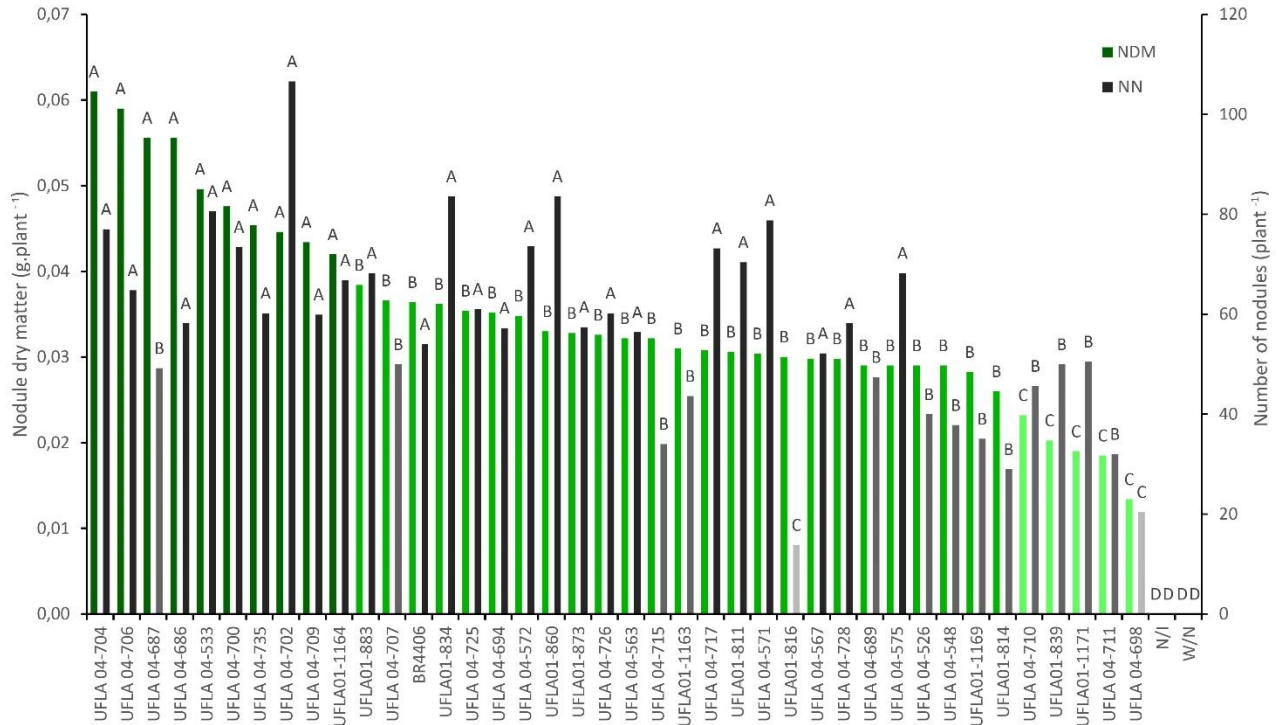


Fig. 2. Number of nodules and Nodule dry matter in function of the different treatments inoculated with *Bradyrhizobium* strains or not inoculated without N addition (N/I) or with N addition (W/N). Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Different shades represent the different means grouping by the Skott-Knott test. Statistical comparisons were made with the transformation $\sqrt{x} + 0,5$ for the variable NN and the transformation \sqrt{x} for the variable NDM.

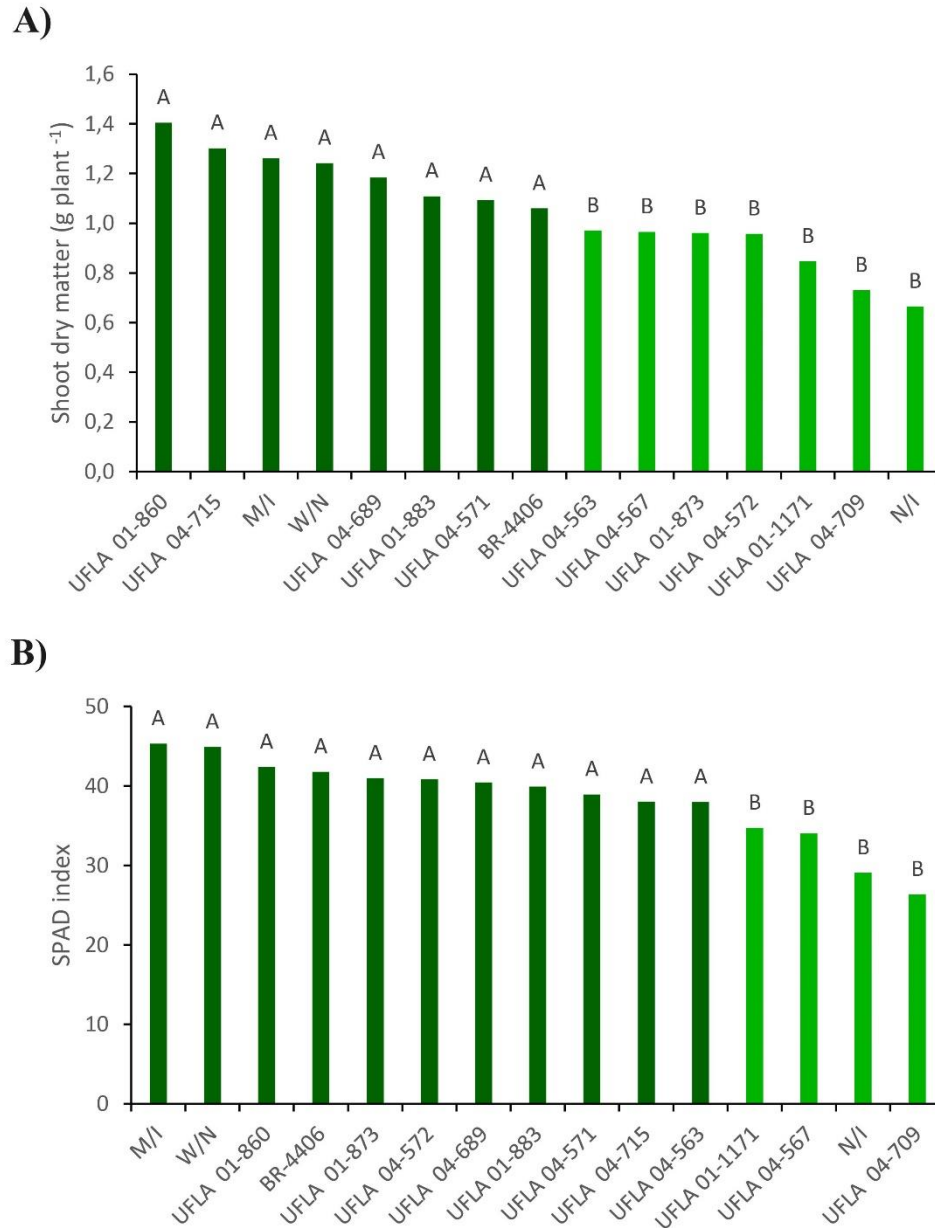


Fig. 3. Shoot dry matter (A) and SPAD index (B) in function of the different treatments inoculated with *Bradyrhizobium* strains or not inoculated without N addition (N/I) or with N addition (W/N), M/I: Mixed inoculation with *Bradyrhizobium* strains. Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Different shades represent the different means grouping by the Skott-Knott test. Statistical comparisons were made with the transformation $\chi^{2.25}$ for the variable SPAD index.

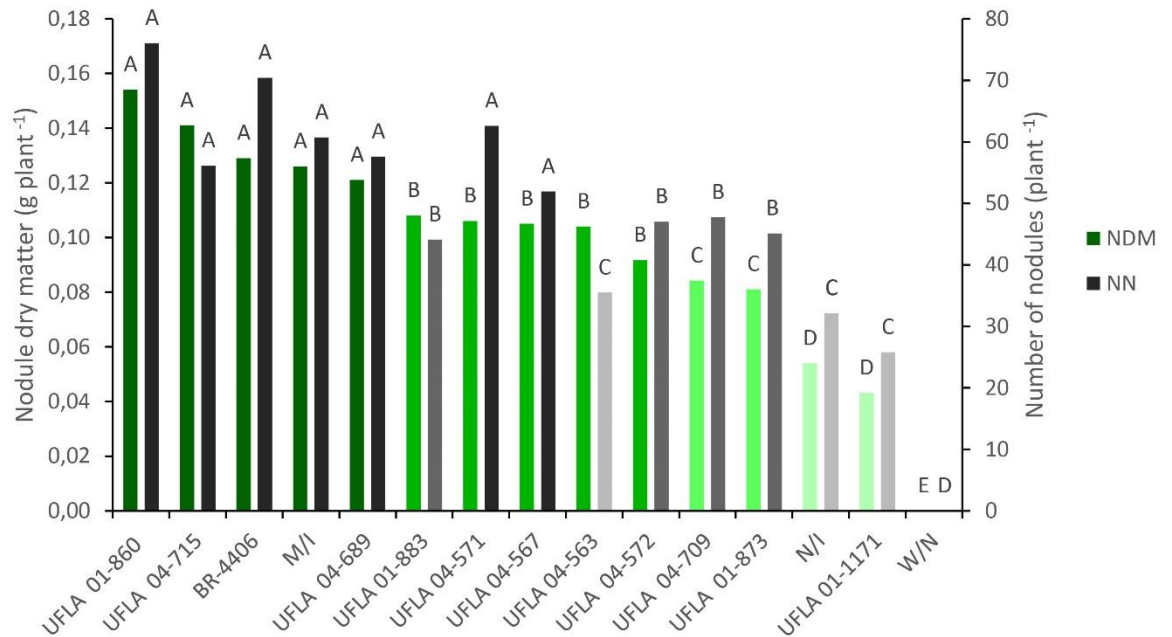


Fig. 4. Number of nodules and Nodule dry matter in function of the different treatments inoculated with *Bradyrhizobium* strains or not inoculated without N addition (N/I) or with N addition (W/N), M/I: Mixed inoculation with *Bradyrhizobium* strains. Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Different shades represent the different means grouping by the Skott-Knott test. Statistical comparisons were made with the transformation \sqrt{x} for the variables NN and NDM.

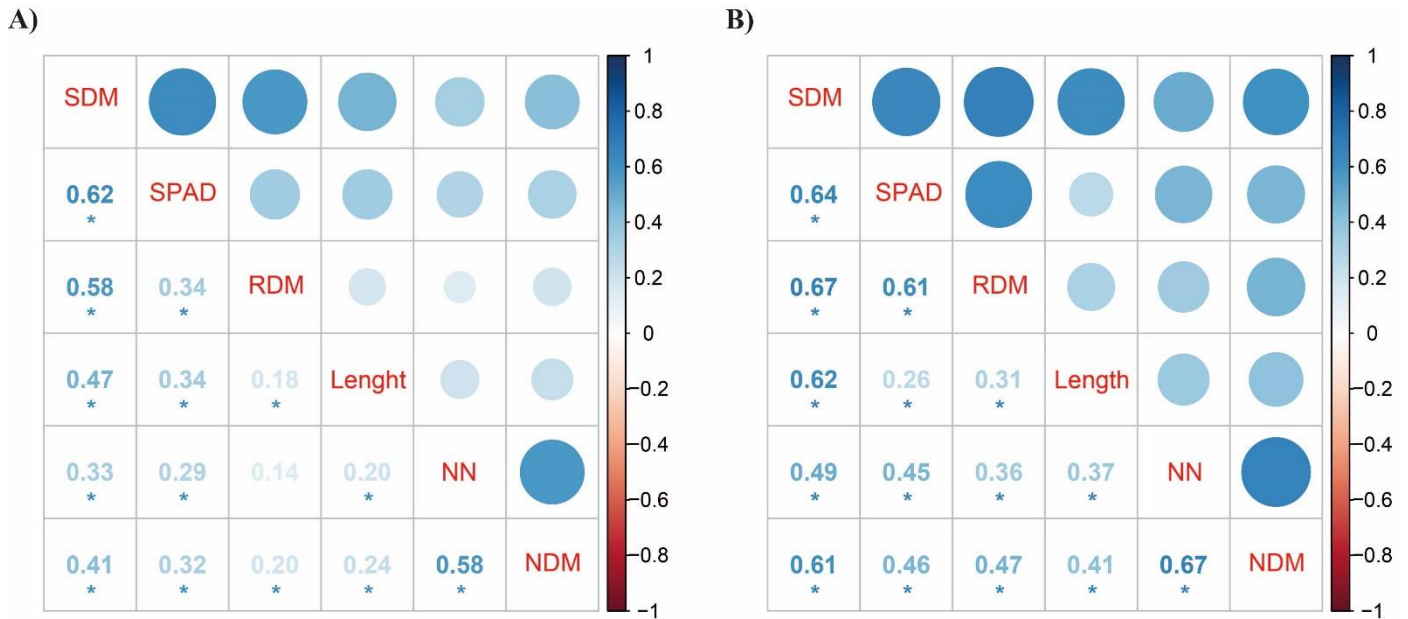
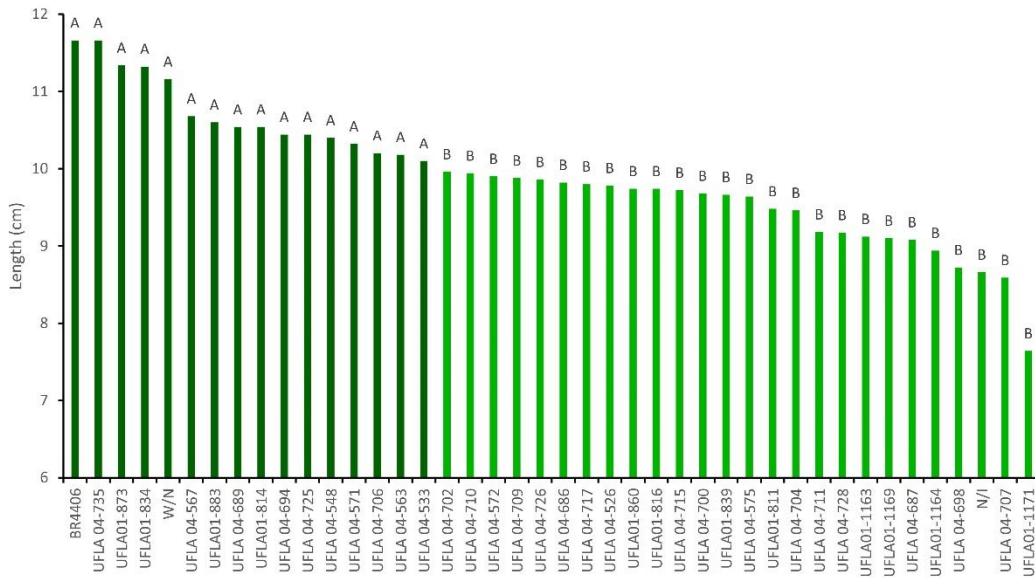


Fig. 5. Correlation matrix between the response variables, in sand and vermiculite (A) in soil (B), SDM: Shoot dry matter; SPAD: SPAD index; RDM: Root dry matter; NN : Number of nodules; NDM: Nodule dry matter; The stronger the color, the greater the positive correlation between the variables; * indicates significant correlation by the t-test ($p < 0.05$).

Supplementary material

A)



B)

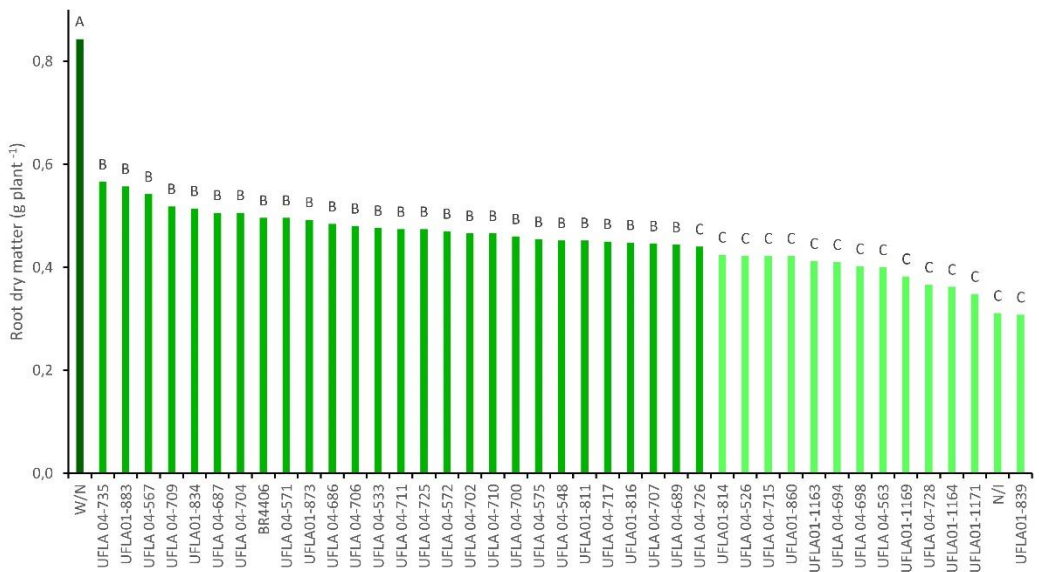


Fig. S1 Length (A) and Root dry matter (B) in function of the different treatments inoculated with *Bradyrhizobium* strains or not inoculated without N addition (N/I) or with N addition (W/N). Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Different shades represent the different means grouping by the Skott-Knott test. Statistical comparisons were made with the transformation $\log x$ for the variable Length and the transformation \sqrt{x} for the variable Root dry matter

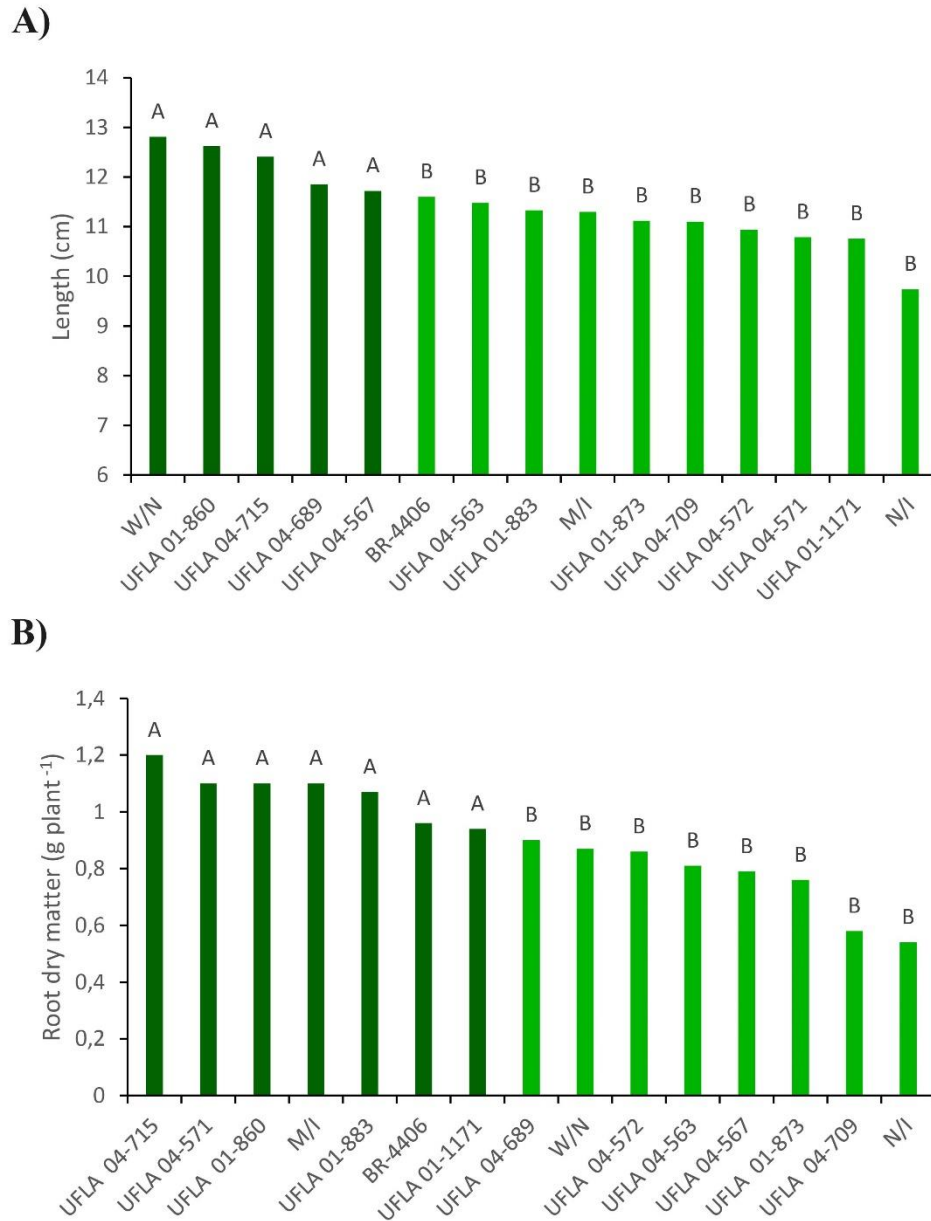


Fig. S2. Root dry matter (A) and Length (B) in function of the different treatments inoculated with *Bradyrhizobium* strains or not inoculated without N addition (N/I) or with N addition (W/N). M/I: Mixed inoculation with *Bradyrhizobium* strains. Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Different shades represent the different means grouping by the Skott-Knott test.

ARTIGO 2. Promotion of growth and accumulation of P in *Paspalum densum* and genomic annotation of phosphate solubilizing bacteria isolated from iron mining areas

Resumo: Gramíneas nativas em associação com bactérias solubilizadoras de fosfato são uma importante alternativa para o processo de recuperação de áreas degradadas por aumentarem os teores de matéria orgânica e fósforo disponível, sem afetarem o processo de sucessão natural. Porém a falta de estudos com gramíneas nativas em associação com estirpes também nativas torna-se um empecilho para um maior emprego dessa combinação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de estirpes de diferentes gêneros solubilizadores de fosfato provenientes de áreas de mineração de ferro (Fe) em associação com *Paspalum densum*. e avaliação do DNA genômico. Inicialmente foi realizado um teste de solubilização *in vitro* com 58 estirpes inoculadas em meio GELP contendo FePO_4 mais extrato de solo da região de origem das estirpes, comparadas com um controle sem inoculação. Posteriormente, nove estirpes selecionadas entre as 58, foram testadas utilizando o mesmo solo utilizado no ensaio *in vitro*, em associação com *Paspalum densum* e tendo como controles os tratamentos com e sem fonte solúvel ou insolúvel de P sem inoculação. Quatro estirpes foram selecionadas com base no ensaio em solo para o estudo do DNA genômico. Três das quatro estirpes selecionadas para o sequenciamento do DNA genômico apresentaram um bom desempenho nas variáveis analisadas no ensaio com *Paspalum densum* em solo, dentre elas a estirpe UFLA 219 do gênero *Burkholderia* que havia apresentado também o melhor desempenho no teste *in vitro*. A análise do DNA genômico mostrou a presença de uma série de genes com importante papel na solubilização de fosfato com destaque para os genes ligados a produção de ácidos orgânicos. Assim foi demonstrado que potencialmente a produção de ácidos orgânicos foi o principal mecanismo utilizado pelas estirpes no processo de solubilização de fosfato.

Palavras-chave: solubilização de fosfato; *Paspalum densum*, ácidos orgânicos, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*

1 Introdução

A mineração é vital para o sustento humano e um setor crucial na economia do Estado. É uma atividade que contribui diretamente para a qualidade de vida da sociedade, no entanto, produz uma ampla gama de impactos que afetam diretamente os ecossistemas, causando alterações na topografia e nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, na vegetação e na dinâmica da água no solo, além das relações entre esses fatores (TEIXEIRA; JOSÉ DE MELO; TOMÉ SILVA, 2007). Portanto, a restauração da vegetação se apresenta como ferramenta necessária no processo de recuperação dessas áreas no sentido restabelecer e normalizar ciclos biogeoquímicos importantes para a resiliência ecológica (CHANG et al., 2022).

Neste processo de recuperação das áreas de mineração um dos grandes desafios é o estabelecimento de espécies vegetais nativas que rapidamente acumulem biomassa, matéria orgânica e nutrientes no solo, criando assim uma cobertura vegetal estável (SILVA et al., 2018). Neste sentido o emprego de gramíneas nativas se apresenta como uma importante aliada devido ao seu crescimento rápido, à sua capacidade de gerar um grande número de descendentes dentro de um ciclo de vida curto (RIOS et al., 2017), e adaptar a esses ambientes. Dentre essas gramíneas se destaca *Paspalum densum*, uma espécie nativa que apresenta características favoráveis de resistência a níveis elevados de ferro disponível, com potencial uso para a revegetação de ambiente impactado pela deposição de rejeito e estéreis de mineração por ferro (SIQUEIRA-SILVA; RIOS; PEREIRA, 2019).

O gênero *Paspalum* é também conhecido por se associar com uma diversa comunidade de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) (ZHOU; ZHU; YAO, 2018), incluindo as que tem a capacidade de solubilizar fontes insolúveis de fósforo (PAULA et al., 2022). A disponibilidade de fósforo e nitrogênio é o principal fator químico limitante para a recuperação da cobertura vegetal (RODRÍGUEZ-SEIJO et al., 2014). Baixos níveis de disponibilidade de fósforo no solo também podem afetar a fixação biológica de nitrogênio, um outro importante processo das BPCPs, isso devido ao seu papel no metabolismo energético (MOREIRA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2010).

O fósforo ocorre no solo em formas orgânicas e inorgânicas. Formas orgânicas de fósforo, geralmente derivadas de processos metabólicos biológicos, compreendem compostos como fosfatos de açúcar, fosfolipídios, ácidos nucleicos e fosfatos de inositol, já as formas inorgânicas

compreendem fosfatos ligados a minerais como fosfato de cálcio, fosfato de alumínio e fosfato de ferro (RAWAT et al., 2021). Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) tem a capacidade de transformar formas inorgânicas de fósforo indisponíveis para as plantas, em formas disponíveis, principalmente através do processo de liberação de ácidos orgânicos com baixo peso molecular que tem a capacidade de reduzir o pH e quelar o metal que acompanha o íon fosfato (MARRA et al., 2012). Outro importante mecanismo é o processo de mineralização das formas orgânicas de fósforo pela atividade catalítica específica de enzimas fosfatase (BAGEWADI et al., 2022). Além destes é relatado na literatura mecanismos como produção e liberação de sideróforos (REIBER et al., 2005) e exopolissacarídeos (YI; HUANG; GE, 2008).

Um dos fatores que definem o sucesso da solubilização é a capacidade das BSF em realizar uma boa colonização da rizosfera que é a região do solo que compreende 3-5 mm do rizoplane (HILTNER 1904). Para que isso ocorra as BSF precisam competir para se beneficiar dos exsudatos radiculares ricos em fontes de carbono e nutrientes. A capacidade de competição pode ser influenciada por fatores como a motilidade ativa das BSF, capacidade de formação de biofilme, fuga de predação e adaptação a fatores edáficos da planta e do solo (HELAL; EL-KHAWAS; ELSAYED, 2022).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes estirpes de BSF provenientes de áreas de mineração de ferro (Fe) *in vitro* e em associação com *Paspalum densum* em condições de solo coletado no município de Itabira-MG na região do Quadrilátero Ferrífero, sequenciar seus genomas e prospectar genes relacionados a solubilização. A hipótese é que estirpes isoladas de áreas de mineração de Fe possuem capacidade adaptativa à essas condições e diferentes mecanismos para solubilização de fosfato determinados geneticamente.

2 Material e Métodos

Origem das estirpes

Neste trabalho foram estudadas 58 estirpes de gêneros conhecidos na literatura como potenciais solubilizadores de fosfato, sendo eles: *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* (COSTA et al., 2015), *Bacillus* (VAZQUEZ et al., 2000), *Gluconacetobacter* (DELAPORTE-QUINTANA et al., 2017) e *Rhizobium* (MARRA et al., 2011). Estas estirpes são oriundas da coleção do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo (SBMPBS) da Universidade Federal de Lavras. Trinta e seis estirpes foram selecionadas entre as

estirpes isoladas por Pinto et al. (2020), de amostras de solo coletadas em áreas de Cerrado, Canga, Mata Atlântica e em uma área em processo de reabilitação com predominância de gramíneas, todas sob influência de mineração de ferro e pertencentes à empresa Vale S.A, nos municípios de Nova Lima, no centro de Tecnologia de Ferrosos-Miguelão e em Brumadinho, na Mina Córrego do Feijão. As demais estirpes utilizadas neste estudo foram selecionadas entre as estirpes isoladas por Silva et al. (2020), de amostras de solo coletadas de uma área revegetada com capim (RA) na Mina Córrego do Feijão em Brumadinho/MG, pertencente à Vale S.A, localizada no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, sudeste do Brasil. Para realizar a captura das estirpes dessas amostras Silva et al. (2020) utilizaram a espécie promíscua sirato (*Macroptilium atropurpureum*) como planta isca (Table 1).

Teste de solubilização *in vitro*

A capacidade de 58 estirpes isoladas por Silva et al. (2020) e Pinto et al. (2020) em solubilizar fosfato inorgânico insolúvel na forma de FePO_4 , foi testada em meio líquido GELP (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) contendo (g L^{-1}): glicose, 10,0; peptona, 5,0; extrato de levedura, 0,05; extrato de solo, 100 mL (sobrenadante filtrado de 1kg de solo diluído em 1L de água destilada, autoclavado e deixado em repouso por 48h); MgSO_4 , 0,2 g L^{-1} ; CaCl_2 , 0,02 g L^{-1} ; NaCl , 0,1 g L^{-1} ; solução de micronutrientes, 2 mL ($\text{Ca}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,200; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,235; H_3BO_3 , 0,280; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,024, dissolvido em 200 mL de água destilada); KNO_3 , 0,1 g L^{-1} ; Fe-EDTA (1,64 %), 4 mL. Este meio de crescimento foi suplementado com 200 mg $\text{FePO}_4 \text{ L}^{-1}$. O pH foi ajustado para 7.

Para padronização do inóculo as estirpes foram previamente crescidas separadamente em meios líquidos 79 (FRED E WAKSMAN 1928) ou GNA (caldo nutritivo Oxoid, 20 g L^{-1} , glicose, 5 g L^{-1} e pH 6,8) sendo ajustada sua concentração para 10^8 UFC mL^{-1} , com posterior inoculação de uma alíquota de 1 mL em 50 mL de meio GELP, contendo FePO_4 . As culturas foram incubadas por 7 dias com a agitação de 130 rpm. No fim desse período cada amostra foi centrifugada a 19187 g por 5 min. O controle consistiu do meio GELP com a fonte de fosfato testada na ausência de inóculo bacteriano.

A capacidade de cada estirpe para solubilizar fosfato foi determinada pela diferença entre a quantidade de fósforo solúvel encontrado no meio de cultura inoculado e a quantidade encontrada no controle determinadas com auxílio do aparelho ICP OES, seguindo as orientações propostas por Marra et al. (2012).

Eficiência das estirpes em condições de solo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no SBMPBS (UFLA) de março a junho de 2021. O solo utilizado, classificado como *Plintossolo pétrico*, foi coletado no município de Itabira MG, em uma área adjacente a uma área de Canga, na região do Quadrilátero Ferrífero (19°36'41.2" S 43°12'59.5"W). A região de Itabira é conhecida por sua tradição na extração de minério de Fe, sendo o local da fundação da empresa Vale S.A (antiga Companhia Vale do Rio Doce) (GUIMARÃES; MILANEZ, 2017). Foram utilizados vasos contendo 3 dm⁻³ de solo coletado na camada de 0 – 20 cm, previamente seco, homogeneizado e passado por uma peneira de 4 mm. Antes da implementação do ensaio foi realizado uma análise química do solo (Table 2), a qual serviu de base para realizar a seguinte adubação segundo Malavolta (1981): 300 mg.dm⁻³ de N, 70 mg.dm⁻³ de Ca, 25 mg.dm⁻³ de Mg, 150 mg.dm⁻³ de K, na forma de NH₄NO₃, Ca(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂ e KNO₃ respectivamente, e de micronutrientes correspondente a 0,5 mg.dm⁻³ de B, 1,5 mg.dm⁻³ de Cu, 3,6 mg.dm⁻³ de Mn, 0,1 mg.dm⁻³ de Mo, 5 mg.dm⁻³ de Zn na forma de H₃BO₃, CuSO₄.5H₂O, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O e ZnSO₄.7H₂O respectivamente. A irrigação foi realizada manualmente, mantendo a umidade do solo em cerca de 70% da capacidade de campo.

Foram utilizados os seguintes tratamentos: inoculação de 9 diferentes estirpes que apresentaram no teste *in vitro* alta eficiência (UFLA 219, UFLA 237, UFLA 218, UFLA 234, UFLA 217, UFLA 238, UFLA 233, UFLA 230), média eficiência (UFLA 04-565) ou baixa eficiência (UFLA 245) e inoculação mista com todas as estirpes de maior eficiência do teste *in vitro*, em vasos com solo contendo fosfato de ferro insolúvel na forma de FePO₄ (200 mg P. dm⁻³); 6 diferentes doses de P₂O₅ (25, 50, 100, 200, 300, 400 P mg. dm⁻³) na forma de Superfosfato Triplo, um controle sem inoculação com FePO₄ (200 mg P. dm⁻³) e um controle sem P e sem inoculação, totalizando 19 diferentes tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi blocos casualizados com 5 repetições, totalizando 95 unidades experimentais.

Antes do plantio, sementes de *Paspalum densum*, foram desinfetadas usando peróxido de hidrogênio H₂O₂ (2 minutos), com uma posterior lavagem em água destilada. Depois as sementes foram colocadas para germinar em uma bandeja contendo areia lavada e vermiculita (1:1, v/v), autoclavados duas vezes por 40 min em pressão de 1,5 kg cm⁻² a 127° C, sendo umedecidas com água destilada estéril. Após a formação das plântulas, as mesmas foram transplantadas para os vasos.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio líquido GNA por 3 dias a 28°C sob agitação de 110 rpm. Para cada tratamento inoculado, 1 mL de inóculo na concentração de 1×10^9 células por ml, foi adicionado para cada plântula.

Aos 100 dias após a inoculação foi determinada a eficiência fotossintética pela fluorescência da clorofila (PSII) com auxílio do aparelho Multispeq. Após as leituras, foram avaliados os parâmetros número de perfilhos (NP) e altura para então as plantas serem coletadas e avaliado a matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), e concentração de fósforo na parte área. Além disso após a colheita foi coletado o solo rizosférico para avaliar o P disponível utilizando o método resina. As raízes e a parte aérea foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 60° C até apresentar um peso constante, para posterior pesagem em balança analítica.

Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software R 4.1.1 (R Core Team, 2018). Os resíduos da análise variância para cada modelo foram testados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância. Quando essas pressuposições foram atendidas, a análise de variância foi realizada nos dados, e após observada a significância do modelo pelo teste de F ($p < 0,05$), as médias das variáveis foram comparadas pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o pacote *scott-knott* 1.3.0 (JELIHOVSCHI; FARIA; ALLAMAN, 2014). O efeito da fonte insolúvel de fosforo versus a fonte solúvel nos parâmetros avaliativos foram comparados pelo teste de contraste de Scheffé ($p < 0,05$). Coeficientes de correlação de Pearson também foram estimados. Para gerar a curva de regressão, os pacotes *tidyverse* e *nlstools* foram usados (BATY et al., 2015). Do pacote *nlstools*, a função *nls* foi usado para gerar as curvas, e a função *nlsBoot* foi usada para gerar os intervalos de confiança usando bootstrap.

Extração e análise do DNA genômico

Quatro estirpes foram selecionadas com base na eficiência apresentada nos parâmetros matéria seca e acúmulo de fósforo na parte aérea e de fósforo disponível no solo além do teste de solubilização *in vitro* (UFLA 219, UFLA 237, UFLA 218 e UFLA 230). A extração do DNA genômico foi realizada inicialmente com o crescimento das estirpes selecionadas em meio GNA líquido, com posterior extração do DNA genômico das bactérias pelo Wizard® Genomic Kit de Purificação de DNA (Promega, Wisconsin, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Os sequenciamentos de próxima geração (NGS) foram realizados pela Admera Health Biopharma Services, de New Jersey, USA. O DNA genômico isolado foi quantificado com Qubit 2.0 DNA HS Assay (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) e a qualidade avaliada pelo TapeStation genomic DNA Assay (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). A preparação da biblioteca foi realizada usando o NexteraXT library kit (Illumina, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade final da biblioteca foi medida pelo KAPA SYBR® FAST qPCR com QuantStudio ® 5 System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e a qualidade da biblioteca avaliada pelo TapeStation HSD1000 ScreenTape (Agilent Technologies, CA, EUA). Foram utilizados índices duplos Illumina® de 8 nt. O agrupamento equimolar de bibliotecas foi realizado com base nos valores de QC e sequenciado em um Illumina® HiSeq X (Illumina, Califórnia, EUA) com uma configuração de comprimento de leitura de 150 PE para leituras de 1,6 M PE (0,8 M em cada direção) por amostra.

Utilizando o software de código aberto e plataforma de dados KBASE (ARKIN et al., 2018), os fragmentos obtidos no sequenciamento foram montados para obtenção dos respectivos genomas com auxílio do software SPAdes v3.13.0 (BANKEVICH et al., 2012). A qualidade dos genomas montados foi checada a partir do programa CheckM v1.0.18 (PARKS et al., 2015). Por fim as sequências foram anotadas funcionalmente utilizando a tecnologia RAST (Rapid Annotation Technology) (AZIZ et al., 2008). Após realizada a anotação dos genomas, sequências dos genes de interesse (*phoR*, *phoB*, *phoU*, *pstA*, *pstB*, *pstC*, *pstS*, *ppx*, *ppk*, *pepc*, *gdh*, *pqq*, *gltA*, *lldD*, *ugd*, *phoA*, *gadH1*, *gadH2*, *gadH3*, *fumC*, *fumA*, *mdh*, *aldH*, *sidE*) foram identificadas e analisadas através do RAST (AZIZ et al., 2008), com posterior checagem junto ao banco de dados GenBank (NCBI). Estes genes foram selecionados com base na literatura que relata sua importância no mecanismo de solubilização de fosfato (KAUR; SELVAKUMAR; GANESHAMURTHY, 2016; CHAUHAN et al., 2017; VORNHAGEN et al., 2019; WANG; LI; LI, 2003; DAI et al., 2018; SAICHANA et al., 2015; REIBER et al., 2005; KUMAR et al., 2013)

Por fim os genomas montados foram enviados para o MiGA (Microbial Genome Atlas)(RODRIGUEZ-R et al., 2018) e o módulo Preproc foi utilizado para identificar o gene 16S rRNA. As sequências do gene 16S rRNA foram comparadas com sequências do banco de dados GenBank (NCBI) para confirmar o gênero que cada estirpe pertencia.

3 Resultados

Solubilização *in vitro*

Cerca de 53 % das estirpes testadas apresentaram alguma capacidade de solubilização de FePO_4 , comprovadas pela diferença estatística em relação ao controle (p -valor $< 0,05$), destas merece destaque a estirpe UFLA – 219, que apresentou o mais alto incremento na solubilização chegando a solubilizar 25 % das 200 mg P. dm^{-3} de FePO_4 adicionado no meio, este valor é sete vezes maior que o apresentado pelo controle (Fig. 1). Seguida da estirpe UFLA -219, as estirpes UFLA-218, UFLA-237, UFLA-217, UFLA-238, UFLA-233, UFLA-234, UFLA-235 e UFLA-229 formaram o segundo grupo com maiores médias chegando a ser quase quatro vezes maior que o controle (Fig. 1).

Em relação a mudança de pH, o teste de correlação de Person's mostrou uma alta correlação negativa entre pH e incremento na solubilização de FePO_4 (p -valor $< 0,0001$), ou seja, houve um incremento na solubilização associada a uma tendência de queda do pH (Fig 2.). Estirpes como UFLA -219 e UFLA-218 do gênero *Burkholderia* que apresentaram altos incrementos na solubilização mostraram um pH em torno de 3,3. Por outro lado houve também o caso de estirpes como a UFLA -237 e UFLA -230 do gênero *Gluconacetobacter* que apresentaram bons índices de solubilização com o pH em torno de 6,7.

Eficiência das estirpes em vasos com solo

Os tratamentos tiveram um significativo efeito em todas variáveis estudadas ($p < 0,05$). As estirpes UFLA 219, UFLA 04-565, UFLA 237 e UFLA 218 formaram o grupo com os maiores valores para as variáveis MSPA, acúmulo de P na parte aérea e P disponível no solo, diferindo significativamente dos controles N/I + FePO_4 e N/I. Para estas três variáveis o controle N/I foi inferior ao controle N/I + FePO_4 . A estirpe UFLA 219 promoveu valores mais de duas vezes superiores ao controle N/I + FePO_4 nas três variáveis citadas. A análise de contraste mostrou um incremento nestas três variáveis pela adição de fontes solúveis de P em comparação com fontes insolúveis (Fig. 3A, B, D).

Diferentemente, na variável PSII diferenças significativas foram apenas encontradas entre o controle N/I e os demais tratamentos ($p < 0,05$), também na análise de contraste não houve diferença entre fontes solúveis versus fontes insolúveis. (Fig. 3C)

Nas variáveis conteúdo de P na parte aérea e NP o destaque foi para as estirpes UFLA 219, UFLA 04-565, UFLA 218, UFLA 238, UFLA 217, UFLA 237, UFLA 234 e UFLA 233 que formaram o grupo com maiores incrementos, diferindo significativamente dos controles N/I + FePO₄ e N/I (Fig S1A e D). Estirpes como a UFLA 219 e a UFLA 218 apresentaram um desempenho em torno de 50 % superior ao controle controles N/I + FePO₄ em ambas variáveis. A análise de contraste não mostrou diferenças entre fontes solúveis e insolúveis de P para a variável conteúdo de P na parte aérea, no entanto para a variável NP houve uma contribuição significativa da adição de fontes solúveis de P em comparação com fontes insolúveis (Fig S1A e D).

Na variável MSR as estirpes UFLA 219, UFLA 04-565 e UFLA 237 apresentaram os melhores resultados, sendo respectivamente 143%, 63% e 53 % superiores ao controle N/I + FePO₄ o qual diferiu significativamente do controle N/I (Fig. S1B). Já na variável altura nenhum tratamento inoculado conseguiu ser superior ao controle N/I + FePO₄ que foi superior a inoculação com UFLA 245 e o controle N/I (Fig. S1C). Com relação a análise de contraste, houve um incremento por parte da fonte solúvel de P em relação a fonte insolúvel (Fig. S1C).

A análise de regressão mostrou que a partir da dose 200 mg P solúvel dm⁻³ poucos acréscimos ocorreram com o aumento da dose de P, indicando que esta seria a dose ideal de P para a espécie *Paspalum densum*. Plotando o valor de MSPA do tratamento UFLA 219 + FePO₄ na curva de regressão é possível observar que a contribuição da estirpe UFLA 219 para disponibilidade de P para a planta ficou em torno de 4,43 mg P dm⁻³ (Fig. 4).

Análise do DNA genômico

A qualidade do DNA genômico das estirpes selecionadas UFLA 219, UFLA 237, UFLA 218 e UFLA 230 foi checada e apresentou uma completude entre 99,0 e 100,0. (Table S1). Foram encontrados em todas estirpes genes ligados ao sistema regulatório do fosfato como os genes *phoR*, *phoB* e *phoU*, assim como genes envolvidos no transporte do fosfato, o chamado sistema transportador ABC de fosfato (*pstS*, *pstA*, *pstB* e *pstC*) (Table 3). Enzimas como exopolifosfatase (*ppx*) e polifosfato quinase (*ppk*), que catalisam a hidrólise do polifosfato inorgânico P para liberar ortofosfato, também tiveram seus genes codificados nos quatro genomas analisados. Genes codificando a fosfoenolpiruvato carboxilase (*Pepc*) que incrementam a disponibilidade de oxaloacetato, também estão presentes nas quatro estirpes. Também foram encontradas em todas estirpes, genes relacionados a produção de expolisacarídeos como o gene *ugd*, responsável pela codificação da proteína UDP-glicose 6-desidrogenase. Genes responsáveis pela codificação de

proteínas ligadas a síntese dos sideróforos como o gene *sidE*, foram observados apenas nas estirpes UFLA 218 e UFLA 219. Já genes ligados a produção das fosfatases foram encontrados em todas as sequências analisadas.

Com relação aos genes ligados a produção dos ácidos orgânicos, para o ácido glucônico foi encontrado em todas as sequências o gene *pqq* responsável por sintetizar a proteína pirroloquinolina-quinona sintase, no entanto apenas as estirpes UFLA 230 e UFLA 237 apresentaram o gene *gdh* responsável pela síntese da proteína Glicose desidrogenase. Já para a produção do ácido 2-Ketoglucônico o operon *gadH 123* da proteína Gluconato 2-desidrogenase foi observado nas quatro sequências analisadas. Também foi detectado em todas sequências analisadas a presença dos genes *lldD* da proteína L-lactato desidrogenase, *gltA* da proteína citrato (Si)-sintase e *aldH* da proteína aldeído desidrogenase envolvidos respectivamente na síntese do ácido láctico, do ácido cítrico e do ácido acético. Por fim para o ácido málico foi observado presença dos genes *fumC* e *fumA* ligados a síntese da proteína fumarato hidratate em todas sequências, no entanto apenas estirpes UFLA 218 e UFLA 219 apresentaram o gene *mdh* responsável pela síntese da proteína malato desidrogenase

A análise do gene 16S rRNA identificado do genoma, comprovou as identificações anteriores realizadas por Pinto et al. (2020) e Silva et al. (2020) que as estirpes UFLA 218 e UFLA 219 pertenciam ao gênero *Burkholderia* e as estirpes UFLA 230 e 237 pertenciam ao gênero *Gluconacetobacter* (Table 3).

4 Discussão

Mecanismos que possibilitam a otimização na aquisição do nutriente P pelas plantas associados ao emprego de espécies com a capacidade de gerar um grande número de descendentes em um curto período tempo são grandes aliados no processo de recuperação de áreas degradadas. Esse nutriente é importante no metabolismo energético das plantas associado a necessidade de se aumentar os teores de matéria orgânica em áreas degradadas (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003; STUMPF et al., 2014). Neste sentido o emprego de BSF em associação com gramíneas aparece como uma boa alternativa para atingir este objetivo.

Os dados da solubilização *in vitro* mostraram que o principal mecanismo de solubilização de fontes insolúveis de P apresentado pela maioria das estirpes estudadas está ligado a queda do pH levando a suposição de que a produção de ácidos orgânicos foi o grande responsável pela

solubilização do FePO_4 (Fig. 1 e 2). De fato, ácidos orgânicos ao serem liberados provocam a protonação (produção de H^+) e quelação de cátions, no caso do presente estudo o cátion Fe^{+2} , com isso a parte aniônica do ácido se ligaria ao Fe^{+2} e os íons H^+ se ligariam ao anión PO_4^{-3} , provocando dessa forma a liberação de formas solúveis de P e queda de pH provocado pelo aumento da concentração do H^+ no meio (ZHU et al., 2022).

No entanto também foi observado incremento na solubilização sem que houvesse redução do pH, que foi o caso das estirpes UFLA 230 e UFLA 237. A acidificação pode não ser o mecanismo usado para promover a solubilização de P, mesmo com a produção de ácidos orgânicos em diferentes concentrações, neste caso, os ácidos podem estar na forma aniônica e portanto não funcionam como acidificantes, mas sim na quelação do Fe^{+2} (MARRA et al., 2015). De fato a análise do DNA genômico das estirpes UFLA 230 e UFLA 237 do gênero *Gluconacetobacter*, mostraram a presença de inúmeros genes ligados a produção de ácidos orgânicos. Esses resultados são consistentes com outro estudo que utilizando estirpes do gênero *Gluconacetobacter* foi observado em ensaios *in vitro* o incremento de P solúvel no meio juntamente com um aumento da concentração de ácido glucônico (CRESPO; BOIARDI; LUMA, 2011).

Os altos valores observados no ensaio *in vitro* mostram influência da inoculação, pois as estirpes foram relacionadas com o aumento das variáveis o que indica maior disponibilidade de P para as plantas. Isso é particularmente importante para áreas em processo de revegetação pois o P é um elemento crucial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois está relacionado com o crescimento e desenvolvimento das plantas. É fundamental para a fotossíntese, divisão celular, transdução de sinal e a síntese de triptofano de adenosina (ATP), fosfolipídios, ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA) (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003).

Um forma de medir a eficiência fotossintética da planta é quantificando o PSII que mostra a fração da energia luminosa capturada pelo fotossistema II, que é direcionado para a fase fotoquímica gerando ATP e NADPH e finalmente açúcar para a planta crescer (KUHLGERT et al., 2016). Os dados de PSII do presente estudo indicam que no momento da medição deste parâmetro tanto plantas adubadas com fontes de fosfato solúvel, quanto plantas com fosfato insolúvel apresentavam a mesma eficiência quântica fotossintética. O fosfato de ferro possui uma forte energia de ligação entre o ferro e o fósforo (MARRA et al., 2019), demandando assim tempo e mecanismos eficientes de solubilização. Isso explica porque apesar de ambas fontes solúveis e

fontes insolúveis apresentarem a mesma eficiência fotossintética no momento da colheita, foram tão discrepantes em outros parâmetros de crescimento como MSPA e MSR.

Na literatura foi destacada a importância do aumento do P disponível em plantas inoculadas com BSF (RAWAT; SHANKHDHAR; SHANKHDHAR 2022). Neste estudo, as plantas inoculadas com BSF apresentaram incrementos no crescimento da planta, bem como a taxa fotossintética que resulta no acúmulo de massa seca e no desenvolvimento geral da planta. Em outro estudo com plantas de gergelim inoculadas com um biofertilizante contendo BSF foi encontrado máxima eficiência do PSII nas plantas inoculadas, chegando a ser 16% superior ao controle sem inoculação, provocando incrementos da produtividade de até 53% em relação ao controle (KAFI et al. 2022).

Estirpes como UFLA 218 e UFLA 219 do gênero *Burkholderia* se destacaram em variáveis importantes para o desenvolvimento da planta como MSPA e acúmulo de P na parte aérea. O gênero *Burkholderia* é um reconhecido gênero de BPCP com uma alta capacidade de aumentar o P disponível no solo através de mecanismos como a síntese e liberação de ácidos orgânicos ou de enzimas fosfatases (LEITE et al., 2020; ZENG et al., 2017). Costa et al. (2015) avaliando o desempenho de BSFs na cultura do arroz observaram incrementos no acúmulo de P na parte aérea de até 26% com estirpes do gênero *Burkholderia*, além de um acréscimo de 42% na MSPA. Marra et al. (2011) trabalhando com BSFs de diferentes gêneros observaram que apenas a BSP do gênero *Burkholderia* foi capaz de solubilizar FePO_4 em meio líquido GELP.

BSF quando inoculadas na planta podem induzir a resposta imune em plantas hospedeiras, melhorando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de padrões moleculares associados a micróbios e pela atividade da molécula de sinal NADPH oxidase necessária para a simbiose de plantas e microorganismos (ISHIZAWA et al., 2017). Assim plantas inoculadas com BSF e com uma deficiência do P podem provocar um aumento da atividade antioxidante como resposta de defesa para a eliminação de espécies reativas de oxigênio geradas devido à deficiência de nutrientes (RAWAT; SHANKHDHAR; SHANKHDHAR, 2022). E essa é apenas uma das influências das BSF na região da rizosfera onde ocorre uma variedade de complexas condições, sendo necessário para o sucesso da promoção do crescimento das plantas, entre outros fatores, uma boa adaptabilidade ambiental da BSF (KWAK; PARK; SHIN, 2016). O presente estudo utilizou estirpes isoladas da mesma região onde o solo utilizado no experimento foi coletado assim como uma espécie de gramínea muito frequente nesta mesma região. Aliado a isso na composição do

meio de cultura utilizado no teste *in vitro*, havia extrato de solo vindo do mesmo solo citado acima, seguindo as orientações de Marra et al. (2012).

Essa baixa disponibilidade de P na rizosfera provoca um processo de indução do sistema regulatório do fosfato Pho, presente em BSF inclusive nas estirpes UFLA 219, UFLA 237, UFLA 218 e UFLA 230 utilizadas no presente ensaio (Table 3). O regulador de fosfato (Pho) é um mecanismo envolvido na detecção e regulação do fosfato disponível, controlado por um sistema de dois componentes conhecido como *phoR* – *phoB*. Sob condições limitadas por P, *phoB* é ativado por *phoR*, enquanto sob condições de alto P, *phoU* é requerido por *phoB* (OLIVERIO et al., 2020). Juntos *phoR* e *phoB* ativam o sistema de transporte específico de fosfato de alta afinidade *pstSCAB* quando a falta de fosfato é detectado (KAUR; SELVAKUMAR; GANESHAMURTHY, 2016).

Genes *pho* também estão envolvidos na síntese das fosfatase ácidas e alcalinas (FRASER et al., 2015). No genoma das quatro estirpes genes ligados a produção de fosfatase também foram encontrados. O processo de transformação do fósforo orgânico à fósforo inorgânico (PO_4) é essencial pois as plantas absorvem o P na forma dos ortofosfatos ($H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-}) (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003). Este é um processo realizado em dois estágios que inclui a liberação de fosfato orgânico de precipitados e sítios de adsorção. Em seguida o processo de mineralização produz formas inorgânicas pela atividade catalítica específica de enzimas fosfatase (BAGEWADI et al., 2022). Assim ácidos orgânicos e fosfatases auxiliam neste processo do aumento do P disponível no solo o que possibilita a absorção de P pelas plantas com consequente melhoria em seu crescimento e desenvolvimento (RAWAT et al., 2022). No entanto ainda são poucos os estudos que visam elucidar o efeito do regulador Pho na regulação do fosfato solúvel no metabolismo da glicose, tão importante para a produção dos ácidos orgânicos (ZENG et al., 2017).

A detecção de um grande número de genes ligados a produção de ácidos orgânicos encontrados no DNA genômico das quatro estirpes analisadas, comprova os relatados na literatura de que a liberação de ácidos orgânicos é o principal mecanismo de solubilização de fontes insolúveis de fosfato (MAHARANA; DHAL, 2022; KHOURCHI et al., 2022). No entanto um fato curioso aconteceu com as estirpes UFLA 219 e UFLA 218, que apesar de apresentarem um ótimo desempenho no incremento dos parâmetros de crescimento da *Paspalum densum*, não

apresentaram um dos principais genes para a síntese do ácido glucônico, um importante ácido orgânico envolvido no processo de solubilização do fosfato insolúvel (SRIVASTAVA et al., 2019).

Zhao et al. (2022) também constataram a ausência de genes ligados a produção de ácido glucônico em BSP que melhoraram a disponibilidade de P em plantas de milho, porém encontraram genes ligados a produção de outros ácidos orgânicos como ácido cítrico e ácido málico. As estirpes UFLA 219 e UFLA 218 possuem genes ligados a produção de ácido cítrico e ácido málico além de outro importante ácido orgânico, o ácido 2-ketoglucônico que tem por característica ser um ácido muito mais forte que o ácido glucônico (KUMAR et al., 2013). Somado a isso é importante ressaltar a presença de genes ligados a processos secundários na solubilização de fosfato como genes ligados a produção de sideróforos e exopolissacarídeos que também podem contribuir para o processo de conversão de fontes insolúveis em fontes solúveis de fosfato (REIBER et al., 2005; YI; HUANG; GE, 2008) e que tiveram seus genes presentes nas quatro estirpes com o DNA genômico analisado.

5 Conclusão

As estirpes UFLA 219 e UFLA 218 do gênero *Burkholderia* a UFLA 237 do gênero *Gluconacetobacter*, selecionadas para análise do DNA genômico, estabeleceram uma eficiente associação com *Paspalum densusum* evidenciada pelo bom desempenho nas variáveis analisadas no ensaio em solo, com destaque para a estirpe UFLA 219 que também apresentou no ensaio *in vitro* o mais alto valor de teor de fósforo solúvel em meio líquido GELP. As estirpes com o DNA genômico analisado possuem vários genes que desempenham um papel importante na solubilização de fosfato com destaque para uma serie de genes ligados à produção de ácidos orgânicos e também à produção de sideróforos e exopolissacarídeos.

REFERÊNCIAS

ARKIN, A. P. et al. KBase: The United States department of energy systems biology knowledgebase. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566–569, 2018.

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–15, 2008.

BAGEWADI, Z. K. et al. Response Surface Methodology Based Optimization, Partial Purification and Characterization of Alkaline Phosphatase Isolated from *Pseudomonas asiatica* Strain ZKB1 and its Application in Plant Growth Promotion. **Molecular Biotechnology**, v. 64, n. 9, p. 984–1002, 2022.

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.

BATY, F. et al. A toolbox for nonlinear regression in R: The package nlstools. **Journal of Statistical Software**, v. 66, n. 5, p. 1–21, 2015.

CHANG, Y. et al. Influence of revegetation on soil microbial community and its assembly process in the open-pit mining area of the Loess Plateau, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. August, p. 1–14, 2022.

CHAUHAN, A. et al. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 294–304, 2017.

COSTA, E. M. DA et al. Phosphate-solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate. **Ecological Engineering**, v. 83, p. 380–385, 2015.

CRESPO, J. M.; BOIARDI, J. L.; LUNA, M. F. Mineral phosphate solubilization activity of *gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. **Agricultural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 16–22, 2011.

DAI, Z. et al. Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains. **Bioresource Technology**, v. 258, n. January, p. 345–353, 2018.

DELAPORTE-QUINTANA, P. et al. Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition in strawberry plants. **Plant and Soil**, v. 419, n. 1–2, p. 335–347, 2017.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. *Laboratory Manual of General Microbiology: With Especial Reference to the Microorganisms of the Soil*. McGraw-Hill, New York, NY, USA, USA, 1928.

FRASER, T. et al. Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial. **Geoderma**, v. 257–258, p. 115–122, 2015.

GUIMARÃES, C. L.; MILANEZ, B. Mineração, impactos locais e os desafios da diversificação: revisitando Itabira. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 41, p. 215–236, 2017.

HELAL, D. S.; EL-KHAWAS, H.; ELSAYED, T. R. Molecular characterization of endophytic and ectophytic plant growth promoting bacteria isolated from tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) grown in different soil types. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2022.

HILTNER, L; *Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berücksichtigung der Grundungen und Brauche*. **Arb Dtsch Landwirt Ges Berl** 98: 59–78, 1904.

ISHIZAWA, H. et al. Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward plant growth promoting/inhibiting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 667–673, 2017.

JELIHOVSCHI, E.; FARIA, J. C.; ALLAMAN, I. B. ScottKnott: A Package for Performing the Scott-Knott Clustering Algorithm in R. **Trends in Applied and Computational Mathematics**, v. 15, n. 1, p. 3–17, 2014.

KAFI, M. et al. Single and poly capsule sesame (*Sesamum indicum* L.) productivity in response to plant growth-promoting rhizobacteria and foliar application of silicon, potassium, and calcium. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 44, n. 10, p. 1–14, 2022.

KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; GANESHAMURTHY, A. N. Draft genome sequence of phosphate-solubilizing bacterium *Paraburkholderia tropica* strain P-31 isolated from pomegranate (*Punica granatum*) rhizosphere. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. 3–4, 2016.

KHOURCHI, S. et al. Phosphate solubilizing bacteria can significantly contribute to enhance P availability from polyphosphates and their use efficiency in wheat. **Microbiological Research**, v. 262, n. June, p. 127094, 2022.

KUHLGERT, S. et al. MultispeQ Beta: A tool for large-scale plant phenotyping connected to the open photosynQ network. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 10, 2016.

KUMAR, C. et al. 2-Ketogluconic acid secretion by incorporation of *Pseudomonas putida* KT 2440 gluconate dehydrogenase (*gad*) operon in *Enterobacter asburiae* *psi3* improves mineral phosphate solubilization. **Current Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 388–394, 2013.

KWAK, Y.; PARK, G. S.; SHIN, J. H. High quality draft genome sequence of the type strain of *Pseudomonas lutea* OK2T, a phosphate-solubilizing rhizospheric bacterium. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2016.

LEITE, A. D. A. et al. Selected bacterial strains enhance phosphorus availability from biochar-based rock phosphate fertilizer. **Annals of Microbiology**, v. 70, n. 1, 2020.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: adubos e adubação**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981.

MAHARANA, R.; DHAL, N. K. Solubilization of rock phosphate by phosphate solubilizing bacteria isolated from effluent treatment plant sludge of a fertilizer plant. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 4, p. 605–615, 2022.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 5, p. 603–609, 2011.

MARRA, L. M. et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated

from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1, p. 289–307, 2012.

MARRA, L. M. et al. Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 367–375, 2015.

MARRA, L. M. et al. The Amount of Phosphate Solubilization Depends on the Strain, C-Source, Organic Acids and Type of Phosphate. **Geomicrobiology Journal**, v. 36, n. 3, p. 232–242, 2019.

MOREIRA, F. M. DE S.; CARVALHO, T. S. DE; SIQUEIRA, J. O. Effect of fertilizers, lime, and inoculation with rhizobia and mycorrhizal fungi on the growth of four leguminous tree species in a low-fertility soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 8, p. 771–779, 2010.

OLIVERIO, A. M. et al. The Role of Phosphorus Limitation in Shaping Soil Bacterial Communities and Their Metabolic Capabilities. **Ecological and Evolutionary Science**, v. 11, n. 5, 2020.

PARKS, D. H. et al. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from. **Cold Spring Harbor Laboratory Press Method**, v. 1, p. 1–31, 2015.

PAULA, A. F. DE et al. Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, n. July, p. 1–16, 2022.

PINTO, J. V. E. et al. Species of associative N₂-fixing bacteria in phytophysiognomies of the Quadrilátero Ferrífero, MG, **Revista de Recursos Genéticos**, v. 6, n. 1, 2020.

RAWAT, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49–68, 2021.

RAWAT, P. et al. Improvement of phosphorus uptake, phosphorus use efficiency, and grain yield of upland rice (*Oryza sativa* L.) in response to phosphate-solubilizing bacteria blended with phosphorus fertilizer. **Pedosphere**, v. 32, n. 5, p. 752–763, 2022.

RAWAT, P.; SHANKHDHAR, D.; SHANKHDHAR, S. C. Synergistic Impact of Phosphate Solubilizing Bacteria and Phosphorus Rates on Growth, Antioxidative Defense System, and Yield Characteristics of Upland Rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 6, p. 2449–2461, 2022.

REIBER, K. et al. The expression of selected non-ribosomal peptide synthetases in *Aspergillus fumigatus* is controlled by the availability of free iron. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 1, p. 83–91, 2005.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016. URL

RIOS, C. O. et al. Assessment of iron toxicity in tropical grasses with potential for revegetating mined areas. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 5, p. 2167–2173, 2017.

RODRIGUEZ-R, L. M. et al. The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: Taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W282–W288, 2018.

RODRÍGUEZ-SEIJO, A. et al. Limitations for revegetation in lead/zinc minesoils (NW Spain). **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 4, p. 785–793, 2014.

SAICHANA, N. et al. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1260–1271, 2015.

SILVA, A. O. et al. Plant growth-promoting rhizobacterial communities from an area under the influence of iron mining and from the adjacent phytophysionomies which have high genetic diversity. **Land Degradation and Development**, v. 31, n. 16, p. 2237–2254, 2020.

SILVA, J. R. et al. Initial growth of Fabaceae species: Combined effects of topsoil and fertilizer application for mineland revegetation. **Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 246–247, n. July, p. 109–117, 2018.

SIQUEIRA-SILVA, A. I.; RIOS, C. O.; PEREIRA, E. G. Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 78, p. 257–266, 2019.

SRIVASTAVA, A. K. et al. Draft genome sequence of a cold-adapted phosphorous-solubilizing *Pseudomonas koreensis* P2 isolated from Sela Lake, India. **3 Biotech**, v. 9, n. 7, p. 1–8, 2019.

STUMPF, L. et al. Perennial grasses for recovery of the aggregation capacity of a reconstructed soil in a coal mining area in southern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 1, p. 327–335, 2014.

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

TEIXEIRA, S. T.; JOSÉ DE MELO, W.; TOMÉ SILVA, É. Plant nutrients in a degraded soil treated with water treatment sludge and cultivated with grasses and leguminous plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1348–1354, 2007.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 423–447, 2003.

VAZQUEZ, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5–6, p. 460–468, 2000.

VORNHAGEN, J. et al. The *Klebsiella pneumoniae* citrate synthase gene, *gltA*, influences site specific fitness during infection. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 8, p. 1–25, 2019.

WANG, L.; LI, S.; LI, Y. Isolation and sequencing of glycosyltransferase gene and UDP-glucose dehydrogenase gene that are located on a gene cluster involved in a new exopolysaccharide biosynthesis in *Streptomyces*. **DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping**, v. 14, n. 2, p. 141–145, 2003.

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1059–1065, 2008.

ZENG, Q. et al. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 844–855, 2017.

ZHAO, D. et al. Isolation and Genome Sequence of a Novel Phosphate-Solubilizing Rhizobacterium *Bacillus altitudinis* GQYP101 and Its Effects on Rhizosphere Microbial Community Structure and Functional Traits of Corn Seedling. **Current Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 1–12, 2022.

ZHOU, Y.; ZHU, H.; YAO, Q. Contrasting P acquisition strategies of the bacterial communities associated with legume and grass in subtropical orchard soil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 10, n. 3, p. 310–319, 2018.

ZHU, X. et al. Reclamation of waste coal gangue activated by *Stenotrophomonas maltophilia* for mine soil improvement: Solubilizing behavior of bacteria on nutrient elements. **Journal of Environmental Management**, v. 320, n. April, p. 115865, 2022.

Table 1. Origin and characteristics of strains tested in experiments

Strain	Origin		Species identified by 16SrRNA partial sequence	Contents in the soil of origin mg dm ³		Reference
	Region/State	LUS Host Plant		Fe	Mn	
UFLA-214			<i>B. caribensis</i>	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-215			<i>B. caribensis</i>	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-216			<i>Burkholderia</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-217			<i>Burkholderia</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-218			<i>Burkholderia</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-224			<i>G. diazotrophicus</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-225			<i>G. diazotrophicus</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-228			<i>G. diazotrophicus</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-229	Brumadinho-MG	RA	<i>G. diazotrophicus</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-230			<i>G. diazotrophicus</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-232			<i>G. diazotrophicus</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-233			<i>G. diazotrophicus</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-238			<i>G. diazotrophicus</i>	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-241			<i>R. miluonense</i>	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	Pinto et al. (2020)
UFLA-242			<i>Rhizobium</i> sp.	150.8 ^(VH)	104.00 ^(VH)	
UFLA-243			<i>Rhizobium</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-245			<i>Rhizobium</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA-219	Nova Lima-MG	NS	<i>Burkholderia</i> sp.	134.5 ^(VH)	112.29 ^(VH)	
UFLA-221			<i>B. tropica</i>	134.5 ^(VH)	112.29 ^(VH)	
UFLA-220			<i>Burkholderia</i> sp.	446.32 ^(VH)	66.88 ^(VH)	
UFLA-226			<i>G. diazotrophicus</i>	403.7 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA-227			<i>G. diazotrophicus</i>	403.7 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA-234	Nova Lima-MG	IO	<i>G. diazotrophicus</i>	403.7 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA-235			<i>G. diazotrophicus</i>	403.7 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA-236			<i>G. diazotrophicus</i>	403.7 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA-237			<i>G. diazotrophicus</i>	403.7 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-528			<i>Burkholderia</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-530			<i>Burkholderia</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-541			<i>Burkholderia</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-551			<i>Burkholderia</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-553			<i>Burkholderia</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-562			<i>Paenibacillus</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-564			<i>Paenibacillus</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-565			<i>Paenibacillus</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-568			<i>Paenibacillus</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-570			<i>Paenibacillus</i> sp.	150.82 ^(VH)	103.82 ^(VH)	
UFLA 04-691			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-692			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-696			<i>Pseudomonas</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-701	Brumadinho-MG	RA	<i>M. atropurpureum</i>	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-703			<i>Burkholderia</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-714			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	Silva et al.(2020)
UFLA 04-716			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-719			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-720			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-722			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-724			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-729			<i>Pseudomonas</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-731			<i>Pseudomonas</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-732			<i>Paenibacillus</i> sp.	94.89 ^(VH)	94.02 ^(VH)	
UFLA 04-615			<i>Paenibacillus</i> sp.	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-616			<i>Paenibacillus</i> sp.	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-617			<i>Paenibacillus</i> sp.	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-618	Nova Lima-MG	IO	<i>M. atropurpureum</i>	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-621			<i>Bacillus</i> sp.	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-623			<i>Paenibacillus</i> sp.	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-626			<i>Bacillus</i> sp.	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	
UFLA 04-789			<i>Enterobacter</i> sp.	403.72 ^(VH)	88.88 ^(VH)	

LUS: Land use system from which the strain was isolated; RA: Rehabilitated Area revegetated with grass; IO: Ironstone Outcrops; NS: Neotropical Savana; MG: Minas Gerais; VH: very high

Table 2. Chemical properties and interpretation of the soil sample, collected at a depth of 0-20 cm in Itabira-MG

pH	P_{rem}	P_{avail}	K	S	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	
H₂O	-----mg dm ⁻³ -----				-----cmol _c dm ⁻³ -----					
6.4	7.0	1.1	28.2	115.0	0.01	1.1	0.2	0.0	1.6	
H	VL	VL	L	VG	VL	L	L	L		
B	Cu	Fe	Mn	Zn	BS	CEC	V%	O.M.	m	N
-----mg dm ⁻³ -----				-----cmol _c dm ⁻³ -----		-----%-----				
0.07	0.5	79.1	23.2	1.0	1.38	2.98	46.31	1.5	0.0	0.0
VL	L	VH	VH	M	L	L	M	L		

pH in water: 1:2.5 (relation soil:water); P rem- Remaining P; P avail- Available P; BS – Base saturation
O.M.- Organic Matter; BS – Base saturation; CEC – Cation Exchange Capacity at pH 7.0; V%-
Base saturation index; m%- Aluminium saturation index; L: low; VL: very low; M: medium; H: high;
VH: very high

Gene	Encode Protein	Strain			
		UFLA 218	UFLA 219	UFLA 230	UFLA 237
Genus confirmation by 16S rRNA gene identification from genomic sequencing					
		<i>Burkholderia sp.</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	<i>Gluconacetobacter sp.</i>	<i>Gluconacetobacter sp.</i>
<i>phoR</i>	Phosphate regulon sensor protein				
<i>phoB</i>	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein				
<i>phoU</i>	Phosphate-specific transport system accessory protein				
<i>pstA</i>	Phosphate transport system permease protein				
<i>pstB</i>	Phosphate import ATP-binding protein				
<i>pstC</i>	Phosphate transport system permease protein				
<i>pstS</i>	Phosphate-binding protein				
<i>ppx</i>	Exopolyphosphatase				
<i>ppk</i>	Polyphosphate kinase				
<i>pepC</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase				
<i>ugd</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase				
<i>sidE</i>	Non-ribosomal peptide synthase sidE				
<i>phoA</i>	Acid phosphatase				
<i>pqq</i>	Pyrroloquinoline-quinone synthase				
<i>gdh</i>	Glucose dehydrogenase				
<i>gltA</i>	Citrate (Si)-synthase				
<i>l-ldd</i>	L-lactate dehydrogenase				
<i>gadH1</i>	Gluconate 2-dehydrogenase flavoprotein				
<i>gadH2</i>	Gluconate 2-dehydrogenase cytochrome c subunit				
<i>gadH3</i>	Gluconate 2-dehydrogenase subunit 3				
<i>fumA</i>	Fumarate hydratase class I				
<i>fumC</i>	Fumarate hydratase class II				
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase				
<i>aldH</i>	Aldehyde dehydrogenase				

Table 3. Genes found in genomes of selected SFB strains native from soils with high Fe and Mn content

Genomic DNA analysis done with the help of open source software and KBASE data platform (ARKIN et al., 2018); + = have the corresponding gene; - = don't have the corresponding gene

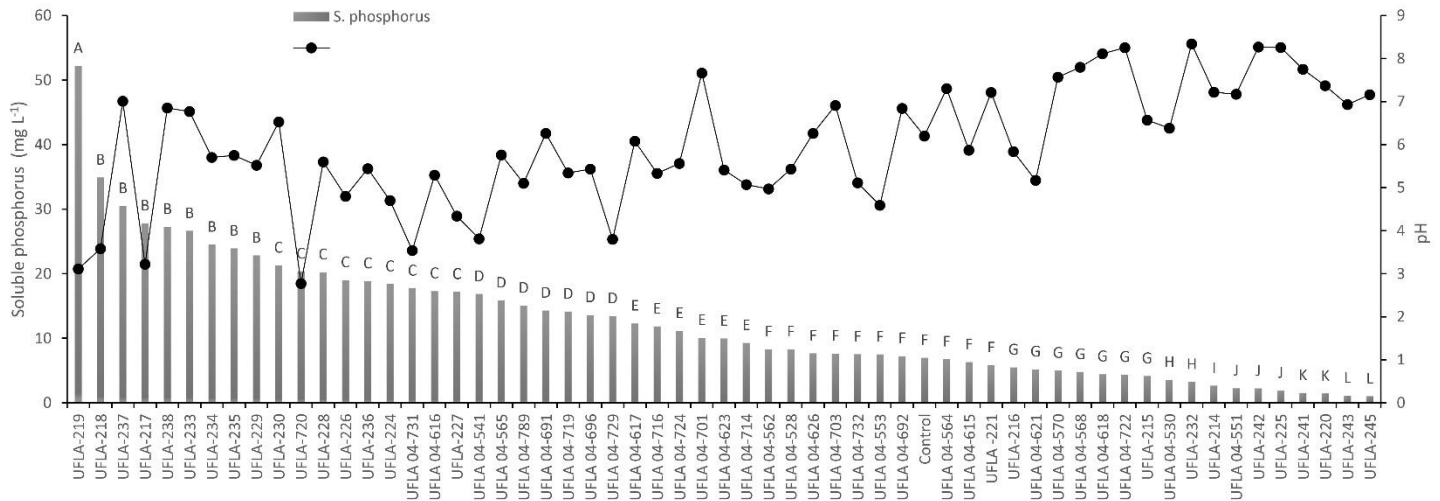


Fig. 1. Soluble phosphorus and pH in liquid medium GELP after 7 days of incubation with bacterial strains in the presence of FePO_4 . Control is without bacterial inoculum. Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Statistical comparisons were made with the transformation $\log(x+1)^{0.001}$ for the variable Soluble phosphorus and $^{0.2}\sqrt{x}$ for the variable pH.

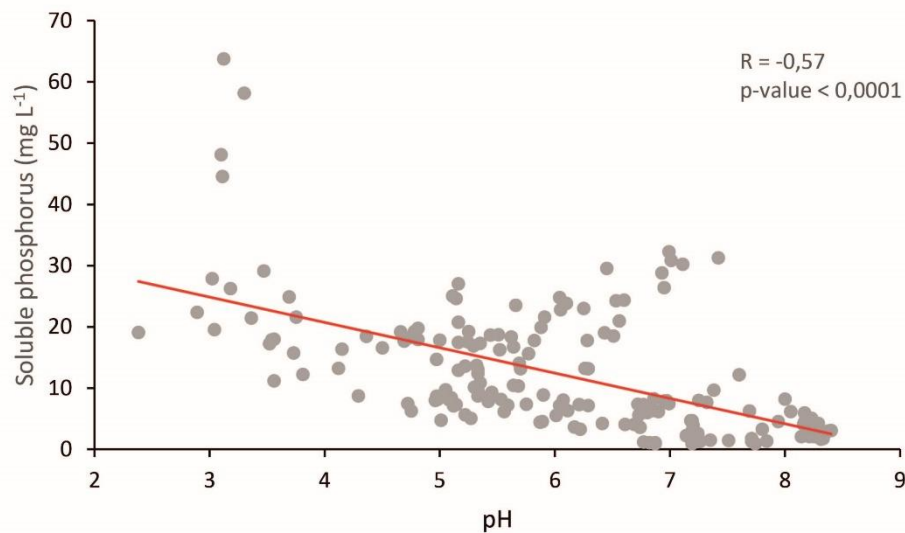


Fig. 2. Pearson's correlation between the pH and the concentration of soluble phosphorus in liquid GELP medium containing FePO_4 after 7 days of bacterial cultivation.

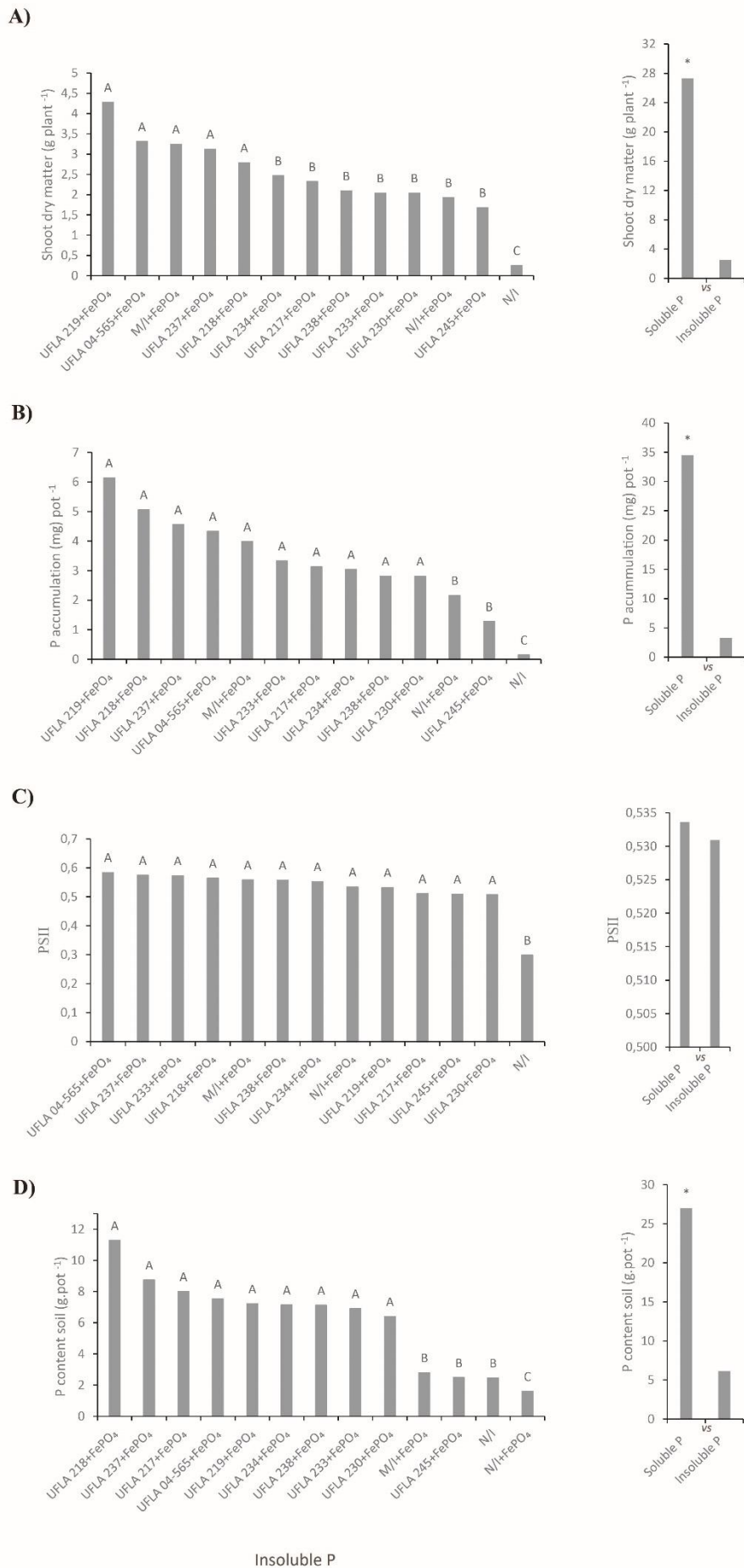


Fig. 3. Bar graphic on the left: Shoot dry matter (A), P accumulation (B), PSII (C) and P content soil (D) in function of the different treatments inoculated with bacterial strains in the presence of FePO₄ or not inoculated with FePO₄ addition (N/I + FePO₄) or not inoculated without FePO₄ addition (N/I), M/I+ FePO₄: Mixed inoculation with bacterial strains in the presence of FePO₄. Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Bar graphic on the right: The contrast of mean values of the Shoot dry matter (A), P accumulation (B), PSII (C) and P content soil (D) in function of the phosphorus source, contrasting all treatments with soluble P versus treatments with insoluble P *: significant contrast by the Scheffé test ($p < 0.05$). Treatments with soluble P are not in the graph on the left. Statistical comparisons were made with the transformation \sqrt{x} for the variable P accumulation, $x^{2.25}$ for the PSII and $\log(\log x + 1)^{0.001}$ for the for the variable P content soil.

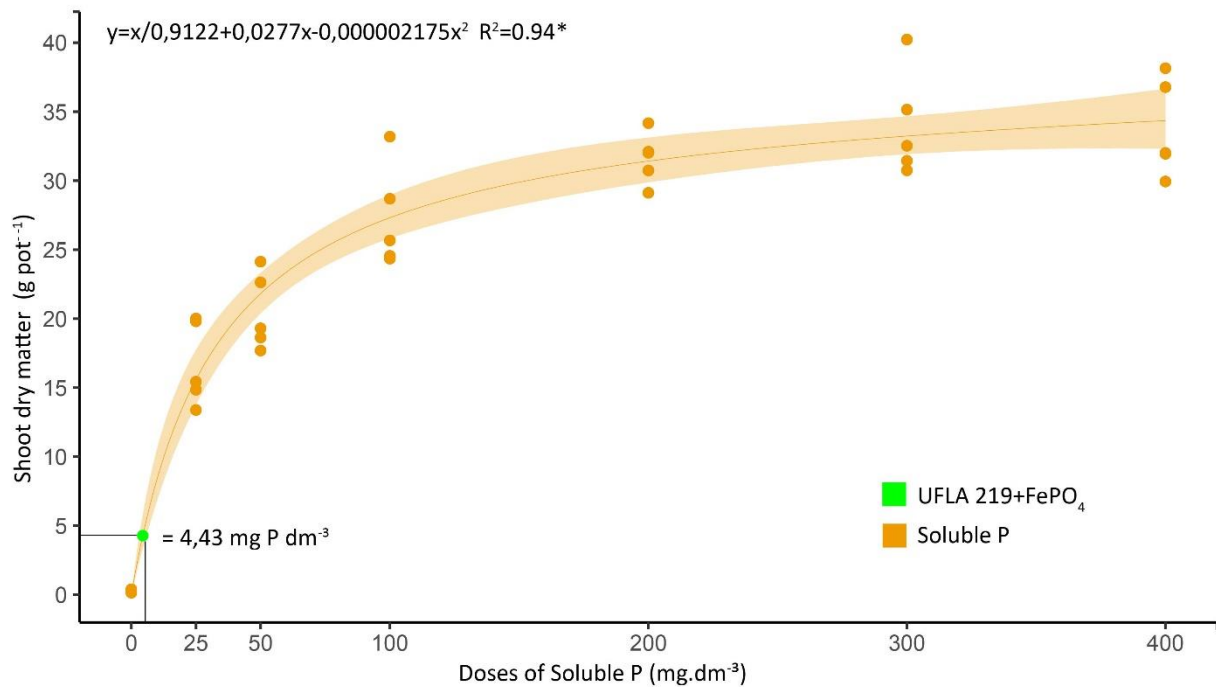


Fig. 4. Shoot dry matter in function of the different doses of soluble P or in function of the inoculation with the strain UFLA 219 + FePO₄. This figure seeks to show how much, in theory, the strain UFLA 219 would have solubilized from FePO₄ taking into account the SDM. This graph also fulfills the role of showing the behavior of the different doses on SDM, being possible to see what was the ideal dose of cultivation for the *Paspalum*. Finally show that the choice of soluble P doses was correct, as it starts growing but reaches a point that stabilizes, showing both deficiency zones and adequate fertilization zones.

Supplementary material

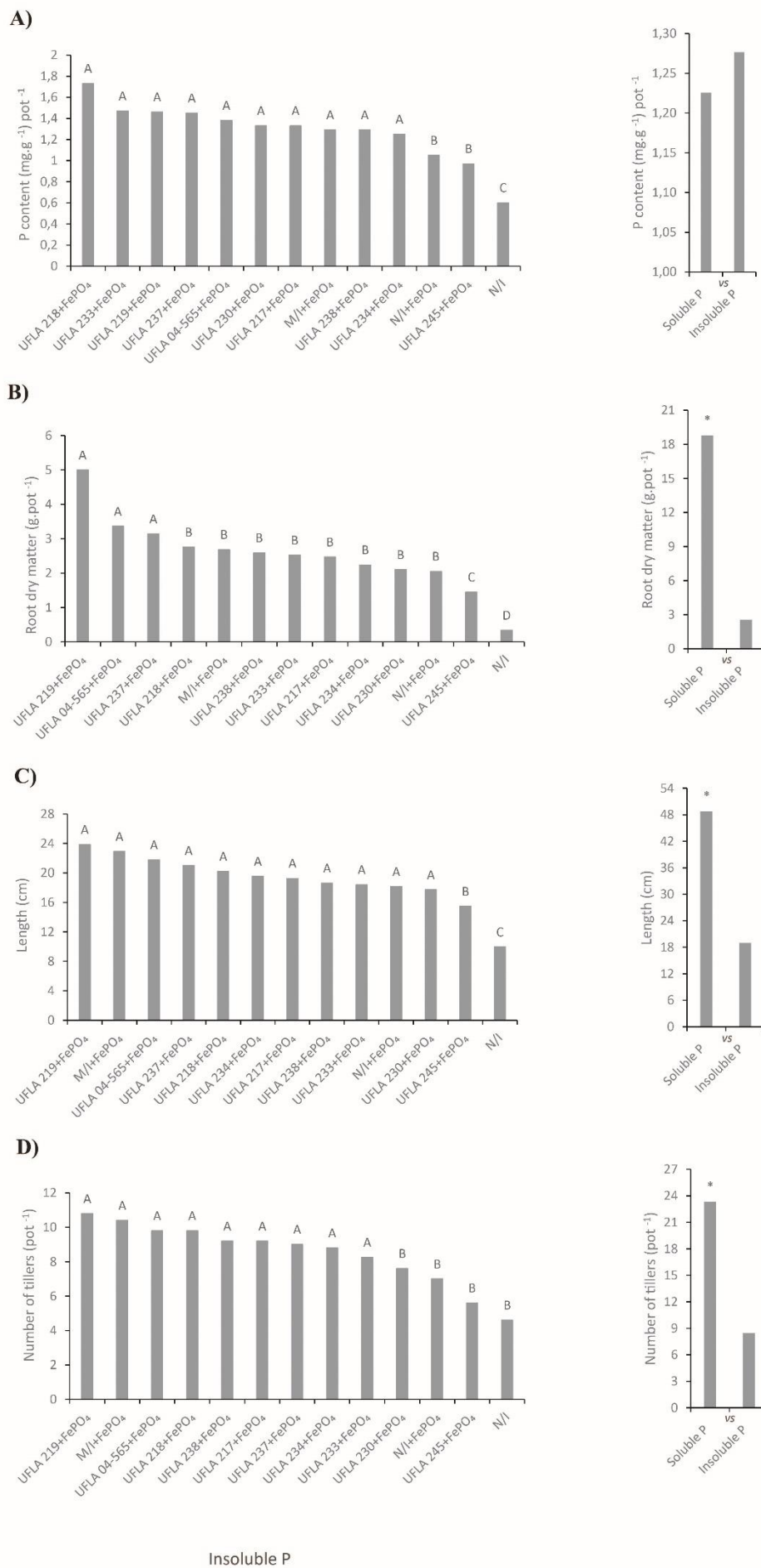


Fig. S1. Bar graphic on the left: P content plant (A), Root dry matter (B), Length (C) Number of tillers (D) in function of the different treatments inoculated with bacterial strains in the presence of FePO_4 or not inoculated with FePO_4 addition (N/I + FePO_4) or not inoculated without FePO_4 addition (N/I), M/I+ FePO_4 : Mixed inoculation with bacterial strains in the presence of FePO_4 . Means followed same letter not significant difference by the Skott-Knott test ($p < 0.05$). Bar graphic on the right: The contrast of mean values of the Shoot dry matter (A), P accumulation (B), PSII (C) and P content soil (D) in function of the phosphorus source, contrasting all treatments with soluble P versus treatments with insoluble P *: significant contrast by the Scheffé test ($p < 0.05$). Treatments with soluble P are not in the graph on the left. Statistical comparisons were made with the transformation $x^{1/1.5}$ for the variable Root dry matter.

Table S1. Information on the analysis of the genomic DNA of selected strains tested in soil with high Fe and Mn contents

Strain	Size	Completeness
UFLA 218	8,364,502	99.95
UFLA 219	8,145,683	99.82
UFLA 230	4,346,754	99.0
UFLA 237	4,432,928	100.0

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As BFNN selecionadas para o ensaio em solo apresentaram alta eficiência simbiótica em simbiose com *Enterolobium contortisiliquum* no ensaio em condições axênicas. No ensaio em solo as estirpes selecionadas para a análise do DNA genômico exibiram alto desempenho na maioria das variáveis analisadas no ensaio em solo com altos teores de Fe e Mn. A análise do DNA genômico mostrou que as estirpes selecionadas possuem uma série de genes associados a tolerância as condições de altos teores de Fe e Mn que influenciam na alta eficiência simbiótica apresentada.

BSF como UFLA 219 e UFLA 218 do gênero *Burkholderia* e a UFLA 237 do gênero *Gluconacetobacter*, também selecionadas para a análise do DNA genômico, mostraram um alto desempenho nos parâmetros de crescimento no ensaio em solo em associação com *Paspalum Densum*. Com destaque para a estirpe UFLA 219 que havia apresentado o melhor desempenho no teste *in vitro* entre as estirpes testadas. A análise do DNA genômico mostrou a presença de uma série de genes importantes para o aumento da eficiência de BSF na solubilização do fosfato com destaque para os genes relacionados a produção de ácidos orgânicos

Assim este trabalho mostrou que tanto genes relacionadas a tolerância a altos níveis de Fe e Mn quanto genes relacionados a mecanismos mais específicos como daqueles responsáveis pela produção de ácidos orgânicos em BSF, são importantes para o sucesso da associação entre BPCPs e espécies vegetais com potencial para a recuperação de áreas degradadas.