



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Utilização de vetiver, vermicomposto, hidrogéis e bioinóculos como estratégia de fitogestão de escombrelras

Por

Nadine Silva Rodrigues

Novembro, 2023



CATÓLICA
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

PORTO

Utilização de vetiver, vermicomposto, hidrogéis e bioinóculos como estratégia de fitogestão de escombreyras

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por

Nadine Silva Rodrigues

Orientação: Doutora Helena Moreira

Co-orientação: Doutora Sofia Pereira; Professora Doutora Paula Castro

Novembro, 2023

Resumo

A extração mineira é uma das principais fontes de contaminação do solo. A sua atividade promove usualmente a acumulação de resíduos provenientes da extração e tratamento de minérios tendo como consequência a formação de escombreliras a céu aberto. Estas representam um elevado risco ambiental, uma vez que podem libertar contaminantes, nomeadamente metais e metalóides, afetando as áreas e populações circundantes. De modo a prevenir a libertação dos contaminantes existentes nos resíduos das escombreliras, é necessária a contenção e gestão adequada destes materiais. A fitogestão é considerada uma estratégia de intervenção ecológica para estas áreas, que combina a fitorremediação com técnicas sustentáveis de gestão. Para isso, utiliza plantas de elevado valor económico, que podem servir como matéria-prima para vários fins, proporcionando retornos financeiros e sociais. Esta estratégia pode também utilizar corretivos e microrganismos (bioinoculantes) para promover o crescimento das plantas utilizadas e melhorar as propriedades físicas e químicas do solo/substrato.

A Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) é uma cultura de elevada biomassa que tolera condições ambientais adversas e tem o potencial de produzir produtos distintos, como forragem e materiais de construção. O crescimento da Vetiver pode ser beneficiado pela aplicação de corretivos e a inoculação com microrganismos benéficos, como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Neste estudo, foi avaliado o uso de corretivos, nomeadamente um vermicomposto e um hidrogel biodegradável comercial (Polyter), e a inoculação de microrganismos para promover o crescimento da Vetiver e a estabilização de metais em escombreliras de uma antiga mina de tungsténio (mina da Borralha, Portugal). Para avaliar os efeitos dos tratamentos, foi realizado um ensaio em estufa durante 180 dias. O bioinóculo consistiu numa mistura de uma BPCV, *Cupriavidus pauculus*, e esporos dos FMAs de *Rhizoglossum irregulare*, *Funneliformis mossae* e *F. caledonium* (Mix). A bactéria utilizada foi previamente isolada da área da escombrelira e caracterizada quanto à capacidade de produzir substâncias promotoras de crescimento vegetal, nomeadamente sideróforos e amónia. O bioinóculo foi previamente misturado com o hidrogel nos tratamentos em que a combinação de ambos foi testada. Após seis meses, foi avaliado o crescimento da Vetiver nestes tratamentos e as propriedades químicas e bioquímicas (enzimas) dos materiais da escombrelira. Os resultados mostraram que a utilização combinada de hidrogel, vermicomposto e os microrganismos (Mix) promoveu um maior crescimento da planta. A disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica aumentou devido à adição do vermicomposto, tendo a sua aplicação permitido também diminuir a biodisponibilidade de vários metais no solo. O tratamento com a Mix contribuiu apenas para a diminuição da concentração de Cu. Este estudo demonstra o potencial do uso da fitogestão com vetiver e corretivos, nomeadamente com o vermicomposto, na estabilização de metais, prevenindo assim a sua disseminação.

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento vegetal; fungos micorrízicos arbusculares; metais; fitogestão.

Abstract

Mining extraction is one of the main sources of soil contamination. Its activity usually promotes the accumulation of waste from the extraction and treatment of ores, forming open-air tailings. These represent a high environmental risk, as they can release contaminants, namely metals and metalloids, affecting surrounding areas and populations. To prevent the release of contaminants in heap waste, adequate containment and management of these materials is necessary. Phytomanagement is considered an ecological intervention strategy for these areas, which combines phytoremediation with sustainable management techniques. For that, it uses plants of high economic value, which can serve as raw materials for various purposes, providing financial and social returns. This strategy can also use correctives and microorganisms (bioinoculants) to promote the growth of the plants used and improve the physical and chemical properties of the soil/substrate.

Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) is a high biomass crop that tolerates adverse environmental conditions and has the potential to produce different products, such as forage and construction materials. Vetiver's growth can be benefited by the application of correctives and inoculation with beneficial microorganisms, such as plant growth-promoting bacteria (PGPB) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). In this study, the use of correctives was evaluated, namely a vermicompost and a commercial biodegradable hydrogel (Polyter), and the inoculation of microorganisms to promote the growth of Vetiver and the stabilization of metals in heaps of an old tungsten mine (Borralha mine, Portugal). To evaluate the effects of the treatments, a greenhouse trial was carried out for 180 days. The bioinoculum consisted of a mixture of a BPCV, *Cupriavidus pauculus*, and spores of AMF from *Rhizoglyphus irregularis*, *Funneliformis mossae*, and *F. caledonium* (Mix). The bacteria used was previously isolated from the heap area and characterized for its ability to produce substances that promote plant growth, namely siderophores and ammonia. The bioinoculum was previously mixed with the hydrogel in treatments where the combination of both was tested. After six months, the growth of Vetiver in these treatments and the chemical and biochemical properties (enzymes) of the waste materials were evaluated. The results showed that the combined use of hydrogel, vermicompost, and microorganisms (Mix) promoted greater plant growth. The availability of nutrients and organic matter increased due to the addition of vermicompost, and its application also reduced the bioavailability of several metals in the soil. Treatment with Mix only contributed to the decrease in Cu concentration. This study demonstrates the potential of using phytomanagement with vetiver and correctives, namely vermicompost, in stabilizing metals, thus preventing their dissemination.

Keywords: Plant-growth promoting bacteria; arbuscular mycorrhizal fungi; metals and metalloids; phytomanagement

Agradecimentos

Quero agradecer, primeiro que tudo, à minha orientadora Doutora Helena Moreira e co-orientadoras Doutora Sofia Pereira e Professora Doutora Paula Castro, por toda a disponibilidade, ajuda, partilha de conhecimento e críticas construtivas que ajudaram a melhorar este trabalho.

Aos meus pais por todo o apoio e paciência.

Às minhas colegas de laboratório sempre muito prestáveis para tudo o que precisei durante a elaboração desta tese.

Índice

Resumo.....	1
Abstract.....	2
Agradecimentos.....	3
I. Lista de Figuras.....	6
III. Lista de Abreviaturas.....	10
1. Introdução.....	14
1.1. Solos contaminados: um problema mundial.....	14
1.2. Metais e metalóides como contaminantes do solo.....	16
1.3. Estado do solo em Portugal.....	17
1.4. Recuperação de solos contaminados - o papel da fitorremediação.....	18
1.5. A integração da fitorremediação na gestão dos solos contaminados - a Fitogestão...	21
1.5.1. Plantas usadas na fitogestão.....	21
1.5.1.1. A Vetiver como planta usada na fitogestão.....	22
1.5.2. Contribuição dos microrganismos para a fitogestão.....	24
1.5.2.1 Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCP).....	24
1.5.2.2. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA).....	25
1.5.3 Uso de corretivos.....	26
1.5.3.1 Vermicomposto.....	27
1.5.3.2. Hidrogéis.....	27
1.6. Mina da Borralha.....	28
1.7. Objetivos.....	29
2. Material e métodos.....	30
2.1. Isolamento de estirpes bacterianas.....	30
2.2. Tolerância das estirpes selecionadas a metais.....	31
2.2.1. Extração DNA das colónias bacterianas selecionadas.....	31
2.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) - 16S.....	32
2.2.3. Caracterização das estirpes isoladas.....	32
2.2.3.1 Solubilização de fósforo.....	32
2.2.3.2. Produção de enzimas extracelulares.....	33
2.2.3.3. Produção de Amónia.....	33
2.2.3.6. Sideróforos.....	34
2.3. Ensaio em estufa.....	34
2.3.1. Recolha e processamento do solo.....	34
2.3.2. Ensaio experimental.....	36

2.3.3. Monitorização da viabilidade das bactérias inoculadas.....	38
2.3.4. Atividade enzimática do solo	38
2.3.4.1. Atividade da fosfatase	38
2.3.4.2. Atividade da desidrogenase	38
2.3.4.3. Atividade da urease	39
2.3.4.4. Hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA).....	39
2.3.5. pH.....	39
2.3.6. Condutividade	40
2.3.7. Respiração do solo.....	40
2.3.7.1. Humidade do solo	41
2.3.8. Extração de metais biodisponíveis no solo (Cu, Zn, Ni, Zn, Fe, Ca, Na)	41
2.4. Análise estatística	42
3. Resultados	43
3.1. Caracterização das estirpes bacterianas selecionadas.....	43
3.2. Tolerância a metais	43
3.3. Produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal pelas estirpes bacterianas	45
3.3.1. Solubilização de fósforo e produção de enzimas extracelulares	45
3.3.2. Produção de NH ₃ , Sideróforos, IAA e ACC.....	47
3.4. Resultados do ensaio experimental em estufa	49
3.4.1. Quantidade de água utilizada.....	49
3.4.2. Alongamento e número de rebentos	50
3.4.3. pH e Condutividade do solo.....	51
3.4.4. Viabilidade da bactéria inoculada no Mix com/sem Hidrogel	52
3.4.5. Atividade enzimática do solo	52
3.4.6. Respiração microbiana	54
3.4.7. Concentração de metais biodisponíveis	54
5. Discussão	58
5.1. Seleção da estirpe a utilizar no ensaio experimental.....	58
5.2.1. Avaliação do desenvolvimento da planta	60
5.2.4. Avaliação da atividade biológica do solo através da análise da respiração do solo	64
5.2.5. Avaliação da biodisponibilidade de metal(óide)s no “solo”	65
5. Conclusão e perspetivas futuras	69
6. Bibliografia.....	70

I. Lista de Figuras

Figura 1. Principais tipos de contaminantes do solo na Europa.	15
Figura 2. Principais fontes de poluição nas várias regiões do mundo	15
Figura 3. Problemas associados à poluição dos solos.....	16
Figura 4. Mapa de Portugal com as minas desativadas e em atividade.....	18
Figura 5. Características e aplicações ambientais e industriais da Vetiver (<i>Chrysopogon zizanioides</i> (L.) Roberty).....	23
Figura 6. Efeitos da inoculação de FMA no desenvolvimento de plantas cultivadas em solos contaminados	26
Figura 7. Mina da Borralha.....	28
Figura 8. Recolha de "solo" da escombreira para execução do ensaio em vaso	35
Figura 9. 1- Hidrogel + Mix; 2- Esporos de fungo adicionado à Mix; 3 – Preparação do solo de cada vaso; 4- Planta no início da experiência.....	37
Figura 10. Representação geral dos 8 tratamentos aplicados ao “solo” da mina da Borralha.	37
Figura 11. Medição do pH das amostras.	40
Figura 12. Medição dos metais biodisponíveis das amostras em ICP-OES (PerlinElmer precisely optima 7000 DV)	41
Figura 13. Crescimento das estirpes em estudo em meios enriquecidos com metais; 1 - meio de cultura TSA enriquecido com cobre (750 ppm); 2 - meio de cultura TSA enriquecido com cádmio (15 ppm).	44
Figura 14. Solubilização de P pela bactéria <i>B. contaminans</i> (Iso 1).	46
Figura 15. Exemplos da produção das enzimas extracelulares.....	47
Figura 16. Exemplos de resultados de produção de NH ₃	48
Figura 17. Exemplos de resultados dos Sideróforos	49
Figura 18. Número de rebentos em cada tratamento no fim do ensaio experimental. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=4). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos (C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) no parâmetro número de rebentos. Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS -	

não significativo $P < 0,05$. Para o número de rebentos os valores da ANOVA unidirecional é $***F(F) = 2,950$, os resultados são apresentados como NS - Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$ 50

Figura 19. Alongamento das plantas em cada tratamento no fim do ensaio experimental. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos(C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) no parâmetro alongamento das plantas. Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significativo $P < 0,05$. Para o número de rebentos os valores da ANOVA unidirecional é $***F(F) = 2,015$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$ 51

Figura 20. Atividade enzimática do solo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos (C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) nos parâmetros estudados (Desidrogenase, Fosfatase, FDA, Urease). Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significante $P < 0,05$. Para a Desidrogenase, Fosfatase, FDA, Urease do solo os valores da ANOVA unidirecional são $***F(F) = 18,642$, $***F(D) = 46,972$, $***F(FDA) = 5,355$, $***F(U) = 30,021$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$ 53

Figura 21. Respiração do solo nos tratamentos testados no ensaio experimental. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos (C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) no parâmetro estudado Respiração do solo. Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significante $P < 0,005$. Para a respiração do solo o valor de ANOVA unidirecional é $***F(R) = 7,922$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$ 54

II. Lista de tabelas

Tabela 1. Exemplos de métodos físicos e químicos usados na remediação de solos.....	19
Tabela 2. Vantagens e desvantagens da fitoremediação.	20
Tabela 3. Lista de plantas economicamente relevantes para uso em fitogestão.	22
Tabela 4. Caracterização físico-química do solo rizosférico recolhido na mina da Borralha.	30
Tabela 5. Análise do “solo” recolhido da escombreira da mina da borralha.	35
Tabela 6. Características das estirpes identificadas.	43
Tabela 7. Tolerância a metais das estirpes selecionadas.	44
Tabela 8. Resultados relativos à solubilização de fósforo e produção de enzimas extracelulares (Lipases, Proteases, Celulases e Pectinases).....	45
Tabela 9. Resultados relativos à Produção de NH ₃ , Sideróforos, IAA e ACC	48
Tabela 10. Média da quantidade de água utilizada para rega durante toda a experiência. ..	49
Tabela 11. Condutividade e pH do solo de todos os tratamentos testados no ensaio experimental.....	51
Tabela 12. UFC/g sobre a viabilidade da bactéria inoculada no ensaio experimental testado durante 20 semanas. As amostras testadas foram: A+B- Bactéria utilizada para a Mix sem hidrogel e com água; H+B1, H+B2, H+B3, H+B4, H+B5, H+B6, H+B7, H+B8- Bactéria utilizada para a Mix com hidrogel, legendada com números do 1 até ao 8, pois foram 8 vasos inoculados com a Mix com hidrogel e as amostras retiradas destes.	51
Tabela 13. Concentração dos metais (Zn, Ni, Fe, Mg, Ca, Cu e Na) nos tratamentos testados no ensaio experimental.	56

III. Lista de Abreviaturas

ACC	Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato
BPCV	Bactérias promotoras de crescimento vegetal
CAS	Cromo-AzuroI-S
C_{CO2}	Respiração do solo
CE	Condutividade elétrica
CMC	Meio carboximetilcelulose
CO₂	Dióxido de carbono
CRU	Composto de Resíduos Urbanos
CTAB	Brometo de Cetrinómio
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EU	União Europeia
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FDA	Diacetato de fluoresceína
FMA	Fungos micorrízicos arbusculares
Fe³⁺	Ferro férrico
IAA	Ácido indole-3-acético
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry
ISP	Índice de solubilização de fósforo
LB	Meio Luria Bertani
MER	Micélio extra radicular
MES	Ácido 2-morfolinoetanossulfónico monohidratado
MIR	Micélio Intra radicular
Mn	Manganésio
MO	Matéria orgânica
MS	Massa seca
NBRIP	National Botanical Institute`s Phosphate growth medium
NH₃	Amónia
NRCS	Serviço de Conservação de Recursos Naturais
PCA	Agar de contagem de placas

RMS	Respiração Microbiana do Solo
TCA	Tricloroacético
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Meio caldo de soja Trypticase
TPF	Trifenil formazan
TTC	Trifeniltetrazolium chloride
UFC	Unidades formadoras de colónias
VC	Vermicomposto

1. Introdução

1.1. Solos contaminados: um problema mundial

O solo é definido como a camada superior da crosta terrestre e é composto essencialmente por matéria mineral (45%), matéria orgânica (5%), água (25%) e ar (25%) (Molina, 2017). É um recurso natural que fornece vários serviços de ecossistema que incluem: i) a produção de matérias-primas, como por exemplo, alimentos, madeira e fibras; ii) armazenamento e ciclagem de nutrientes; iii) armazenamento e filtração de água; iv) conservação da biodiversidade; v) reservatório de carbono; e vi) fornecimento de um ambiente físico e cultural para as atividades humanas (FAO, 2015). Deste modo, a preservação e gestão adequada do solo são fundamentais para garantir a sustentabilidade dos ecossistemas, a segurança alimentar e o bem-estar das comunidades.

Apesar do papel fundamental dos solos no funcionamento dos ecossistemas e na vida humana, a sua degradação é um problema grave e premente a nível mundial (Cordis, 2021). Atualmente, mais de 75% do solo está degradado (IPBES, 2018) e as principais causas dessa degradação são de ordem diversa, e incluem, por exemplo a erosão, a salinização e a diminuição da matéria orgânica e de nutrientes (Abhilash, 2021; FAO & UNEP, 2021). A contaminação do solo é outra das causas da degradação do solo, sendo considerada uma das mais graves. É caracterizada pela presença de substâncias, que não estão habitualmente presentes, ou que ocorrem em maiores concentrações/quantidades, e que podem causar efeitos adversos na saúde humana e/ou no ambiente (Ribeiro, 2013). A maioria dos contaminantes tem origem nas atividades humanas, como a atividade industrial e mineira, agricultura, acumulação de resíduos, acidentes (ex. derramamento de produtos químicos e acidentes em centrais nucleares), bem como em conflitos armados. Os principais grupos de contaminantes que afetam os solos, nomeadamente os solos europeus, são os metais e metalóides, os óleos minerais e os hidrocarbonetos. Existem também outros grupos, como fenóis e cianetos, mas em menor percentagem (Fig. 1). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) tem também destacado como contaminantes os produtos farmacêuticos e os plásticos (FAO & UNEP, 2021).

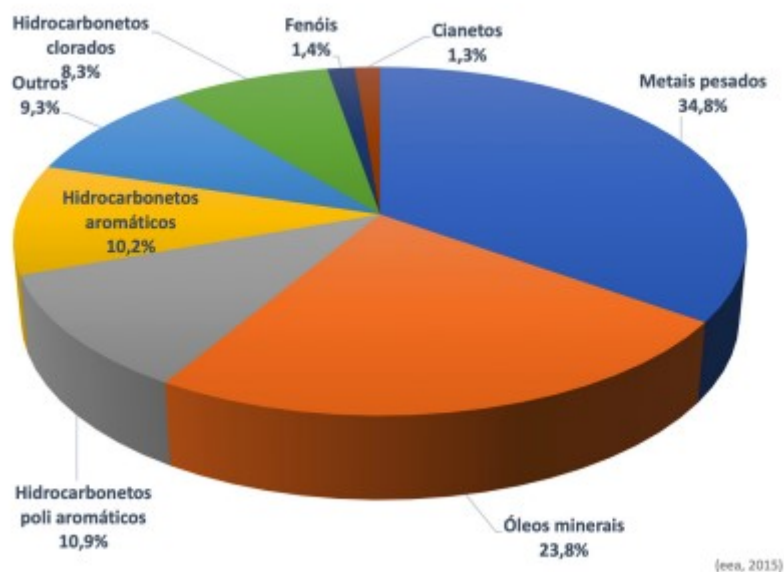


Figura 1. Principais tipos de contaminantes do solo na Europa (in Gomes & Lanceiro, 2019).

Na União Europeia (UE) existem pelo menos 2.8 milhões de locais potencialmente contaminados, sendo que 650 000 destes locais estão registados com atividades poluentes enquanto 5 000 estão em remediação ((Perez & Eugenio, 2018). No entanto, a poluição do solo é um problema à escala mundial, e as fontes de poluição variam de acordo com o continente/zona continental. Por exemplo, na Europa Ocidental e América do Norte predomina a poluição industrial, enquanto na Ásia, América Latina e Europa Oriental, a poluição resulta principalmente das atividades agrícolas. Na África subsariana, a mineração é uma das principais fontes de poluição do solo e no norte de África, a poluição urbana desempenha o papel mais significativo (FAO & UNEP, 2021) (Fig. 2).

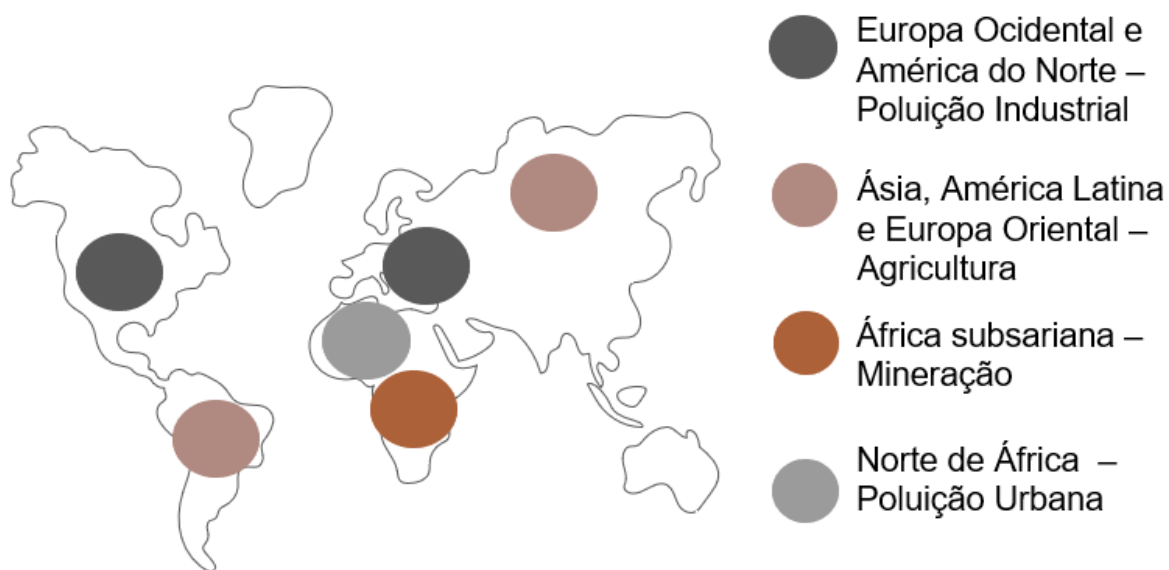


Figura 2. Principais fontes de poluição nas várias regiões do mundo (FAO & UNEP, 2021).

Não sendo dada a devida atenção à contaminação dos solos, e não existindo uma maior exigência política para com a exploração sustentável dos recursos naturais, a degradação do solo continuará a agravar-se. Esta degradação é responsável pela degradação da qualidade ambiental (Fig. 3), comprometendo de forma séria a saúde e segurança alimentar dos seres humanos. Mais de 95% da alimentação depende direta ou indiretamente do solo (FAO, 2021), pelo que a sua contaminação contínua resultará no aumento de doenças e da fome a nível mundial (FAO & UNEP, 2021).

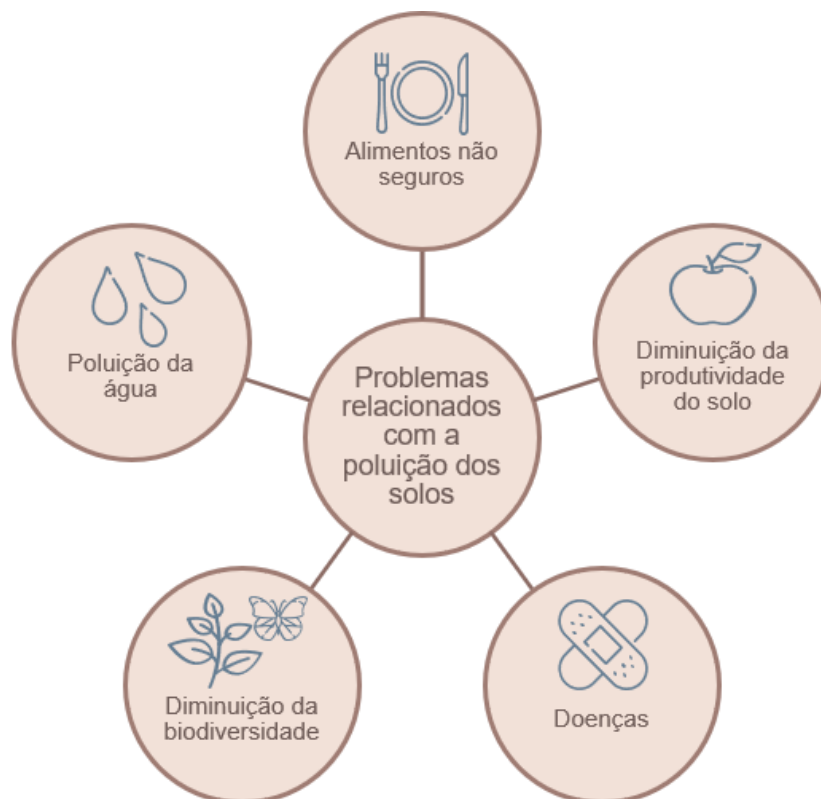


Figura 3. Problemas associados à poluição dos solos (adaptado de FAO & UNEP, 2021).

Existem várias medidas que podem ser implementadas para prevenir, diminuir ou mitigar a contaminação dos solos, nomeadamente: i) a elaboração de políticas de proteção do solo e de reabilitação mais exigentes; ii) o melhoramento da gestão dos resíduos, como por exemplo as lamas de esgoto, os aterros e águas residuais; iii) a monitorização contínua de áreas contaminadas; iv) a realização de avaliações de impacto ambiental para determinados projetos públicos ou privados, como por exemplo, a construção de fabricas; e v) a implementação de uma estrutura de resposta rápida a incidentes de contaminação do solo, para evitar o seu alastramento (Comissão Europeia, 2002; FAO & UNEP, 2021).

1.2. Metais e metalóides como contaminantes do solo

Os metais são um grupo de elementos químicos sólidos no seu estado puro (com exceção do mercúrio, que é líquido), caracterizados pelo seu brilho, dureza, boa condutividade elétrica e térmica, e por elevados pontos de fusão e ebulição (Andrade et al., 2009). Os metalóides são outro grupo de

elementos químicos que apresenta propriedades intermédias entre os metais e os não metais, isto é, apresentam brilho, mas não tão forte quanto o dos metais, e são semicondutores elétricos (Estrela et al., 2018).

No grupo dos metais os principais elementos contaminantes são o cobre, chumbo, cádmio, níquel, mercúrio, crómio, zinco, cobalto, urânio, tálio, vanádio, berílio, prata; enquanto no grupo dos metalóides temos, por exemplo, o arsénio e o antimónio (Caralinda, 2022). Estes elementos são tóxicos para os seres humanos e animais, mesmo em baixas concentrações, danificando as estruturas celulares, tecidos e órgãos, e interferindo com o metabolismo através de, por exemplo, da inibição da atividade enzimática. Causam ainda anemia, cansaço, distúrbios no sistema nervoso central e cardiovascular. Alguns metal(óide)s, como o cádmio, arsénio e sulfuretos e óxidos de níquel são também cancerígenos (Caralinda, 2022).

Em determinadas concentrações, os metal(óide)s são também tóxicos para as plantas, podendo ser absorvidos pelas suas raízes e afetar negativamente o seu crescimento. Estes elementos interferem também na sua atividade enzimática, desequilibrando o metabolismo e causando danos oxidativos (Ojuederie et al., 2017).

A presença de metal(óide)s no solo pode também afetar os microrganismos, que desempenham um papel crucial, por exemplo, na ciclagem de nutrientes e na decomposição da matéria orgânica. A toxicidade dos metal(óide)s pode alterar a composição das comunidades microbianas bem como a sua atividade, comprometendo assim a funcionalidade e a fertilidade do solo (Xie et al., 2016). As atividades antrópicas são as que mais contribuem para a contaminação dos solos por estes elementos, destacando-se a atividade mineira, fundição de metais, indústria metalúrgica, aplicação de fertilizantes, pesticidas, herbicidas, queima de combustíveis fósseis, eliminação de resíduos, conservantes de madeira, fabrico de baterias, refinaria, aterros e incineração de resíduos (Ribeiro, 2013).

1.3. Estado do solo em Portugal

Estima-se que em Portugal existam mais de 2000 locais contaminados, embora não haja registos oficiais. Os casos vão-se revelando na sequência de obras que envolvem remoção de solos, cujo destino é muitas vezes incerto (Gomes & Lanceiro, 2019). As autoridades portuguesas já identificaram em Portugal alguns “pontos negros” de contaminação de solos resultante de poluição acumulada ao longo do tempo, na grande maioria dos casos com origem em atividades extrativas (exploração mineira), industriais e urbanas, que entraram em declínio, ou foram abandonadas. É de destacar o passivo industrial existente na cintura de Lisboa Norte; a zona industrial do Seixal e de Estarreja; as antigas lixeiras de resíduos sólidos urbanos; os depósitos de antigas atividades industriais; e as minas abandonadas em vários pontos do país (Fig. 4).

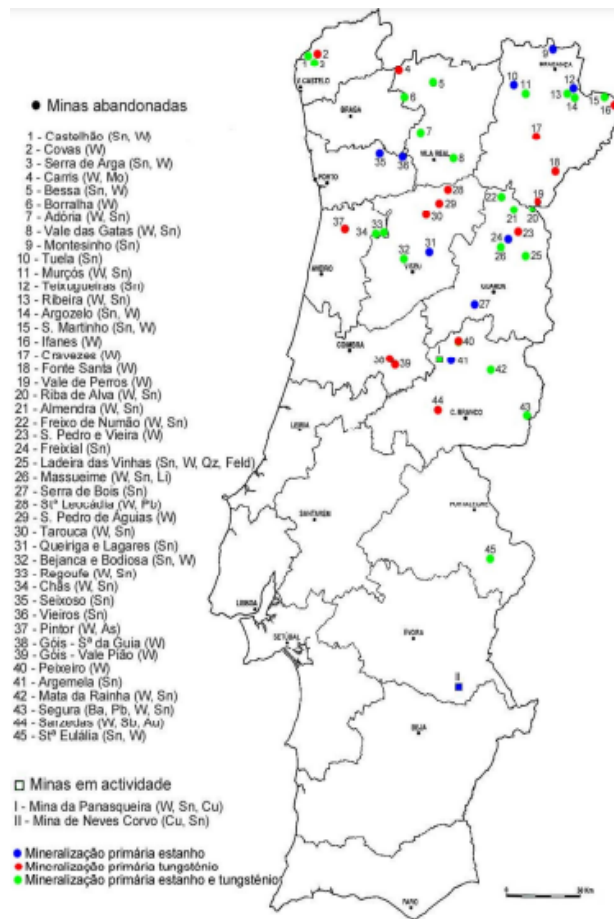


Figura 4. Mapa de Portugal com as minas desativadas e em atividade (in Ribeiro, 2010).

A primeira grande ação de descontaminação do solo e de remediação ambiental no nosso país ocorreu em 1994, na área de intervenção da EXPO 98. Perante o vazio legislativo que na altura se verificava, foi necessário recorrer às normas canadianas (critérios de Ontário) de descontaminação de solos de modo a garantir a recuperação ambiental de toda a zona (Gomes & Lanceiro, 2019). Portugal é um dos poucos países da União Europeia ainda sem legislação específica sobre solos contaminados. A lei para a Prevenção da Contaminação e Remediação dos Solos – ProSolos esteve em consulta pública em 2015 e até hoje ainda não foi aprovada (Lei ProSolos, 2023).

1.4. Recuperação de solos contaminados - o papel da fitorremediação

A fitorremediação é um conjunto de técnicas que utilizam plantas e microrganismos para recuperar solos contaminados com metal(óide)s e/ou poluentes orgânicos (Latif et al., 2023; Moreira et al., 2021a). Através da seleção das plantas adequadas e a aplicação de microrganismos selecionados, é possível extrair, degradar, imobilizar ou transformar contaminantes, contribuindo assim para a recuperação de áreas degradadas. A fitorremediação preconiza também a aplicação de adubos/corretivos e o uso de diferentes padrões de cultivo (ex. rotação ou consociação de culturas), enriquecendo os solos em nutrientes, e melhorando a sua capacidade de retenção de água. Deste modo, a fitorremediação pode favorecer uma série de melhorias ambientais tais como: o aumento da

biodiversidade, a sequestração de carbono, a prevenção da erosão, a atenuação da difusão de poluentes por dispersão eólica ou por lixiviação para os lençóis freáticos e cursos de água (Bernardino et al., 2018).

A fitoremediação é uma alternativa sustentável aos vários métodos convencionais de remediação, nos quais os processos podem ser físicos ou químicos (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de métodos físicos e químicos usados na remediação de solos.

Técnicas	Descrição
Escavação e substituição do solo	Consiste em escavar o local, transportar o solo para centros de tratamento e/ou aterros (dependendo do grau de contaminação). A substituição do solo contaminado é feita por outro solo não contaminado ou pelo mesmo solo já tratado.
Vitrificação	Na vitrificação, o solo é levado a temperaturas suficientemente altas (>1700 °C) na presença de aditivos (borossilicatos e cal), de forma a fundir o solo e transformá-lo num material semelhante ao vidro. As temperaturas altas destroem outros contaminantes que eventualmente estejam presentes e os compostos inorgânicos que não são destruídos pelo calor são incorporados na matriz vítrea.
Eletrocínética	Esta técnica baseia-se na aplicação de correntes elétricas de baixa densidade entre eletrodos colocados no solo. O campo elétrico acionado induz vários processos físico-químicos, provocando o transporte dos contaminantes para os eletrodos, de onde são retirados e tratados.
Incineração	Os resíduos perigosos podem ser destruídos/volatilizados a temperaturas muito altas - até 1200°C – onde ocorre a quebra das ligações químicas dos compostos.
Lavagem do solo	Nesta técnica utiliza-se água/solução aquosa injetada a partir da superfície para dissolver e transportar para a zona saturada os contaminantes do solo existentes na zona de infiltração. As soluções de lixiviação resultantes são recuperadas por bombagem da água subterrânea do aquífero por intermédio de bombas localizadas a jusante do local em reabilitação. É uma técnica especialmente utilizada na remoção de compostos inorgânicos incluindo os elementos radioativos, podendo também ser utilizada na remediação de solos contaminados por metais.
Imobilização química	Baseia-se na introdução de produtos químicos no solo com o objetivo de provocar a diminuição da mobilidade de contaminantes. Este método revela-se especialmente eficaz em metais pesados.

adaptado de Agante, 2021; Azevedo, 2013; Ferreira, 2023; Ribeiro, 2013.

Apesar de apresentar algumas desvantagens, a fitorremediação possui diversas vantagens em relação aos métodos convencionais de remediação que garantem a sua sustentabilidade e eficiência (Tab. 2).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da fitorremediação.

Vantagens	Desvantagens
Pouco invasiva	O tempo de crescimento das plantas pode ser elevado
Fácil manutenção	Necessidade da concentração do contaminante estar em intervalos de toxicidade que não ultrapassem os limites de tolerância da planta
Fácil instalação e baixo custo de manutenção	O risco do contaminante entrar na cadeia alimentar através da ingestão das plantas utilizadas por parte de outros seres vivos
Usa a energia solar	Não reduz 100% a concentração do contaminante
Estabelece uma extensa cobertura vegetal impedindo a dispersão de partículas de solo contaminadas pela erosão eólica e/ou hídrica	Está limitada a profundidades atingidas pelas raízes e ao crescimento natural das plantas;
Pode ser aplicada em grande escala	Tem limitações associadas a qualquer prática agrícola (como a dependência do clima, abastecimento de água, surtos de pragas ou doenças, etc).

adaptado de Costa et al., 2015; Méjia et al., 2014; ; Petersen et al., 2023; Ribeiro, 2013; Rocha & Moura, 2015.

As plantas selecionadas para os projetos de fitorremediação podem atuar através de várias formas para diminuir a concentração do(s) contaminante(s) ou promoverem a sua estabilização nos solos:

- **Fitoextração:** absorção dos contaminantes pelas raízes e sua translocação/acumulação na parte aérea das plantas. Esta técnica pode ser utilizada para metal(óide)s (Ribeiro, 2013).
- **Fitodegradação:** capacidade das plantas em metabolizar os contaminantes em produtos menos tóxicos para a planta e o ambiente. A fitodegradação é utilizada, principalmente, na remediação de compostos orgânicos. Os subprodutos gerados são armazenados em vacúolos ou incorporados no tecido vegetal (Silva et al., 2019).
- **Fitoestabilização:** redução da biodisponibilidade dos contaminantes e da sua transferência para outros compartimentos ambientais. A absorção dos contaminantes e a sua acumulação nas raízes, assim como a sua adsorção, precipitação e acumulação na rizosfera (em colaboração com microrganismos associados às raízes das plantas) permitem a imobilização dos contaminantes (Moreira et al., 2021b).

- **Fitovolatilização:** transformação dos poluentes orgânicos em compostos voláteis. A planta remove o contaminante do solo e consegue transformá-lo num composto volátil, libertando-o para a atmosfera (Moreira et al., 2021b).
- **Rizofiltração:** utilização de plantas para absorver e/ou adsorver nas suas raízes os contaminantes presentes na água, sedimentos ou resíduos (Moreira et al., 2021b).
- **Rizodegradação:** Degradação de contaminantes orgânicos pela comunidade microbiana associada à rizosfera da espécie vegetal (Mello, 2020).

Cada uma destas técnicas possui características específicas que limitam ou potencializam a sua utilização dependendo das características do local que se deseja remediar e o contaminante específico presente na área. Estas técnicas não são exclusivas entre si, e podem ocorrer em simultâneo, aumentando a eficácia da fitorremediação (Méjia et al., 2014).

1.5. A integração da fitorremediação na gestão dos solos contaminados - a Fitogestão

A fitogestão é uma estratégia de recuperação e gestão de solos contaminados que integra as técnicas de fitorremediação, mas que pretende, para além da recuperação das funções ecológicas do solo, proporcionar receitas económicas. Estes dividendos económicos podem vir através, por exemplo, da produção de culturas não alimentares para tecnologias de processamento de biomassa (setor de biocombustíveis e bioenergia, produtos químicos de origem biológica, etc.) (Evangelou et al., 2015; Moreira et al., 2021a).

Existem vários fatores a ter em consideração na fitogestão de solos contaminados, nomeadamente i) a seleção da(s) planta(s) utilizadas e técnicas de cultivo, ii) o tipo, concentração, biodisponibilidade e localização dos contaminantes do solo, iii) disponibilidade de água, iv) condições climáticas e a v) exposição a pragas. Para além disso é necessário analisar a viabilidade económica, exigências legais e aprovação social (Moreira et al., 2021a).

1.5.1. Plantas usadas na fitogestão

As plantas selecionadas para a fitogestão devem ter um elevado grau de adaptabilidade ecológica, tolerância aos metal(óide)s, capacidade de remover/acumular/degradar os contaminantes e de fornecer outros benefícios ambientais, como o sequestro de carbono e a promoção da biodiversidade microbiana. Para além disso, o seu valor económico também deve ser tido em conta, uma vez que a fitogestão deve providenciar dividendos económicos. Por exemplo, plantas com elevada biomassa podem ser utilizadas para produção de bioenergia, ou podem ser matéria-prima para a vários tipos de aplicações industriais (Poria et al., 2022). O ciclo de vida das plantas também é um fator importante, uma vez que as plantas anuais podem acarretar custos de manutenção como a irrigação, ou requerer rotações ou outros padrões de cultivo para manter a fertilidade do solo ou reduzir a presença de pragas. Por outro lado, as plantas perenes podem trazer mais vantagens para a remediação, pois tendem a ter raízes mais profundas, o que contribui para a estabilidade do solo,

produzem maior biomassa, concedendo o benefício adicional de sequestrar mais carbono. Na Tabela 3, encontram-se descritas algumas das plantas usadas em fitogestão com valor económico.

Tabela 3. Lista de plantas economicamente relevantes para uso em fitogestão.

Planta	Família	Ciclo de vida	Tolerância/Acumulação de contaminantes	Potenciais Aplicações/Produtos
<i>Arundo donax</i> (Cana-do-reino)	Poaceae	Perene	Pb, Zn, Cu, Cr, Cd, Ni, As e Hg	Bioenergia, Fibras, Biopolímeros, papel e celulose, carvão ativado
<i>Helianthus petiolaris</i> (girassol-da-pradaria)	Asteraceae	Anual	Pb and Zn	Bioenergia
<i>Gossypium hirsutum</i> (Algodão)	Malvaceae	Anual	Cd	Bioenergia
<i>Ricinus communis</i> L. (Rícino)	Euphorbiaceae	Perene	Cd, Pb, Zn, Cu, Ni, As, Co e Mn	Bioenergia, Biocombustíveis, óleo (com aplicações médicas e industriais), fertilizantes
<i>Agrostis capillaris</i> (Agrostis-comum)	Poaceae	Perene	Pb, As, Fe, Zn, Cu	Forragem para animais
<i>Urtica dioica</i> (Urtiga)	Urticaceae	Perene	Cr, Cu, Pb, Ni, Zn, Cd, Fe	Fibras para têxteis
<i>Linum usitatissimum</i> (Linho/linhaça)	Linaceae	Perene	Cu	Bioenergia

Adaptado de Moreira et al., 2021; Poria et al., 2022.

1.5.1.1. A Vetiver como planta usada na fitogestão

A vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) é uma planta gramínea perene (Fig. 6). Tem origem asiática e é utilizada por povos deste continente há mais de dez mil anos (Redondo & Santos, 2013). Esta planta tem um sistema radicular com 3-4 m de profundidade no primeiro ano de crescimento, tornando-a eficaz para a estabilização de solos, controlo da erosão e filtração de água.

A vetiver pode ser encontrada por todo o mundo devido à sua elevada adaptabilidade a uma ampla gama de temperaturas (-14 °C a +55 °C), baixos requisitos de nutrientes e tolerância a condições extremas do solo, como pH (3,3-12,5), salinidade (sobrevive a uma condutividade elétrica até 47,5 dS m⁻¹) e elevadas concentrações de metal(óide)s.

VETIVER GRASS

Chrysopogon zizanioides

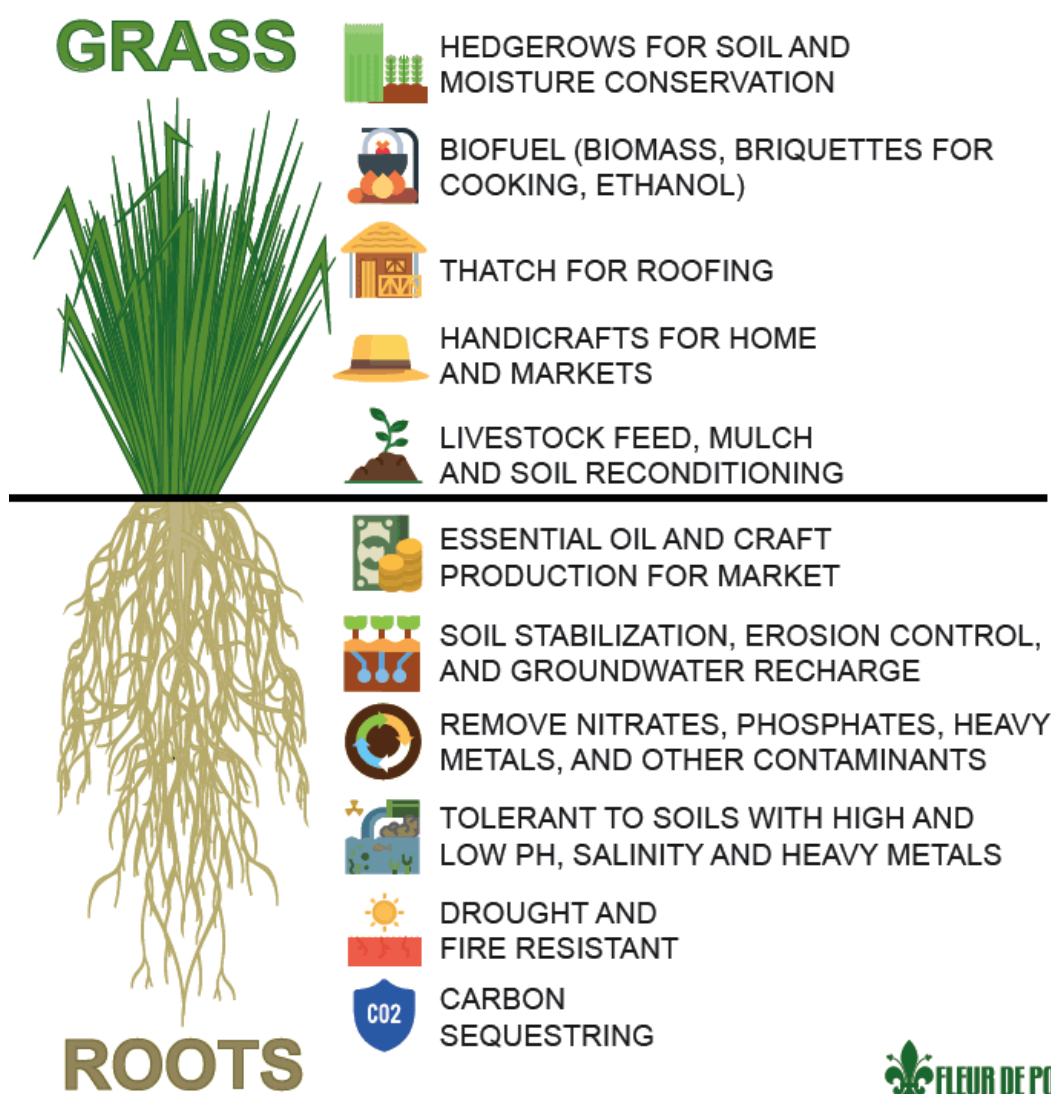


Figura 5. Características e aplicações ambientais e industriais da Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) (in The Vetiver Network International, 2022).

A vetiver produz um óleo essencial nas suas raízes chamado Khus, que pode ser utilizado em práticas medicinais, cosméticos e aditivo alimentar. Este óleo também tem propriedades biocidas, protegendo outras culturas de fungos prejudiciais. As suas folhas podem ser utilizadas como forragem para animais, cobertura de telhados e vários tipos de artesanato. A sua biomassa pode ser

utilizada para produção de biocombustíveis. Estima-se que a combustão de duas toneladas de vetiver seca seja semelhante a uma tonelada de carvão, o que é um rendimento atrativo, uma vez que a produção de vetiver é mais barata e sem prejuízos para o ambiente quando comparada com a extração e transformação do carvão (Moreira et al., 2021a). Desta forma, aliando as características fisiológicas e morfológicas do vetiver com a rentabilidade da sua biomassa e produtos derivados, fazem desta planta um excelente candidato para a fitogestão de locais contaminados com metais.

1.5.2. Contribuição dos microrganismos para a fitogestão

As plantas tendem a crescer mais lentamente e a ter menor biomassa em solos contaminados podendo limitar a sua eficiência na sua remediação/recuperação. Existem vários tipos de microrganismos, como as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que podem conferir uma maior tolerância da planta aos contaminantes e potenciar o seu crescimento através de diferentes mecanismos (Jebara et al., 2017).

1.5.2.1 Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)

As bactérias são os microrganismos mais comuns no solo (95%) (Glick, 2012). Tanto o número, como o tipo de bactérias aí encontrados são influenciados pelas condições físico-químicas, como a temperatura, humidade, presença de sais e outros elementos químicos. Também a densidade e tipos de plantas podem condicionar as populações bacterianas do solo (Glick, 2012). A maior concentração de bactérias é encontrada na rizosfera, ou seja, a zona imediatamente contígua às raízes onde há produção de compostos químicos (exsudados) que influenciam no crescimento da microbiota do solo. Este é o local onde ocorre as maiores interações entre os microrganismos e as plantas (Gomides, 2022). As bactérias que podem promover o crescimento das plantas são denominadas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Estas podem ser de vida livre ou terem de estabelecer relações simbióticas com as plantas, as BPCV podem promover diretamente o crescimento das plantas, facilitando a aquisição de nutrientes ou modulando os níveis hormonais das plantas, ou indiretamente, diminuindo os efeitos inibitórios de vários agentes patogénicos (Glick, 2012).

Os mecanismos mais estudados para a promoção do crescimento incluem:

- **Fixação de azoto:** o azoto é um macronutriente essencial a todas as formas de vida. Nas plantas é fundamental para diversos processos fisiológicos, como a fotossíntese, respiração e diferenciação celular. Para além disso, é um constituinte essencial de macromoléculas, como enzimas, proteínas e clorofila. Existem bactérias que conseguem fixar o azoto atmosférico (ex.: *Rhizobium* spp. e *Frankia* spp.) e fornecê-lo às plantas (Glick, 2012).
- **Solubilização do fósforo:** A quantidade de fósforo no solo é normalmente elevada, mas a maior parte deste fósforo é insolúvel, não estando disponível para suportar o crescimento das plantas, sendo que este elemento é essencial para o crescimento das plantas (fundamental para armazenar energia; na atividade das enzimas relacionadas à respiração e influência no processo de fotossíntese) (Paula, 2018). Assim, a solubilização e mineralização do fósforo é uma característica importante das BPCV (Glick, 2012).

- **Produção de Sideróforos:** os sideróforos são quelantes de ferro com forte afinidade por ferro férrico (Fe^{3+}) e afinidade variável por outros metais. Desta forma, podem aumentar a sua biodisponibilidade tanto para as bactérias como para a planta. Podem também aumentar a solubilidade de alguns metais insolúveis em água através da secreção de protões ou aniões orgânicos (Ilan et al., 2020). Os sideróforos podem impedir que alguns patogénicos das plantas adquiram uma quantidade suficiente de ferro, limitando assim a sua capacidade de proliferação, devido à sua afinidade muito maior pelo ferro do que os agentes patogénicos fúngicos (Glick, 2012).
- **Síntese de fitohormonas:** Embora as plantas possuam a capacidade de produzir diversas fitohormonas como as giberelinas, as citocininas, o ácido abscísico, o etileno e auxinas, e todas tenham sido descritas na literatura, a auxina ácido indole-3-acético (IAA) é de longe a mais comum e a auxina mais estudada. O IAA afeta a divisão, extensão e diferenciação de células vegetais; estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta a taxa de desenvolvimento de raízes; controla os processos de crescimento vegetativo; afeta a fotossíntese; a biossíntese de vários metabolitos e a resistência a condições stressantes (Glick, 2012). Existem BPCV capazes de sintetizar IAA em associação com plantas, o que faz com que a inoculação com essas bactérias aumente a superfície de absorção das raízes, resultando em maior volume de substrato do solo explorado (Paula, 2018).
- **Síntese de Enzimas Líticas:** Algumas bactérias produzem enzimas, incluindo celulasas, proteases e lipases que podem ajudar na desintegração de partes das paredes celulares de muitos fungos patogénicos (Glick, 2012).
- **Síntese da enzima ACC deaminase:** O etileno é a principal hormona relacionada com o crescimento e senescência vegetal, mas que em grandes quantidades se torna prejudicial para a planta. (Dias & Santos, 2022). As plantas respondem tipicamente ao stress (ex, presença de patogénicos, contaminação) sintetizando etileno, o que agrava os efeitos do stress na planta (Glick, 2012). Algumas bactérias têm a capacidade de sintetizar a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, que tem como principal função regular os níveis de etileno nas plantas. O ACC é o principal precursor do etileno; a enzima ACC deaminase degrada o ACC e transforma-o em α -cetobutirato e amónia (Nascimento, 2018). Desta forma, as BPCV podem auxiliar as plantas de forma a diminuir a produção de etileno, ou seja, diminuir o stress das plantas (Glick, 2012).

1.5.2.2. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Os FMA são fungos presentes no solo e que formam associações simbióticas com a maioria das plantas (80%). A associação simbiótica dos FMA com as plantas é um exemplo clássico de relação mutualista, que pode regular o seu crescimento e desenvolvimento (Begum et al., 2019). Estes fungos formam estruturas especializadas nas células corticais das raízes, denominadas arbuscúlos, vesículas e hifas, constituindo o micélio Intra-radicular (MIR). Por outro lado, a rede externa de hifas, também chamada de micélio extra-radicular (MER) é responsável pela translocação de nutrientes e água para as raízes (Moreira et al., 2021a).

As plantas com FMA mostram uma absorção mais eficiente de nutrientes e água, têm atividades enzimáticas mais elevadas e estão mais protegidas contra patógenos fúngicos (Ahanger et al, 2014; Begum et al., 2019) (Figura 6).

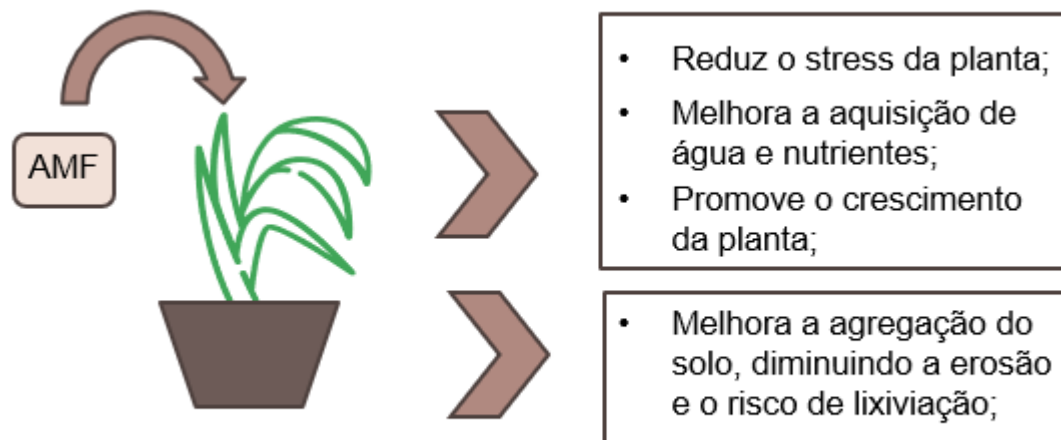


Figura 6. Efeitos da inoculação de FMA no desenvolvimento de plantas cultivadas em solos contaminados (Moreira et al, 2021a).

Os FMA podem simultaneamente ajudar as plantas hospedeiras na regulação dos mecanismos de tolerância e impedir a desregulação das vias metabólicas, quando estas estão em stress (Begum et al., 2019). Os FMA que se encontram presentes nos solos contaminados com metal(óide)s podem ser incluídos em estratégias de fitorremediação, uma vez que apoiam o estabelecimento e crescimento das plantas (Begum et al., 2019; Khan, 2005). Alguns mecanismos que são utilizados pelos FMA para mitigar os efeitos negativos causadas pelos metal(óide)s são: i) a imobilização de metal(óide)s presentes no solo através da libertação de substâncias quelantes (metalotioneínas-MTs, ácidos orgânicos, fitoquelatinas-PCs); ii) ligação dos metal(óide)s a biopolímeros presentes na parede celular, como a quitina e membrana plasmática; III) mobilização dos metais do solo para o citosol através do transporte pelas membranas; v) sequestro dos metais do solo nos vacúolos (Cabral et al., 2010; Dhalaria et al., 2020).

Na literatura existem vários estudos que comprovam o papel fundamental dos FMA para promover o crescimento e desenvolvimento de plantas em áreas contaminadas com metal(óide)s (Begum et al, 2019). Por exemplo, os fungos micorrízicos têm sido utilizados na fitoextração em associação com as plantas, embora nem todas as espécies de plantas sejam capazes de estabelecer relações simbióticas com estes fungos (Miransari, 2011; Mitra et al. 2022).

1.5.3 Uso de corretivos

Os solos contaminados normalmente carecem de nutrientes, têm baixo teor de matéria orgânica e muitas vezes possuem um pH ácido e elevada salinidade. Existem produtos denominados corretivos que podem ser adicionados ao solo para melhorar a sua qualidade e o crescimento das plantas (Moreira et al., 2021b). A sua principal função é melhorar as características físicas, químicas e, ou,

biológicas do solo (Capitão, 2020). Os corretivos mais utilizados contêm carbonatos, óxidos, hidróxidos ou silicatos de cálcio e de magnésio como constituintes neutralizantes ou princípio ativo (Ramos et al., 2006). Existem também corretivos orgânicos, sendo a sua utilização feita normalmente com o intuito de aumentar o nível de matéria orgânica no solo (Capitão, 2020). Os corretivos orgânicos do solo são produtos de fácil acesso, de baixo custo e podem apresentar diversos benefícios quando são aplicados em solos contaminados, tais como: i) fornecer macro e micronutrientes essenciais às plantas; ii) melhorar a estrutura e arejamento do solo; iii) aumentar a humidade do solo; iv) aumentar o teor de matéria orgânica; v) aumentar a atividade microbiana; vi) aumentar o armazenamento de C no solo. Desta forma, os corretivos orgânicos estimulam também indiretamente o crescimento microbiano. Existem corretivos orgânicos de diferentes origens, como por exemplo: estrume animal, compostos digeridos provenientes de tratamento anaeróbio de resíduos orgânicos, biossólidos, resíduos de culturas e vermicomposto (Moreira et al., 2021b).

1.5.3.1 Vermicomposto

A vermicompostagem é uma tecnologia que utiliza determinadas espécies de minhocas que, em conjunto com os microrganismos existentes no seu intestino, digerem a matéria orgânica. As minhocas dejetam excrementos constituídos por agregados de terra e da matéria orgânica digerida, sendo esses dejetos ricos em nutrientes assimiláveis pelas plantas (Belliturk et al., 2014; WEBER Portugal, 2008). A escolha das minhocas é um aspeto importante na evolução da tecnologia de vermicompostagem. Existem mais de 3.000 espécies de minhocas conhecidas no mundo, mas a *Eisenia foetida* é a mais utilizada pelo facto de ter elevada capacidade reprodutiva, apresentar crescimento rápido, ter uma ampla distribuição (pela larga faixa de tolerância à variação de temperatura), e por viver em resíduos orgânicos com diferentes graus de humidade (Cotta et al., 2015). Nos processos de vermicompostagem existe a necessidade da pré-compostagem devido ao aumento da temperatura causado pelo desenvolvimento dos microrganismos na digestão da matéria orgânica (anaeróbia ou anaeróbia), mas as minhocas fogem devido ao aumento da temperatura (Cotta et al., 2015). A ação das minhocas contribui para o controlo de organismos patogénicos primários (normalmente presentes em resíduos sólidos orgânicos) e secundários (que crescem e se desenvolvem durante o processo). Para além disto, as minhocas atuam também sobre a matéria orgânica de forma mecânica, através da trituração das partículas orgânicas que passam pelo seu trato digestivo (WEBER Portugal, 2008). A vermicompostagem tem a vantagem de ter um baixo custo, simplicidade de ação e eficiência relativamente alta (WEBER Portugal, 2008).

1.5.3.2. Hidrogéis

Os hidrogéis (muitas vezes designados por hidrorrententores), são também considerados corretivos do solo. Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais que podem reter uma quantidade significativa de água dentro de sua estrutura e inchar, sem que ocorra a sua dissolução. São capazes de absorver e reter grande quantidade de água sem perder sua forma tridimensional. A utilização de hidrogéis na agricultura tem sido uma estratégia para a prática, devido às suas características, contribuem para aumentar a capacidade de retenção de água no solo, reduzindo a frequência de

irrigação. No entanto, a maioria desses hidrogéis tem uma composição baseada em materiais sintéticos, como a poliacrilamida e o poliestireno, os quais, por não serem biodegradáveis geram resíduos no solo (Mendonça et al., 2012). Apesar das propriedades promissoras que os polímeros de hidrogel apresentam, quando adicionados ao solo, podem ser degradados devido à presença de microrganismos, altas temperaturas, efeito do pH, radiação ultravioleta, e, principalmente, os sais provenientes de adubações e calagem. Os subprodutos originados de sua degradação podem ser prejudiciais à saúde dos seres vivos e as plantas, pois podem vir a libertar a acrilamida, um composto carcinogénico para o ser humano (Freitas et al, 2019).

O hidrogel pode ser importante na fitogestão de solos contaminados para maximizar o potencial de fitoextração por plantas, contudo é sempre necessário avaliar a influência do hidrogel na espécie de planta escolhida (Vasconcelos, 2019).

1.6. Mina da Borralha

A mina da borralha (Fig. 7) está localizada no distrito de Vila Real (Montalegre, Portugal) e possui uma área de cerca de 2611 hectares. Iniciou a sua atividade em 1902, tendo a sua exploração económica sido centrada na extração dos minérios volframite e scheelite (Vieira, 2014).

A mina da Borralha contém o segundo maior jazigo de estanho e tungsténio em Portugal. Sob o ponto de vista geológico, as minas apresentam uma zona essencialmente granítica e outra xistenta. O principal mineral dos filões é o quartzo (98%), de sulfuretos 1%, de tungstatos (0,5%) e outros elementos (0,5%) (Ribeiro, 2010).

Após o encerramento da mina, em 1986, foram deixadas grandes quantidades de resíduos provenientes da extração e tratamento dos minérios (escombreiras) sem medidas de contenção adequadas. Desta forma, essa acumulação proporcionou uma grande fonte de contaminação dos solos e ambiente circundante, como formação e drenagem de águas ácidas (Vieira, 2014). As escombreiras precisam de medidas de contenção e de remediação com o intuito de imobilizar os contaminantes.



Figura 7. Mina da Borralha (© Nadine Rodrigues)

1.7. Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho foram:

1. selecionar uma BPCV do solo rizosférico da área da escombreira da mina da Borralha com base na sua tolerância a elevadas concentrações de metais e características promotoras de crescimento vegetal;
2. avaliar a eficácia da utilização, isolada e em conjunto, da inoculação da BPCV selecionada e fungos micorrízicos arbusculares, de um vermicomposto, e de um hidrogel comercial no crescimento de Vetiver em materiais ("solo") contaminados da escombreira da mina da Borralha;
3. avaliar os efeitos dos diferentes tratamentos na estabilização de metais e na melhoria das características químicas e bioquímicas do "solo".

Para a prossecução destes objetivos, foram estabelecidos ensaios em estufa com a planta vetiver com diferentes combinações de tratamentos.

Foram também definidos os seguintes objetivos secundários:

- i) avaliar as características promotoras do crescimento vegetal da estirpe bacteriana selecionada;
- ii) analisar a sobrevivência da BPCV no hidrogel comercial ao longo do tempo;
- ii) determinar a irrigação necessária das plantas nos diferentes tratamentos;
- iii) analisar o efeito dos diferentes tratamentos nas atividades enzimáticas do solo.

2. Material e métodos

2.1. Isolamento de estirpes bacterianas

Para se proceder ao isolamento de estirpes bacterianas, foi utilizada uma amostra composta de solo rizosférico das espécies vegetais mais abundantes na área da escombreira da mina da Borralha, nomeadamente das espécies *Agrostis capillaris*, *Cytisus striatus*, *Erica arborea*, *Pinus pinaster*, *Rubus ulmifolius*, and *Salix caprea*. A caracterização físico-química do solo encontra-se descrita na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização físico-química do solo rizosférico recolhido na mina da Borralha.

Parâmetro	Resultado	Método	Interpretação
pH (H ₂ O) (a 15.9 °C)	5.4	Potenciometria	Muito ácido
pH (CaCl ₂) (a 16.8 °C)	4.8	Potenciometria	Ácido
Condutividade (mS cm ⁻¹)	< 0.100 (LQ)	Conductimetria	Não salino
Textura do solo	Franca	Método de campo	-
Matéria orgânica (%)	2.11	Cálculo	Médio
Azoto total (%)	0.08	Catarometria	Baixo
Fósforo (mg kg ⁻¹ P ₂ O ₅)	95.6	ICP-OES	Médio
Potássio (mg kg ⁻¹ K ₂ O)	55.6	ICP-OES	Médio
Cálcio (mg kg ⁻¹ CaO)	1088	ICP-OES	Excesso
Magnésio (mg kg ⁻¹ MgO)	104	ICP-OES	Alto
Enxofre (mg kg ⁻¹)	23.6	ICP-OES	Alto
Ferro (mg kg ⁻¹)	235	ICP-OES	Excesso
Manganês (mg kg ⁻¹)	16.1	ICP-OES	Alto
Boro (mg kg ⁻¹)	< 0.400 (LQ)	ICP-OES	Baixo
Cobre (mg kg ⁻¹)	156	ICP-OES	Excesso
Zinco (mg kg ⁻¹)	16.1	ICP-OES	Alto
Molibdénio (mg kg ⁻¹)	< 0.400 (LQ)	ICP-OES	Baixo
Sódio (mg kg ⁻¹)	7.33	ICP-OES	
Níquel (mg kg ⁻¹)	3.2	ICP-OES	Alto
Cobalto (mg kg ⁻¹)	< 0.40 (LQ)	ICP-OES	Baixo
Cádmio (mg kg ⁻¹)	0.505	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 1
Chumbo (mg kg ⁻¹)	< 45.4 (LQ)	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 50
Cobre (mg kg ⁻¹)	438	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 50
Crómio (mg kg ⁻¹)	< 27.2 (LQ)	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 50

Mercúrio (mg kg⁻¹)	< 0.0900 (LQ)	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 1
Níquel (mg kg⁻¹)	14.2	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 30
Zinco (mg kg⁻¹)	119	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 150

LQ - Limite de Quantificação do Método; ICP/OES - Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry; VLC - Valor Limite de Concentração de metais nos solos com valores de pH menores ou iguais a 5,5 (segundo o Decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de Outubro 2009).

A amostra de solo foi homogeneizada, peneirada (< 2mm) e dividida em 5 sub-réplicas. Para o isolamento das estirpes bacterianas, a partir das 5 sub-réplicas efetuou-se uma pressão seletiva utilizando o seguinte procedimento: foi adicionado às 5 porções de solo, 50 mL de meio caldo de soja Trypticase (TSB) estéril, e colocou-se a incubar durante 24 h. Após este tempo decorrido, a 2 porções adicionou-se uma solução de 1 mM de CuSO₄.5H₂O. Às outras 2 porções adicionou-se uma solução de Mix de metais (0,1 mM Cd + 1 mM Cu + 1 mM Pb + 2,5 mM Zn). As misturas foram incubadas overnight a 30°C. Foram depois realizadas diluições sucessivas destas soluções e posteriormente plaqueadas (100 µl), em triplicado, em meio Agar Triptona de Soja (TSA), e incubadas a 30°C durante 24h. A última porção foi plaqueada em triplicado diretamente em meio TSA com um Mix de metais (0,1 mM Cd + 1 mM Cu + 1 mM Pb + 2,5 mM Zn) incorporado e incubada a 30°C durante 24h. Após a incubação, selecionaram-se as colónias sobreviventes e morfologicamente diferentes (ex. cor, textura, rebordo). As estirpes selecionadas foram repicadas várias vezes até confirmação da sua pureza e congeladas a -80°C, numa solução de 50% glicerol (30%) e de 50% extrato de levedura (1 g/L) e triptona (5 g/L) até posterior utilização.

2.2. Tolerância das estirpes selecionadas a metais

Para analisar o limite da tolerância a metais dos isolados, estes foram incubados durante 2 dias em meios de cultura enriquecidos com diferentes iões metálicos: Cu²⁺ (CuSO₄.5H₂O); Cd²⁺ (CdCl₂.2.5H₂O); Zn²⁺ (ZSO₄.7 H₂O); e Pb²⁺ (Pb(NO₃)₂). As concentrações e os meios utilizados para cada elemento foram:

- i) Cu: Cu²⁺ [750ppm] ou [1500ppm] +TSA;
- ii) Cd: Cd²⁺ [15ppm] ou [30ppm] +TSA;
- iii) Pb: Pb²⁺ [1000ppm] + LB;
- iv) Zn²⁺ [750ppm] + ágar de contagem de placas (PCA).

2.2.1. Extração DNA das colónias bacterianas selecionadas

O ácido desoxirribonucleico (ADN, em português: ácido desoxirribonucleico; ou DNA, em inglês: deoxyribonucleic acid) das 4 colónias bacterianas selecionadas foi extraído pelo método da fervura. Para isso, foi retirada com uma ansa uma colónia de cultura bacteriana fresca e colocada num microtubo estéril com 200 µL de H₂O ultra-pura esterilizada. A mistura foi homogeneizada no vórtex e colocada no termobloco durante 5 minutos a uma temperatura de 95°C. Após esse tempo, foi

colocada no gelo 5 minutos, tendo sido centrifugada de seguida durante 10 min a 10000 rpm. O sobrenadante, contendo o DNA, foi retirado e armazenado a -20°C para as análises posteriores.

2.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) - 16S

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada por PCR, usando os primers 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-ACCTTGTTACGACTT-3'). A mistura foi preparada usando 25 µL da mix green Master Mix (contendo 1x tampão de PCR, 3 mM MgCl₂, 5% dimetilsulfóxido (DMSO), 200 µM de cada nucleotídeo, 0,6 µM de cada primer e 2U Taq polimerase (Nzytech, Lisboa), 3 µL de cada primer e água ultra-pura esterilizada e filtrada até perfazer um volume final de 50 µL. As misturas de PCR foram colocadas num termociclador (Bio-RAD iCycler, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) durante 2h30, e sujeitas a 30 ciclos de 5 minutos a 95°C, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1,5 minutos a 72°C, terminando com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. Para verificar a amplificação do gene 16S rRNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) durante 30 min a 90V (Fig.8). À agarose foi adicionado o corante SYBR® Safe DNA Gel Stain para possibilitar a visualização do DNA, quando colocado o gel no transiluminador. Como marcador de massa molecular (*ladder*), foi usada a NZUYDNA Ladder VII 1200pb (Nzytech). Para a purificação do DNA, foi utilizado o Kit *Gel Band Purification* (Grisp). Para isso, foram adicionados 20µL de cada produto de PCR a 100 µL de solução do gel de solubilização. Estas misturas foram colocadas em colunas MiniSpin e centrifugadas a 14 000g durante 30 segundos. Após a centrifugação, foi adicionado 50 µL de tampão de eluição. As amostras de DNA foram enviadas para a Eurofins, Alemanha, para serem sequenciadas.

2.2.3. Caracterização das estirpes isoladas

As 4 estirpes isoladas foram caracterizadas relativamente a características de promoção de crescimento vegetal, nomeadamente: i) solubilização de fósforo, ii) produção de enzimas extracelulares, iii) produção de amónia, iv) produção de IAA, v) atividade da enzima ACC deaminase e vi) produção de sideróforos.

2.2.3.1 Solubilização de fósforo

A solubilização de fósforo (P) foi avaliada através do crescimento das estirpes no meio National Botanical Institute's Phosphate growth medium (NBRIP), ao qual foi adicionado 0.5% de fosfato tricálcico (Nautiyal, 1990), durante 15 dias a 37°C. Foram efetuadas 3 réplicas para cada isolado. A presença de um halo transparente à volta das colónias é indicativa de solubilização de fósforo, que pode ser quantificada pelo diâmetro do halo, segundo a fórmula:

$$\text{Índice de solubilização de P (ISP)} = \frac{\text{Diâmetro total (colónia + halo)}}{\text{Diâmetro colónia}}$$

2.2.3.2. Produção de enzimas extracelulares

Os isolados foram colocados a incubar em meio TSB *overnight* a 30°C e 120 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 8500 rpm durante 10 min, e procedeu-se à inoculação do sobrenadante nos diferentes meios. Para verificar a produção de lipases, os isolados foram inoculados em meio Meio Luria Bertani (LB) (por litro: triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, CaCl₂ 2 g), ao qual se adicionou Tween 80 (10 g/L). Após 5 dias de incubação a 30°C, as placas foram observadas e a formação de precipitados a volta das colónias foram considerados positivos para produção de lipases (Izidoro et al., 2010). Para a produção de pectinases, os isolados foram inoculados em meio mínimo (por litro: Na₂HPO₄.2H₂O 2,67 g, KH₂PO₄ 1,40 g, MgSO₄.7H₂O 0,20 g, Agar 15 g, (NH₄)₂SO₄ 0,50 g, Glucose 2 g Extrato de levedura 1,2 g, Pectina 10 g, Solução de Oligoelementos 1mL). Após 5 dias de incubação a 30°C, as placas foram inundadas com solução de iodo de Lugol por 10 min. A formação de halos claros ao redor das colónias é considerada positiva para produção de pectinases (Cattelam et al., 1999). A produção de celulases foi determinada em meio carboximetilcelulose (CMC) (por litro: MgSO₄.7H₂O 0,25 g, KH₂PO₄ 0,5 g, Carboxymethyl cellulose salt 2g e Agar 15g). Após 5 dias de incubação a 30°C, as placas de CMC foram inundadas com solução vermelho Congo (1mg/mL) durante 15 min, e após remover o corante, foi adicionado às placas uma solução de NaCl 1 M durante 15 min. A formação de um halo claro foi considerada positivo para produção de celulases (Grupta et al., 2012). A produção de proteases foi testada usando o meio Skim Milk (por litro: Agar Nutrient broth 8g, Skim Milk 10 g e Agar 15 g). Após 5 dias de incubação a 30°C, uma zona clara ao redor das colónias indica atividade proteolítica positiva (Meshram and Saxen, 2016). Para cada um dos procedimentos, foram efetuadas 3 réplicas para cada isolado.

2.2.3.3. Produção de Amónia

Para avaliar a capacidade dos isolados produzirem amónia, foram colocadas culturas frescas de cada um a incubar em 10 mL de água peptonada (LAB M) durante 48h, a 30°C e a 150 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido para um tubo de Falcon de 15 mL, ao qual se adicionou 500 µl de reagente de Nessler. O ensaio foi repetido 3 vezes. O desenvolvimento de cor amarelada/marron pelas amostras é considerado positivo para produção de amónia (Fig. 21) (Cappuccino e Sherman 1992).

2.2.3.4. Produção de IAA

Os isolados foram colocados a crescer *overnight* em meio nutritivo TSB e as células foram depois recolhidas por centrifugação a 8000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. O *pellet* bacteriano resultante foi incubado a 30°C durante 48h com 3 mL de tampão fosfato (pH 7.5) com glucose (1%) e 2 mL de triptofano (1%). Após a incubação, foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético (5%) e 1 mL de 0.5 M de CaCl₂. A mistura foi centrifugada a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C e 500 µl de sobrenadante foi transferido para cuvetes, ao qual se adicionou 300 µl de solução de Salper (2 ml de FeCl₃ 0,5 M e 98 ml de ácido perclórico a 35%). As amostras foram colocadas a incubar a 25°C no escuro durante 30 minutos; após a incubação, a densidade ótica foi medida a 535 nm no

espectrofotômetro (marca?). O procedimento foi repetido 3 vezes, e foram efetuadas 3 réplicas para cada isolado em estudo (Gordon & Weber, 1951).

2.2.3.5. Atividade da enzima ACC deaminase

Os isolados foram colocados a crescer *overnight* em meio nutritivo TSB. As células foram depois recolhidas por centrifugação a 8000 g por 10 minutos, e ressuspensas em 10 mL de meio mínimo (por litro: 2g de glucose, 2mM ACC, 2.67g Na₂HPO₄.2H₂O, 1.40g KH₂PO₄, 0.20g MgSO₄.7H₂O e 10 mL de uma solução de oligoelementos), a 30°C e 120 rpm durante 24h. Foram recolhidos 20 mL de células por centrifugação a 8000g durante 10 minutos para tubos estéreis previamente pesados. Os *pellets* de células bacterianas foram lavados com 5 mL de 0.1M Tris-HCl pH 7.6 e pesou-se novamente os tubos depois da lavagem. Em seguida, os *pellets* foram suspensos em 500 µl de 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 e 60 µl de tolueno foram adicionados à suspensão de células e vortexou-se durante 30 segundos. Foram colocados 200 µl da solução resultante com 20 µl de 0.5 M ACC a incubar durante 30 minutos a 30 °C. Após a incubação, adicionou-se 1 mL de 0.56N HCl e vortexou-se 15 s. O pellet foi removido após uma centrifugação de 10 minutos a 10000g. Adicionou-se 250 µl sobrenadante/padrão a 200 µl de 0.56N HCl e a 75 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (0,2% DNPH em 2 M HCl), e colocou-se a incubar 30 minutos a 30 °C. Após a incubação, foi adicionado 500 µl de 2M NaOH e realizada a leitura da absorvância a 540 nm. O ensaio foi repetido 3 vezes e foram feitas 3 réplicas de cada isolado estudado (Saleh and Glick 2001).

2.2.3.6. Sideróforos

Culturas frescas de cada estirpe foram inoculadas num meio específico composto por: 1) solução Cromo-AzuroI-S (CAS) e Ferro (100 mL) - 10 mL de 1 mM de FeCl₃ em 10 mM HCl 50 mL de CAS (1.21 mg/mL) e 40 mL de brometo de Cetrinômio (CTAB) (1.82 mg/mL) e 2) meio TSA suplementado com 9.76 g/L de MES (900 mL) - 30g/L de TSA, 9.76 g/L de Ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado (MES) (acertou-se pH para 6,8 com KOH) e 15g de agar. As duas soluções foram colocadas a autoclavar, e após o seu arrefecimento foram misturadas e plaqueadas. As culturas foram depois inoculadas no meio e incubadas 5 dias a 37°C. Neste ensaio foram feitas 3 réplicas para cada isolado. A mudança da cor do meio para uma tonalidade ferrosa é considerada positiva para a produção de sideróforos.

2.3. Ensaio em estufa

2.3.1. Recolha e processamento do solo

Para a realização do ensaio experimental em estufa foi recolhido cerca de 150kg de "solo" da escombreira da mina da Borralha (Figura 8).



Figura 8. Recolha de "solo" da escombreira para execução do ensaio em vaso (©Nadine Rodrigues).

O solo recolhido foi colocado em sacos de plástico e transportado para o laboratório, onde foi misturado. Após a sua homogeneização, foi recolhida uma amostra de solo na qual foram determinados os principais parâmetros físico-químicos num laboratório externo acreditado (A2 - Análises Químicas, Lda) (Tabela 5).

Tabela 5. Análise do "solo" recolhido da escombreira da mina da borralha.

Parâmetro	Resultado	Método	Interpretação
pH (H ₂ O) (a 15,9 °C)	4.8	Potenciometria	Muito ácido
pH (CaCl ₂) (a 16,8 °C)	4.2	Potenciometria	Ácido
Condutividade(mS/cm)	< 0.100 (LQ)	Condutimetria	Não salino
Textura do solo	Franco-Arenosa	Método de campo	
Matéria orgânica (%)	1.08	Cálculo	Muito baixo
Azoto total (%)	< 0.06 (LQ)	Catarometria	Muito baixo
Fósforo (mg/kg P ₂ O ₅)	105	ICP-OES (Extração Mehlich)	Alto
Potássio (mg/kg K ₂ O)	17.3	ICP-OES (Extração Mehlich)	Muito baixo
Cálcio (mg/kg CaO)	< 310 (LQ)	ICP-OES ((Extração Mehlich)	Muito baixo
Magnésio (mg/kg MgO)	28.5	ICP-OES (Extração Mehlich)	Muito baixo
Enxofre (mg/kg S)	15.6	ICP-OES (Extração Mehlich)	Alto

Ferro (mg/kg Fe)	207	ICP-OES (Extração Mehlich)	Excesso
Manganês (mg/kg Mn)	6.93	ICP-OES (Extração Mehlich)	-
Boro (mg/kg B)	< 0.400 (LQ)	ICP-OES (Extração Mehlich)	Baixo
Cobre (mg/kg Cu)	173	ICP-OES (Extração Mehlich)	Excesso
Zinco (mg/kg Zn)	3.27	ICP-OES (Extração Mehlich)	Alto
Molibdênio (mg/kg Mo)	< 0.400 (LQ)	ICP-OES (Extração Mehlich)	Baixo
Sódio (mg/kg Na)	< 6.25 (LQ)	ICP-OES (Extração Mehlich)	-
Níquel (mg/kg Ni)	< 0.40 (LQ)	ICP-OES (Extração Mehlich)	Baixo
Cobalto (mg/kg Co)	< 0.40 (LQ)	ICP-OES (Extração Mehlich)	Baixo
Capacidade de troca catiónica efetiva (cmol ⁺ /kg)	< 2.0 (LQ)	ICP-OES	Muito baixo
Cádmio (mg/kg Cd)	0.523	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 1
Chumbo(mg/kg Pb)	< 45.4 (LQ)	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 50
Cobre (mg/kg Cu)	403	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 50
Crômio(mg/kg Cr)	< 27.2 (LQ)	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 50
Níquel(mg/kg Ni)	< 13.6 (LQ)	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 30
Zinco(mg/kg Zn)	84.0	ICP-OES (Extração em Água régia)	VLC - 150

LQ, Limite de Quantificação do Método; ICP/OES - Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry
VLC - Valor Limite de Concentração de metais pesados nos solos com valores de pH menores ou iguais a 5,5 (segundo o Decreto-Lei n.º 276/2009 de 2 de Outubro 2009).

2.3.2. Ensaio experimental

O ensaio experimental foi montado numa sala de crescimento de plantas na Escola Superior de Biotecnologia (Fig.9). Cerca de dez kg de "solo" foi colocado, sem peneiração prévia, em 32 vasos de 20L para o ensaio experimental. que consistiu em 8 tratamentos: C1 - apenas "solo "; C2 - "solo" + vetiver; V - "solo", vetiver + vermicomposto; H - "solo", vetiver e hidrogel; M - "solo", vetiver e mix

(bactéria e esporos); VH - "solo", vetiver, hidrogel e vermicomposto; HM - "solo", vetiver, hidrogel e Mix; HVM - "solo", vetiver, hidrogel, vermicomposto e mix. Cada tratamento tinha 4 réplicas (Fig. 10). Foi usado 5% de vermicomposto (SIRO Earthworm Humus© nos tratamentos em que este estava presente. O hidrogel utilizado foi o produto comercial – Polyter (70% de celulose vegetal, 23% adubo orgânico e 7% poliacrilamida de potássio (Polyter, 2020), numa percentagem de 25%. O inóculo utilizado neste ensaio experimental (Mix) era composto por esporos de FMA's (*Rhizoglossum irregulare*, *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis caledonium*; INOQ Advantage, INOQ) e pela estirpe bacteriana selecionada, *Cupriavidus pauculus*. Os tratamentos em que se adicionou a Mix continham 0,01g de esporos por 10 L de substrato. Para a utilização da estirpe bacteriana no ensaio experimental, esta foi colocada a incubar em TSB a 28°C e a 180 rpm durante 2 dias (OD >0,800.) Nos tratamentos em que se adicionou-se a mix a adição foi feita de duas formas: i) no tratamento M – adicionou-se 100mL de bactéria/750mL de água; ii) nos tratamentos HM e HVM – adicionou-se 10mL/kg de bactéria TSB).

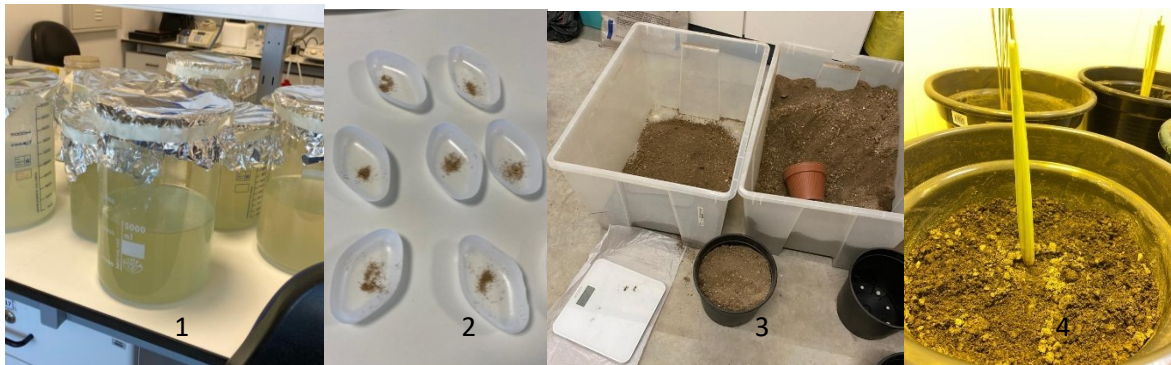


Figura 9.1- Hidrogel + Mix; 2- Esporos de fungo adicionado à Mix; 3 – Preparação do solo de cada vaso; 4- Planta no início da experiência.

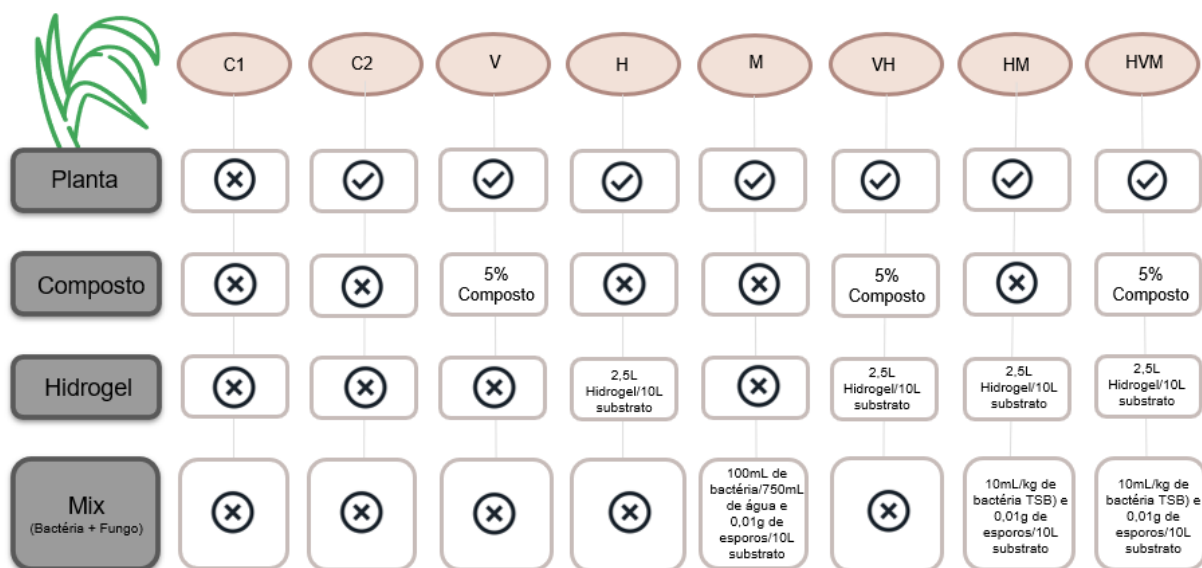


Figura 10. Representação geral dos 8 tratamentos aplicados ao “solo” da mina da Borralha.

A rega das plantas foi efetuada sempre que necessário, de forma que fosse mantida a humidade adequada do solo; a monitorização da necessidade de água foi diária.

Após 13 semanas, foi retirado e peneirado (< 2 mm) cerca de 100 g de "solo" de cada um dos vasos. As amostras foram colocadas no frigorífico a 4°C para os testes posteriores.

Pesou-se duas réplicas de 1 g de solo de cada vaso utilizado no ensaio experimental e adicionou-se 9 mL de solução salina. Foram efetuadas diluições sucessivas para determinar o nº de UFC. Foi efetuada também a medição do alongamento da planta e contabilizados o nº de rebentos novos.

2.3.3. Monitorização da viabilidade das bactérias inoculadas

Foram retirados, no início da experiência, para frascos estéreis, 100 mL da cultura de bactéria utilizada para preparar o Mix para o tratamento M e 8 x 100 mL das culturas de bactérias + Hidrogel usados para preparar os tratamentos HM e HVM, com o objetivo de monitorizar a sobrevivência da bactéria ao longo do tempo (20 semanas). Para isso, em cada semana, foram retirados 1 mL de cada uma das soluções, e foram efetuadas diluições sucessivas em meio nutritivo para posterior contagem de UFC.

2.3.4. Atividade enzimática do solo

2.3.4.1. Atividade da fosfatase

Foi pesado 1 g de solo fresco (< 2mm) de cada amostra de cada tratamento ao qual se adicionou 4 ml de tampão universal 10 0mM (pH 6.5). Os erlenmeyers foram cobertos com papel alumínio após ser adicionado 1 ml de substrato (disodium p-nitrophenyl phosphate), tendo sido colocados a incubar a 37°C durante 30 minutos, com agitação de 110 rpm. Após a incubação, adicionou-se 1 ml de CaCl₂ 0.5M e 4 ml de NaOH 0.5M para parar a reação. Transferiram-se as amostras para tubos de 15 ml, e colocou-se a centrifugar a 8000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a absorvância do sobrenadante foi lida a 420 nm. A concentração de fosfatase foi obtida através de uma curva de calibração usando padrões com concentrações de p-nitrophenol 2mM conhecidas (de 0 a 60 µl).

2.3.4.2. Atividade da desidrogenase

Foi pesado 1 g de solo fresco (<2mm) de cada amostra para tubos estéreis de 20 mL. Adicionou-se 0,5 ml de 1% trifeniltetrazolium chloride (TTC) e 0,5 ml de 1% glucose, e agitou-se no vórtex. As amostras foram incubadas a 37°C durante 24h no escuro. Após o período de incubação, foi adicionado 3 ml de metanol (99,9%) e vortexou-se. Durante 5 minutos centrifugou-se a amostra a 8500 rpm e recolheu-se o sobrenadante para um tubo de Falcon estéril de 50ml. Este procedimento foi repetido três vezes (ou até o sobrenadante sair incolor). Os tubos com o sobrenadante das amostras foram centrifugados a 8500 rpm por 5 minutos e recolheu-se o sobrenadante para um balão volumétrico de 10 mL, e acertou-se o volume com uma solução de metanol. A absorvância foi lida a 485 nm. A concentração de trifetil formazan (TPF) foi obtida através de uma curva de calibração usando padrões de concentrações conhecidas (de 0 a 60 µl).

2.3.4.3. Atividade da urease

Foi pesado, de cada amostra, solo fresco equivalente a 1 g de solo seco para um tubo de 20 mL, ao qual foi adicionado 4 ml de tampão fosfato 0.2 M a pH 8.0 e 1ml de ureia 6.4%. Incubou-se durante 1h:30m, 120 rpm, a 37°C, na horizontal. Após a incubação, adicionou-se 5 ml de KCl, fecharam-se os tubos e agitou-se. Os tubos foram centrifugados durante 3 minutos a 8000 rpm. Recolheu-se 3 ml de sobrenadante para um tubo estéril previamente identificado, colocou-se o eletrodo e adicionou-se 1ml de NaOH 1M (para elevar o pH até 12 e assegurar que todo o ião amônio está na forma de NH_4^+) e só depois se registou o valor após estabilização. A concentração de urease é obtida através de uma curva de calibração usando padrões (com NH_4Cl) com concentrações conhecidas (10^{-2} a 10^{-4}).

2.3.4.4. Hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA)

Foi pesado 0.5 g de solo fresco e adicionado 5 mL de tampão fosfato-sódio 60 mM a pH 7.6. Colocou-se a incubar a 25°C durante 20 minutos com 110 rpm de agitação. Foram depois adicionados 5 mL de uma solução 2:1 de metanol e clorofórmio para interromper a reação, e centrifugou-se 10 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi recolhido e a sua absorvância foi lida a 490 nm. A concentração de Fluoresceína foi obtida através de uma curva de calibração usando padrões com concentrações de fluoresceína conhecidas (de 0 a 4 μM).

2.3.5. pH

A medição do pH das amostras foi realizada de duas formas: i) foram pesados 5 g de cada amostra para um Falcon de 50 mL e foi adicionada uma solução 12.5 ml de KCl (1 mol L^{-1}) e agitou-se; ii) foram pesadas 5 g de cada amostra para um Falcon de 50 mL e foi adicionada 12.5 mL de H_2O e agitou-se. Deixou-se em repouso 2:30 h, após o qual o pH foi lido com um medidor de pH calibrado (CRISON) (Fig.11).



Figura 11. Medição do pH das amostras.

2.3.6. Condutividade

Adicionou-se 25 mL de H₂O a 5g de cada amostra de solo de cada tratamento testado e vortexou-se as misturas. A condutividade foi determinada após duas horas, com um condutímetro.

2.3.7. Respiração do solo

Foram pesados, em duplicado, 20 g de solo húmido de cada amostra para frascos de 250 mL com tampa. Com um borrifador, humedeceu-se o solo e abriu-se um pequeno espaço no meio do solo e colocou-se potes de vidro de 50 mL com 10 mL de NaOH 0.2M; fechou-se imediatamente os potes de 250 mL com a tampa. As amostras e os controlos foram colocados a incubar a 30 °C durante 3 dias. Ao fim dos 3 dias de incubação, procedeu-se às titulações, tendo o titulante sido uma solução de HCl 0.1M e o titulado uma solução de NaOH 0.2M. Para a preparação da titulação i) foram colocados 4 mL de cloreto de bário 0.5M e 3 gotas de fenolftaleína em gobelés (o número de gobelés foi igual ao número das amostras e controlos) e colocou-se um magneto para agitação; ii) ajustou-se a bureta com o HCl; iii) verteu-se NaOH no gobelé com cloreto de bário e fenolftaleína; iv) iniciou-se as titulações, quando a solução fica incolor para-se a titulação e procede-se à leitura do volume de HCl utilizado. A taxa de produção de carbono em forma CO₂ pela respiração de um solo (C_{CO2}), expressa em mg de C/kg de solo/h é calculada através da seguinte fórmula:

$$C_{CO2} = \frac{(Volume\ de\ HCl\ utilizado\ no\ controlo - Volume\ de\ HCl\ utilizado\ na\ amostra) \cdot 6 \times 10^{-3} \times 10^6}{Média\ MS \times tempo}$$

2.3.7.1. Humidade do solo

Foi pesado cerca de 5g de solo de cada amostra para cadinhos previamente pesados (P1). O solo+cadinho foi pesado (P2) e colocado na estufa a 105°C durante 24h. Após arrefecerem no exsiccador, os conjuntos solo+cadinho foram novamente pesados (P3) e a quantidade de água no solo foi determinada pela fórmula:

$$MS = 1 - \left[\frac{(P2 - P1) - (P3 - P1)}{(P3 - P1)} \times 100 \right]$$

2.3.8. Extração de metais biodisponíveis no solo (Cu, Zn, Ni, Zn, Fe, Ca, Na)

Foram pesados 5 g de solo de cada uma das amostras para tubos de 50 mL, aos quais se adicionou 25 mL de acetato de amónia ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) 1 M. Os tubos foram incubados 2h na horizontal para maior homogeneização, centrifugados a 8000 rpm durante 10 minutos e filtrados ($0,45 \mu\text{M}$). O filtrado foi recolhido para um tubo e guardado a 4°C até análise por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) para a obtenção da concentração dos seguintes metais zinco (Zn), níquel (Ni), ferro (Fe), magnésio (Mg), cálcio (Ca), cobre (Cu) e sódio (Na) presentes nas amostras de solo (Fig.12).

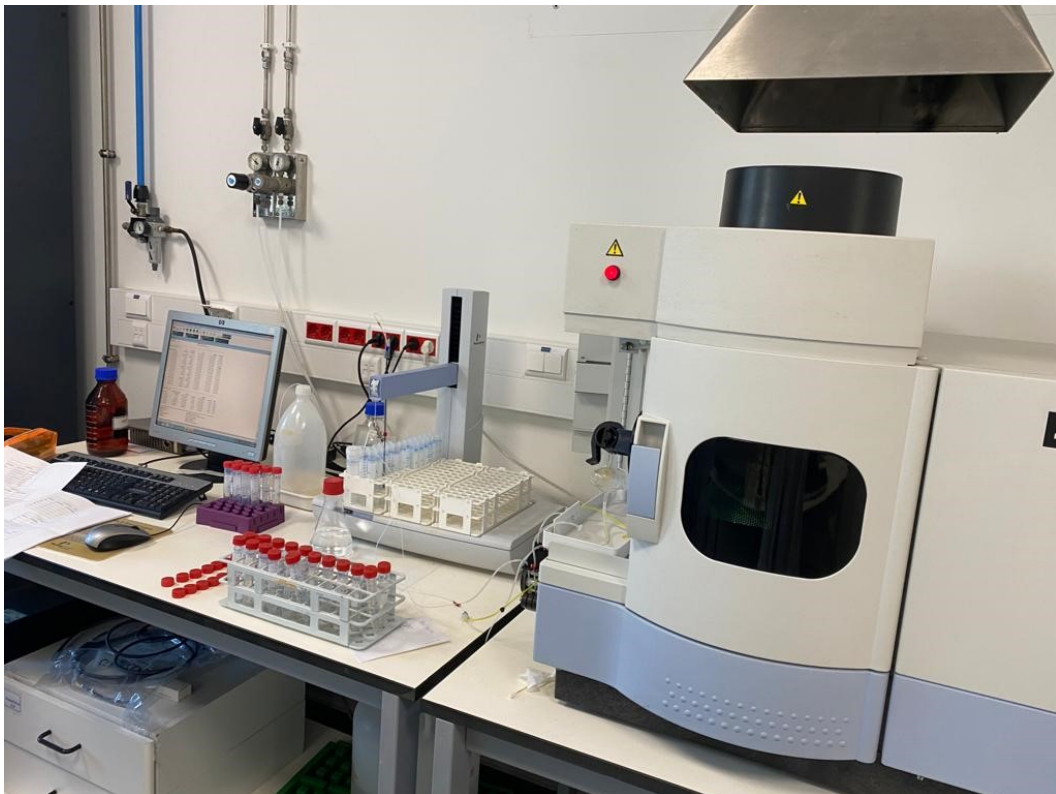


Figura 12. Medição dos metais biodisponíveis das amostras em ICP-OES (PerkinElmer precisely optima 7000 DV)

2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS Statistics (IBM, New York, USA, versão 28.0). A ANOVA one-way foi realizada. O teste Post-Hoc de Duncan foi realizado para determinar as diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$) entre os tratamentos.

3. Resultados

3.1. Caracterização das estirpes bacterianas selecionadas

As quatro estirpes bacterianas foram selecionadas com base na sua tolerância a metais, efetuada no ponto 2.2.

Algumas características genéricas destas estirpes selecionadas encontram-se sumariadas na Tabela 6.

Tabela 6. Características das estirpes identificadas.

Isolados	1	2	3	4
Estirpe	<i>Burkholderia contaminans</i>	<i>Lelliotta amnigena</i>	<i>Cupriavidus pauculus</i>	<i>Bacillus wiedmanni</i>
Coloração de* Gram	-	-	-	+
Pigmentação da colónia	Amarela	Amarela	Rosa-claro	Branca
Morfologia	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Tipo de Respiração*	Aeróbica obrigatória	Anaeróbica facultativa	Bacilo aeróbico	Anaeróbica facultativa
Doenças causadas*	Infeção pulmonar crónica em pessoas com fibrose cística.	Infeções urinárias	Infeções nosocomiais	Infeções gastrointestinais

*in Cipolla et al., 2022; Miller et al., 2016; Negrodo et al., 2017; Osei et al., 2022; Orterga & Bernal, 2011.

3.2. Tolerância a metais

Os resultados relativos à tolerância dos isolados nos diferentes meios de cultura suplementados com metais (Cu, Cd, Zn e Pb) estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Tolerância a metais das estirpes selecionadas.

Isolados	Tolerância a metais					
	Cu 750 ppm	Cu 1500 ppm	Cd 15 ppm	Cd 30 ppm	Zn 750 ppm	Pb 1000 ppm
<i>Burkholderia Contaminans</i>	+	-	+	+	+	+
<i>Lelliotta amnigena</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Cupriavidus pauculus</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Bacillus wiedmanni</i>	-	-	+	+	-	+

-, sem crescimento; +, com crescimento

O isolado 1 (*B. contaminans*) cresceu em todos os meios testados exceto no meio com a maior concentração de cobre (1500 ppm). Os isolados 3 (*C. pauculus*) e 2 (*L. amnigena*) não cresceram nos meios com maior concentração de cobre (1500 ppm) e zinco (1000 ppm). O isolado 4 (*B. wiedmanni*) foi o que teve menor tolerância aos metais, apenas tendo conseguido crescer nos meios com cádmio e zinco.

Na Figura 13 é possível ver dois exemplos de crescimento das estirpes estudadas nos meios enriquecidos com metais.

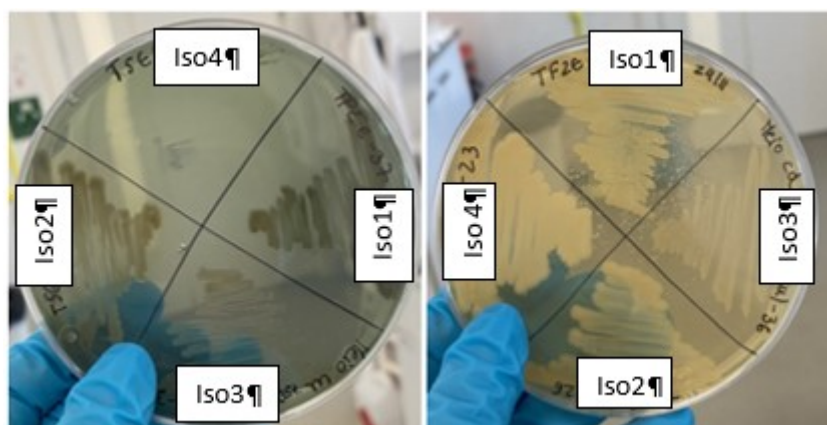


Figura 13. Crescimento das estirpes em estudo em meios enriquecidos com metais; 1 - meio de cultura TSA enriquecido com cobre (750 ppm); 2 - meio de cultura TSA enriquecido com cádmio (15 ppm).

3.3. Produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal pelas estirpes bacterianas

3.3.1. Solubilização de fósforo e produção de enzimas extracelulares

Os resultados relativos à solubilização de fósforo e produção de enzimas extracelulares (Lipases, Proteases, Celulases e Pectinases) estão representados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados relativos à solubilização de fósforo e produção de enzimas extracelulares (Lipases, Proteases, Celulases e Pectinases)

Isolado	ISP (n=3)	Enzimas extracelulares			
		Lipases	Proteases	Celulases	Pectinases
1: <i>Burkholderia contaminans</i>	3,76±0,51	+	+	-	+
2: <i>Lelliotta amnigena</i>	1,06±0,08	-	-	-	+
3: <i>Cupriavidus pauculus</i>	1	+	-	+	-
4: <i>Bacillus wiedmanni</i>	1	-	+	+	+

Quando o ISP é igual a 1 – não existe solubilização; quando o $ISP < 2$ - existe um baixo índice de solubilização; quando $2 < ISP < 3$ - médio índice de solubilização, e quando o índice de solubilização ($ISP > 3$) – alto nível de solubilização (Inui, 2009). O isolado 1 possui um alto nível de solubilização de P ($ISP > 3$), o isolado 2 possui um baixo nível de solubilização de P ($ISP < 2$) e os isolados 3 e 4 não possuem a capacidade de solubilizar P ($ISP=1$).

Na Figura 14 é possível observar o halo formado pela bactéria *B. contaminans* (Iso1).

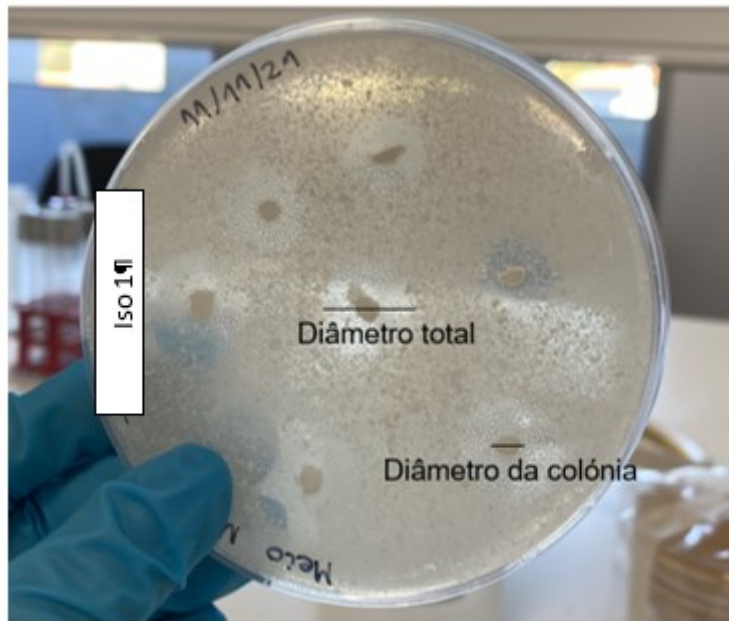


Figura 14. Solubilização de P pela bactéria *B. contaminans* (Iso 1).

Relativamente à produção de enzimas extracelulares (Tab. 8), os isolados 1 e 4 produziram 3 das 4 enzimas testadas. No caso do isolado 1, este foi positivo para a produção de lipases, proteases e pectinases. O isolado 4 foi positivo para a produção de proteases, celulases e pectinases. O isolado 3 foi positivo para a produção lipases e celulases. Já o isolado 2 apenas foi positivo para a produção de pectinases.

Na Figura 15 é possível observar alguns exemplos dos resultados para a produção das enzimas em estudo.

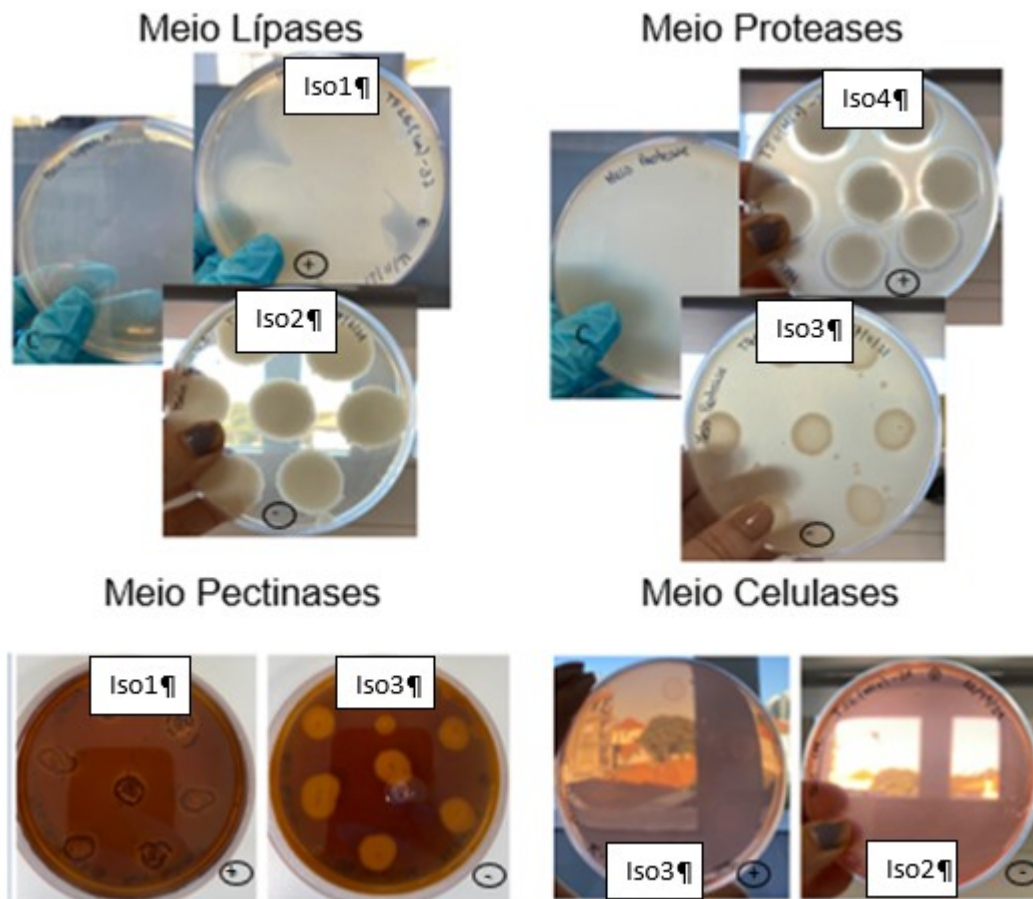


Figura 15. Exemplos da produção das enzimas extracelulares. Lipases: Positivo – halo com precipitados; Proteases: Positivo - halo translúcido; Pectinases: Positivo - halo translúcido; Celulases: Positivo - halo branco

3.3.2. Produção de NH₃, Sideróforos, IAA e ACC

A capacidade de as bactérias produzirem NH₃, Sideróforos, IAA e ACC encontram-se sumariada na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados relativos à Produção de NH₃, Sideróforos, IAA e ACC

Isolados	NH ₃	Sideróforos	IAA (µg/mL) (n=3)	ACC (nmoles/peso seco/h) (n=3)
1: <i>Burkholderia</i> <i>Contaminans</i>	-	+	102,5±11,02	1,82±0,31
2: <i>Lelliotta</i> <i>amnigena</i>	++	-	71,93±10,22	0,27±0,10
3: <i>Cupriavidus</i> <i>pauculus</i>	+	-	119,7±15,5	2,15±0,15
4: <i>Bacillus</i> <i>wiedmanni</i>	++	-	33,39±6,38	0,08±0,02

(-) sem produção; (+) com produção ; (++) com boa produção.

Relativamente à produção de NH₃, apenas os isolados 2, 3 e 4 foram positivos (Tab. 9; Fig.16). Todos os isolados estudados foram positivos para a produção de IAA (Tab. 9), tendo os valores de IAA variado entre 33,39 a 119,7 (µg/mL). Os isolados que produziram uma maior concentração de IAA foram os isolados 1 e 3. A atividade da ACC deaminase foi detetada em todos os isolados estudados, variando entre 0,08 a 2,15 (nmoles/peso seco/h). O isolado que registou a maior atividade foi o isolado 3, seguido pelo isolado 1.

O único isolado positivo para a produção de sideróforos foi o isolado 1 (Tab.9, Fig. 17).

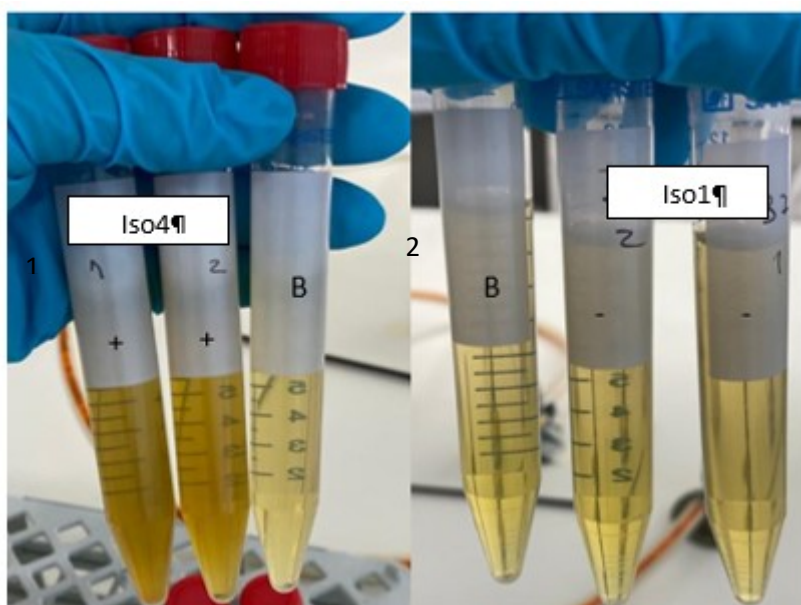


Figura 16. Exemplos de resultados de produção de NH₃. B, Branco; +, Positivo; -, Negativo.

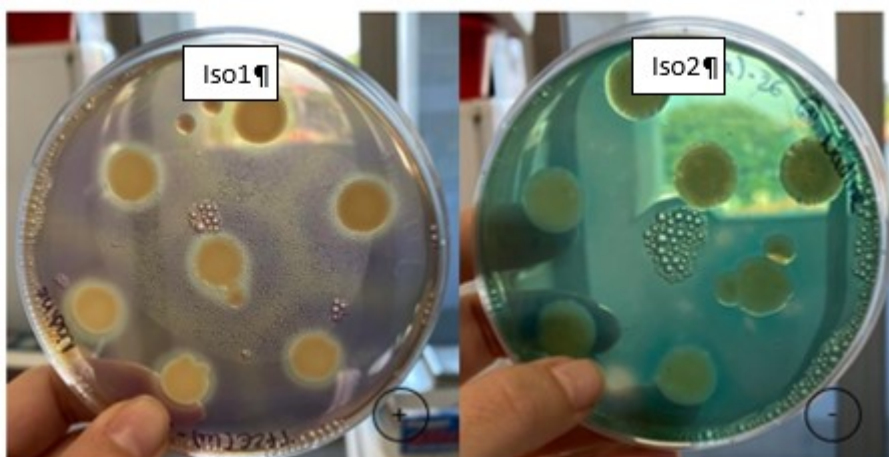


Figura 17. Exemplos de resultados dos Sideróforos. +, positivo (mudança de cor do meio); -, negativo.

3.4. Resultados do ensaio experimental em estufa

3.4.1. Quantidade de água utilizada

A rega das plantas foi efetuada de forma que fosse mantida a h adequada do solo. A quantidade de água total utilizada para a rega no final de 20 semanas foi semelhante para todos os tratamentos (Tab.10). Os valores variaram entre 16900 e 17380 mL de água. O tratamento em que foi necessário uma maior quantidade de água foi o H, e o que necessitou menos foi o M.

Tabela 10. Média da quantidade de água utilizada para rega durante toda a experiência.

Tratamentos	Quantidade de água utilizada na rega (mL)
C1	17000
C2	17000
V	17000
H	17380
HM	17280
VH	17280
HVM	17280
M	16900

3.4.2. Alongamento e número de rebentos

Os valores do número de rebentos e do alongamento do caule no final do ensaio experimental estão apresentados nas Fig.18 e Fig.19, respetivamente.

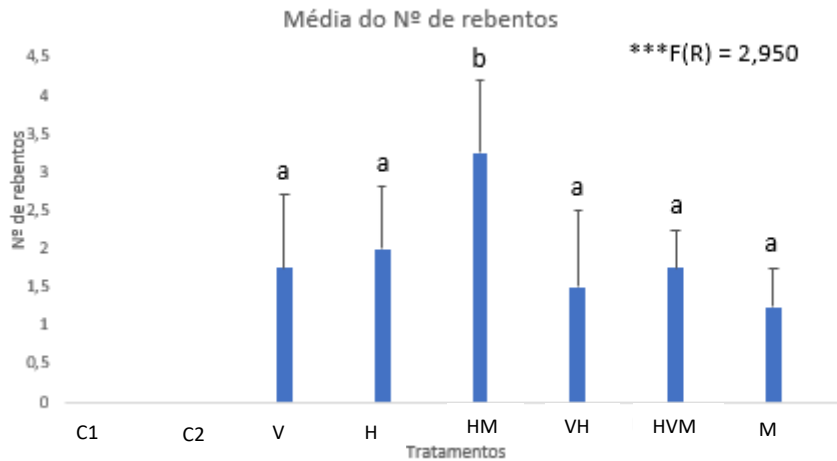


Figura 18. Número de rebentos em cada tratamento no fim do ensaio experimental. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos (C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) no parâmetro número de rebentos. Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significativo $P < 0,05$. Para o número de rebentos os valores da ANOVA unidirecional é $***F(F) = 2,950$, os resultados são apresentados como NS - Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$.

Relativamente ao número de rebentos, os valores variaram entre 0 e 3 rebentos, sendo o tratamento que obteve o maior número de rebentos o HM e o que obteve menos foi o C2. Os valores do alongamento do caule variaram entre 11,35 e 54,325 cm. De acordo com os resultados obtidos o tratamento onde houve maior alongamento foi o HVM e o que obteve menor alongamento foi o V.

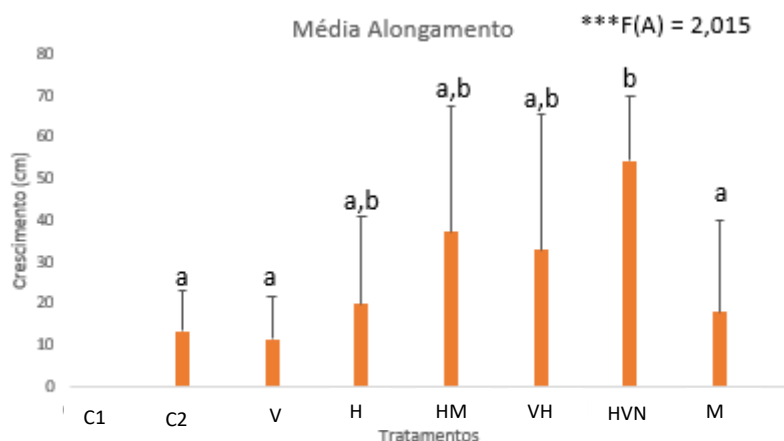


Figura 19. Alongamento das plantas em cada tratamento no fim do ensaio experimental. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos (C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) no parâmetro alongamento das plantas. Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significativo $P < 0,05$. Para o número de rebentos os valores da ANOVA unidirecional é $***F(F) = 2,015$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$.

3.4.3. pH e Condutividade do solo

Os resultados da condutividade e pH do solo de todos os tratamentos testados no ensaio experimental estão representados na Tabela 11.

Tabela 11. Condutividade e pH do solo de todos os tratamentos testados no ensaio experimental.

Tratamento	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH H_2O	pH KCl
C1	$28,50 \pm 7,78^a$	$4,85 \pm 0,02^a$	$4,36 \pm 0,06^a$
C2	$34 \pm 13,34^a$	$4,82 \pm 0,06^a$	$4,76 \pm 0,07^b$
H	$122,50 \pm 31,38^b$	$4,99 \pm 0,22^b$	$4,95 \pm 0,11^c$
V	$300,75 \pm 117,58^c$	$6,85 \pm 0,10^c$	$6,11 \pm 0,11^d$
VH	$316,50 \pm 109,78^c$	$6,93 \pm 0,04^c$	$6,10 \pm 0,25^d$
M	$106,75 \pm 23,10^b$	$4,84 \pm 0,33^a$	$4,41 \pm 0,11^a$
HM	$171,75 \pm 48,34^b$	$4,97 \pm 0,14^b$	$4,8 \pm 0,13^{b,c}$
HVM	$347,25 \pm 99,94^c$	$7,11 \pm 0,04^c$	$5,79 \pm 0,19^e$

***F = 38,700

***F = 271,648

***F = 125,676

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos (C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) nos parâmetros estudados (Condutividade, pH). Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significante $P < 0,005$. Para a Condutividade e o pH os valores da ANOVA unidirecional é $***F(C) = 38,700$, $***F(\text{pH H}_2\text{O}) = 271,648$, $***F(\text{pH KCl}) = 125,676$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$.

Relativamente aos valores do pH estes variam entre 4,36 e 7,11 sendo os tratamentos com composto orgânico os que obtiveram um pH mais alto. Os resultados da condutividade variaram entre 28,50 e 347,25 $\mu\text{S/cm}$. Os resultados obtidos sugerem que os tratamentos com composto orgânico têm uma condutividade do solo mais alta; a adição do hidrogel e mix também aumentou ligeiramente a condutividade do solo.

3.4.4. Viabilidade da bactéria inoculada no Mix com/sem Hidrogel

A viabilidade da bactéria inoculada no ensaio experimental foi testada durante 20 semanas (Fig. 26). A cultura bacteriana em meio TSB utilizada para a Mix sem hidrogel (A+B) manteve-se viva durante 19 semanas, sendo a última contagem de $1,0 \times 10^2$ UFC/g. Relativamente às culturas bacterianas em meio TSB utilizadas para a Mix com hidrogel, 4 delas mantiveram-se viáveis 8 semanas e as outras 4 mantiveram-se viáveis até ao final das 20 semanas, sendo as últimas contagens com os seguintes valores: $2,20 \times 10^5$, $1,67 \times 10^4$, $2,60 \times 10^3$, $9,0 \times 10^4$ UFC/g.

Tabela 12. UFC/g sobre a viabilidade da bactéria inoculada no ensaio experimental testado durante 20 semanas. As amostras testadas foram: A+B- Bactéria utilizada para a Mix sem hidrogel e com água; H+B1, H+B2, H+B3, H+B4, H+B5, H+B6, H+B7, H+B8- Bactéria utilizada para a Mix com hidrogel, legendada com números do 1 até ao 8, pois foram 8 vasos inoculados com a Mix com hidrogel e as amostras retiradas destes.

Semanas	Contagem bacteriana (UFC/g)								
	A+B	HB1	HB2	HB3	HB4	HB5	HB6	HB7	HB8
1	6,25E+06	2,00E+06	2,30E+06	2,60E+06	2,60E+06	2,40E+06	2,60E+06	1,80E+06	3,20E+06
2	3,50E+06	9,00E+05	1,80E+06	1,30E+06	1,10E+06	8,00E+05	2,30E+06	1,10E+06	2,20E+06
3	3,00E+06	5,00E+05	7,00E+05	6,00E+05	5,00E+05	6,00E+05	1,60E+06	8,00E+05	2,00E+06
4	1,00E+06	2,80E+05	5,00E+05	7,00E+05	3,40E+05	5,20E+05	1,10E+06	6,70E+05	5,30E+05
5	1,10E+06	5,00E+05	4,30E+05	4,00E+05	3,10E+05	4,50E+05	1,30E+06	7,00E+05	5,00E+05
6	6,00E+05	2,50E+05	4,00E+04	8,00E+05	2,00E+05	3,50E+04	3,80E+04	7,20E+05	1,70E+05
7	5,00E+05	8,00E+04	2,80E+04	2,00E+05	1,90E+04	7,00E+03	1,80E+04	2,50E+05	1,50E+05
8	4,50E+05	4,00E+05	0	2,70E+05	0	0	0	2,20E+05	1,10E+05
9	1,00E+05	5,30E+05	0	2,30E+05	0	0	0	5,10E+05	7,00E+05
10	2,00E+04	9,00E+05	0	1,50E+05	0	0	0	3,00E+05	6,30E+05
11	2,00E+04	8,00E+05	0	1,50E+05	0	0	0	5,60E+05	3,00E+05
12	1,80E+04	1,00E+05	0	1,00E+05	0	0	0	1,60E+05	2,63E+05
13	1,60E+04	5,00E+05	0	5,40E+05	0	0	0	2,30E+05	3,00E+05
14	8,70E+03	6,40E+05	0	8,00E+05	0	0	0	2,30E+05	2,50E+05
15	3,50E+03	1,12E+06	0	7,10E+05	0	0	0	1,90E+05	2,30E+05
16	5,80E+02	6,30E+05	0	1,00E+05	0	0	0	8,00E+04	2,10E+05
17	2,00E+02	1,80E+05	0	1,98E+05	0	0	0	2,54E+04	1,50E+05
18	3,00E+02	1,70E+05	0	1,98E+05	0	0	0	1,55E+04	1,00E+05
19	1,00E+02	3,00E+05	0	9,90E+04	0	0	0	1,00E+04	1,10E+05
20	0	2,20E+05	0	1,67E+04	0	0	0	2,60E+03	9,00E+04

3.4.5. Atividade enzimática do solo

Relativamente à atividade enzimática do solo dos tratamentos testados no ensaio experimental os resultados encontram-se na Figura 20.

A atividade enzimática da fosfatase (Fig. 20a) foi registada em todos os tratamentos testados; os valores variam entre 26,93 e 123,38 ($\mu\text{g p-nitrophenol/g solo fresco/hora}$). Os tratamentos em que os picos de atividade se destacaram foram os que continham corretivo orgânico, principalmente o V. A atividade da enzima desidrogenase (Fig. 20b), registou valores entre 0,62 e 70,31 ($\mu\text{g TPF/g solo fresco/dia}$). Os picos de atividade significativos da desidrogenase foram nos tratamentos que contém o composto orgânico, sendo o maior pico de atividade no tratamento VH. A atividade FDA (Fig. 20c) foi registada em todos os tratamentos testados; os valores variam entre 1,38 e 4,90 ($\mu\text{g Fluoresceína/g solo fresco / hora}$). Nos tratamentos que contém composto orgânico e/ou a mix o pico de atividade do FDA foi mais elevado que nos outros tratamentos. No tratamento HVM houve o maior pico da atividade da enzima. A atividade da urease (Fig. 20d) foi registada em todos os tratamentos testados exceto no tratamento H. Os valores variaram entre 0 e 28,38 ($\mu\text{g NH}_3/\text{g/ hora}$). No tratamento HM houve a maior atividade da enzima.

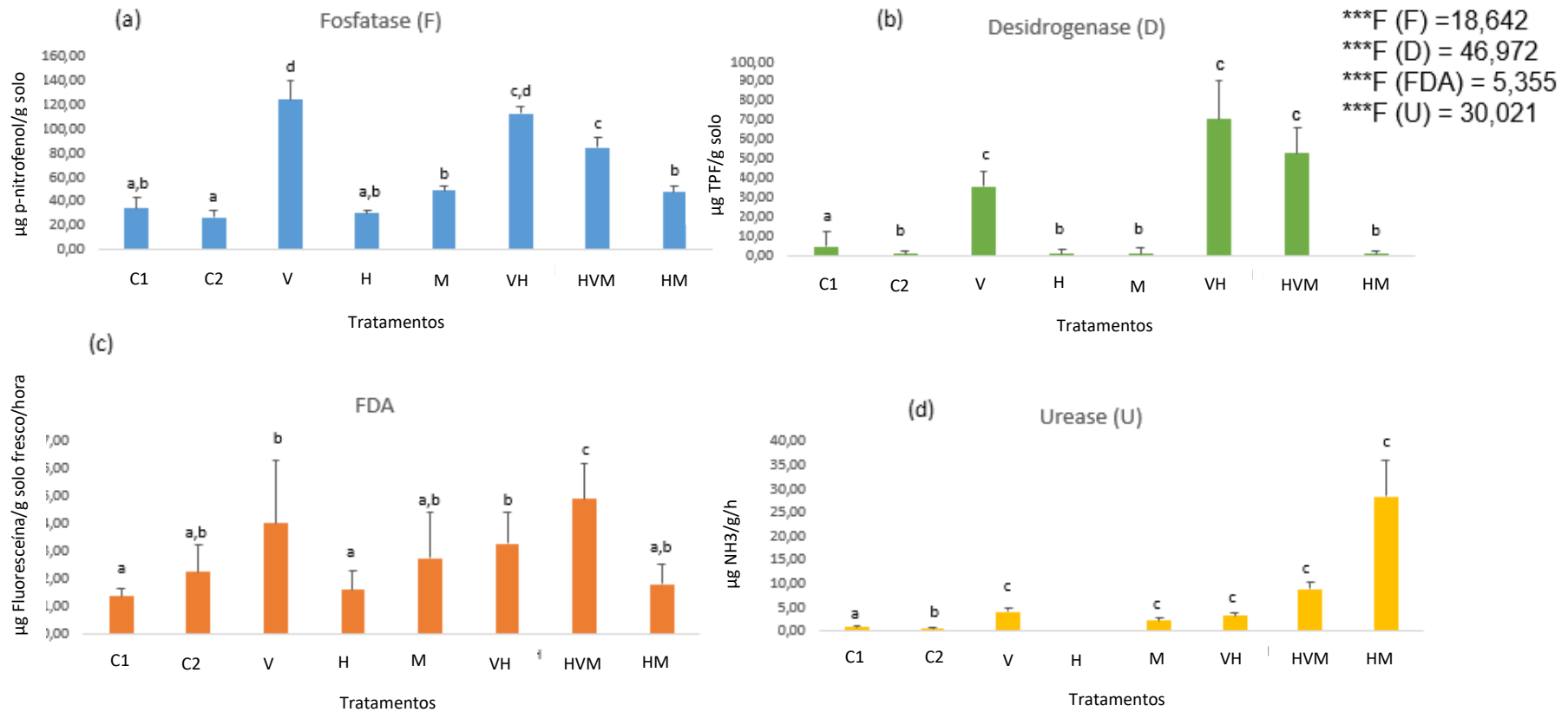


Figura 20. Atividade enzimática do solo. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos (C1 – Controle; C2 – Controle com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) nos parâmetros estudados (Desidrogenase, Fosfatase, FDA, Urease). Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significante $P < 0,05$. Para a Desidrogenase, Fosfatase, FDA, Urease do solo os valores da ANOVA unidirecional são $***F(F) = 18,642$, $***F(D) = 46,972$, $***F(FDA) = 5,355$, $***F(U) = 30,021$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$.

3.4.6. Respiração microbiana

Relativamente à respiração microbiana do solo registou-se atividade em todos os tratamentos (Fig.21).

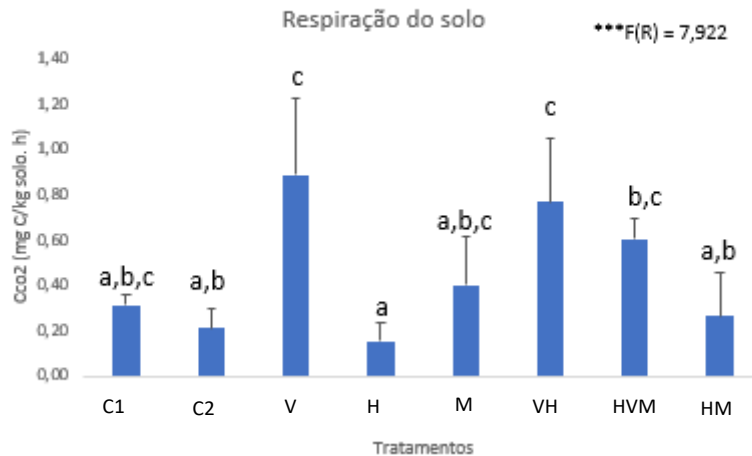


Figura 21. Respiração do solo nos tratamentos testados no ensaio experimental. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos (C1 – Controlo; C2 – Controlo com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) no parâmetro estudado Respiração do solo. Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significante $P < 0,005$. Para a respiração do solo o valor de ANOVA unidirecional é $***F(R) = 7,922$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$.

Os valores variaram entre 0,15 e 0,89 Cco₂ (mg C/kg solo. h). Os tratamentos em que se registou uma maior atividade foram os que contém composto orgânico. No tratamento V registou-se o maior pico de atividade da respiração microbiana.

3.4.7. Concentração de metais biodisponíveis

Na Tabela 13 estão representados os resultados relativos à concentração dos metais Zn, Ni, Fe, Mg, Ca, Cu e Na biodisponíveis em cada tratamento testado neste ensaio experimental. Relativamente ao Zn os resultados mostram que a concentração encontrada é muito baixa entre 0 e 0,151 (mg/Kg) e que não existem diferenças significativas entre os tratamentos testados ($p < 0,05$). Os valores de Ni variam entre 0 e 0,011 (mg/Kg) e também não se verificaram diferenças significativas entre os tratamentos testados ($p < 0,05$). Os valores de Fe foram nulos para todos os tratamentos testados. Os valores de Mg variam entre 3,096 e 20,325 (mg/Kg), o tratamento com maior concentração foi o V, e o com menor concentração foi o M. Os valores de Ca variam entre 9,943 e 276,34 (mg/Kg), o tratamento com maior concentração foi o V, e o com menor concentração foi o H. Os valores de Cu variam entre 1,39 e 4,19 (mg/Kg), o tratamento com maior concentração foi o M, e o com menor

concentração foi o HVM. Os valores de Na variam entre 1,93 e 15,99 (mg/Kg), o tratamento com maior concentração foi o V, e o com menor concentração foi o C1.

Tabela 13. Concentração dos metais (Zn, Ni, Fe, Mg, Ca, Cu e Na) nos tratamentos testados no ensaio experimental.

Tratamentos	Metais mg/kg						
	Zn	Ni	Fe	Mg	Ca	Cu	Na
C1	0,151±0,110 ^a	0,009±0,002 ^a	0	3,389±0,709 ^a	12,079±2,868 ^a	4,034±0,309 ^a	1,930±0,634 ^a
C2	0,063±0,098 ^a	0,011±0,001 ^a	0	3,137±0,393 ^a	10,739±1,620 ^a	4,100±0,069 ^a	2,129±1,063 ^a
H	0,014±0,019 ^a	0,008±0,001 ^a	0	3,17±0,246 ^a	9,943±1,238 ^a	3,529±0,368 ^b	2,426±0,389 ^a
V	0 ^a	0,001±0,003 ^a	0	20,325±4,23 ^b	276,336±64,327 ^b	1,567±0,077 ^c	15,999±2,089 ^b
VH	0,003±0,006 ^a	0 ^a	0	16,229±3,565 ^c	257,259±62,833 ^b	1,447±0,141 ^c	10,070±4,414 ^c
M	0 ^a	0,008±0,002 ^a	0	3,096±0,299 ^a	10,230±1,025 ^a	4,195±0,067 ^a	10,362±3,04 ^c
HM	0 ^a	0,010±0,001 ^a	0	3,597±0,342 ^a	11,320±1,650 ^a	3,444±0,314 ^b	9,486±4,113 ^c
HVM	0 ^a	0 ^a	0	16,433±1,877 ^{b,c}	260,880±38,243 ^b	1,399±0,113 ^c	14,964±2,657 ^{b,c}
	***F= 2,473	***F =2,646		***F =153,853	***F =397,771	***F =147,179	***F = 24,048

Resultados da concentração dos metais (Zn, Ni, Fe, Mg, Ca, Cu e Na) nos tratamentos testados no ensaio experimental. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=4). Foi utilizado o método estatístico Anova - um fator para determinar a influência dos tratamentos (C1 – Controle; C2 – Controle com planta; H – Planta com Hidrogel; V – Planta com composto orgânico; VH – Planta com Hidrogel e composto orgânico; M – Planta com Mix; HM - Planta com Hidrogel e Mix; HVM – Planta com Hidrogel, Composto orgânico e Mix) no parâmetro concentração dos metais (Zn, Ni, Fe, Mg, Ca, Cu e Na). Em cada coluna as letras diferentes significam agrupamentos de grupos significativamente diferentes uns dos outros de acordo com o teste de Duncan, com NS - não significante $P < 0,005$. Para a concentração dos metais (Zn, Ni, Fe, Mg, Ca, Cu e Na) o valor de ANOVA unidirecional é $***F(\text{Zn}) = 7,922$, $***F(\text{Ni}) = 2,646$, $***F(\text{Mg}) = 153,853$, $***F(\text{Ca}) = 397,771$, $***F(\text{Cu}) = 147,179$, $***F(\text{Na}) = 24,048$, os resultados são apresentados como NS- Não significativo no nível $P > 0,05$; significativo ao nível $P < 0,05$.

5. Discussão

5.1. Seleção da estirpe a utilizar no ensaio experimental

Devido à problemática da degradação do solo por todo o mundo, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal é uma estratégia que tem ganho destaque por uma estratégia amiga do ambiente utilizada para a fitorremediação dos solos, favorecendo o desenvolvimento e a produtividade das culturas. As bactérias promotoras de crescimento vegetal possuem a capacidade de produzir substâncias que promovem o crescimento das plantas. As estirpes bacterianas isoladas neste trabalho foram testadas a fim de verificar qual dos isolados se encaixava melhor nesta categoria de bactérias. A produção de fósforo (P) foi testada, já que este é um nutriente crucial para as plantas e bactérias. Certas BPCV são capazes de solubilizar o fosfato insolúvel o que permite a sua absorção pelas plantas. Neste ensaio, as bactérias que foram incapazes de solubilizar o precipitado de fosfato de cálcio não conseguiram crescer, e as bactérias que têm essa capacidade cresceram e desenvolveram halos claros (translúcidos) ao redor da colônia (Handy et al, 2021).

As enzimas extracelulares desempenham um papel importante na decomposição do material orgânico, devido ao caráter insolúvel e macromolecular da maioria dos componentes orgânicos. Portanto, as enzimas são parte integral da ciclagem de nutrientes, influenciando diretamente a fertilidade dos solos, sendo que a maior parte das enzimas no solo tem origem microbiana (Ramos et al. 2018). Neste estudo, avaliou-se a produção de 4 enzimas extracelulares hidrolíticas microbianas, destacando-se os isolados 1 e 4, ambos produzindo 3 das 4 enzimas testadas (Tab.8).

A avaliação da tolerância das estirpes a metais também é um parâmetro importante, pois o isolado escolhido seria inoculado num solo contaminado com metais, e é essencial que este consiga sobreviver nessas condições. Dos 4 isolados estudados, a estirpe com maior tolerância aos metais testados foi o isolado 1, apenas não sendo tolerante à maior concentração de cobre testada. Os isolados 3 e 2 também têm a capacidade de tolerar metais, e apenas não sobreviveram à maior concentração de cobre e zinco (Tab.7).

O azoto (N) é comumente considerado o nutriente mais limitante para o desenvolvimento vegetal. Em muitos solos, a produção das culturas é severamente limitada pela deficiência de N, o que os torna dependentes da aplicação de adubos nitrogenados sintéticos. A produção de amônia pelas BPCV é uma característica importante para a promoção do crescimento das plantas. pois, foi demonstrado que o amoníaco produzido pelas BPCV fornece azoto às plantas hospedeiras e, assim, promove o alongamento das raízes e dos rebentos e a sua biomassa (Bhattacharyya et al., 2020). Dos 4 isolados estudados, 3 obtiveram resultados positivos para a produção de amônia, apenas o isolado 1 não produz amônia.

O IAA é uma auxina que promove o crescimento das plantas e aumenta a resistência às condições de stress. Essa fito-hormona pode influenciar positivamente o desenvolvimento de plantas, já que é capaz de tornar a absorção de nutrientes mais eficientes. Algumas bactérias possuem a capacidade

de produzir IAA auxiliando assim as plantas (Glick, 2012). Os isolados que produziram uma maior concentração de IAA foram o isolado 1 e o isolado 3 (Tab.9).

A hormona vegetal etileno está envolvida na resposta das plantas ao stress, a molécula precursora do etileno, ACC, pode ser usada como fonte de azoto pelas BPCV, e com isso a bactéria limita a quantidade de etileno produzido (Handy et al, 2021). Os isolados que produziram uma maior concentração de ACC foram os isolados 1 e 3 (Tab. 9).

Os microrganismos e as plantas necessitam de um alto nível de ferro. A competição pelo ferro na rizosfera é problemática onde plantas, bactérias e fungos competem pelo ferro. Os sideróforos produzidos pelas BPCV podem ajudar as plantas nessa captação de ferro, para além de poderem impedir que alguns fitopatogénicos adquiram o ferro necessário para proliferar (Glick, 2012). A única estirpe que produziu sideróforos foi o isolado 1 (Tab. 9). Existem na literatura artigos onde se estudaram isolados com o objetivo de conhecer se possuem características das BPCV. Por exemplo, o estudo sobre *Bacillus cereus* onde várias estirpes ambientalmente seguras foram estudadas em condições de estufa e campo e mostraram muitas características significativas, incluindo produção de IAA e ácido aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) ou solubilização de fosfato, o que permite promoção do crescimento vegetal. Além disso, estirpes de *B. cereus* produziram enzimas extracelulares o que permite a estimulação indireta do crescimento da planta. No que diz respeito ao controle biológico, essas BPCV podem suprimir o desenvolvimento de fitopatogénicos (Kulkova, et al., 2023).

Temos o exemplo do trabalho onde foi feita a caracterização de bactérias nativas (localizadas em zonas contaminadas pela drenagem ácida de minas) promotoras do crescimento de plantas resistentes a metais pesados (BPCV) e os seus efeitos no crescimento das plantas, absorção de nutrientes, atividades de enzimas antioxidantes e acumulação de metais. Foram testadas as características promotoras do crescimento vegetal, incluindo 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, ácido indolacético, sideróforos, produção de amónia e solubilização de fosfato, bem como resistência a antibióticos, onde dez isolados com atividades relativamente altas de características promotoras do crescimento vegetal foram identificados como pertencentes aos géneros *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* e *Ralstonia* (Wu et al., 2019).

Também existem vários artigos que confirmam que as BPCV ajudam as plantas a sobreviver e a fazer a fitorremediação dos solos contaminados. Como o exemplo do estudo onde foi testado o potencial de fitorremediação de *Vigna radiata* na presença de BPCV de solos contaminados com metais (Pb, Ni e Cr). Os resultados revelaram um efeito estimulador por parte das BPCV no crescimento e capacidade de fitoextração da planta, ou seja, o estudo concluiu o papel benéfico do BPCV para a fitorremediação bem sucedida de metais (Zulfiqar et al, 2022).

Um estudo testou a fitorremediação de resíduos de minas com *Ricinus communis* inoculados com BPCV. Os resultados revelaram que as BPCV ajudam a reduzir o stress nas plantas gerado pelos metais e aumenta a sua atividade enzimática, podendo ser utilizadas como bioinoculantes para favorecer os processos de fitorremediação (Mendoza-Hernández, et al., 2023).

A escolha da estirpe para o desenvolvimento do ensaio experimental teve em consideração a avaliação da capacidade dos isolados de produzir substâncias que promovem o crescimento das

plantas, do estudo bibliográfico da espécie de cada isolado e da tolerância dos isolados a metais. O isolado escolhido foi o isolado 1 (*C. pauculus*).

5.2. Ensaio experimental em estufa

A quantidade de água utilizada para a rega foi bastante semelhante para todos os tratamentos (Tab.10), mas seria de esperar que os tratamentos com hidrogel consumissem uma menor quantidade de água que os restantes devido ao seu poder de reter uma grande quantidade de água e libertando-a aos poucos, aumentando a disponibilidade de água e de nutrientes para as plantas (Freitas et al, 2019). Nesta experiência essa diminuição do consumo de água não foi verificada. Isso pode dever-se à quantidade de hidrogel adicionado (2g/L de substrato). Existe um estudo que pretendeu avaliar a utilização de diferentes dosagens de hidrogel no armazenamento de água no solo destacando-se as vantagens e desvantagens de cada dosagem. Utilizaram-se três diferentes dosagens do hidrogel (4, 8 e 12 g por vaso com 8 kg de solo) permitindo analisar a eficiência do produto em função da disponibilidade de água. O hidrogel utilizado foi um co-polímero de poliácido de potássio. A dose de 4 g por vaso foi considerada a dose técnica viável devido à sua eficiência em armazenar água no solo. A maior dosagem (12 g por vaso) causou "inchaço" do solo acarretando em perda do produto, solo e possível estrangulamento radicular (Mendonça et al., 2013).

Relativamente à viabilidade da bactéria inoculada no ensaio experimental está foi testada durante 20 semanas (Tab.13). A cultura bacteriana em meio TSB utilizada para a Mix sem hidrogel (A+B) manteve-se viva durante 19 semanas. Relativamente às culturas bacterianas em meio TSB utilizadas para a Mix com hidrogel, apenas 50% das culturas se mantiveram viáveis até as 20 semanas.

Na literatura existem artigos que relatam que o ambiente aquoso dos hidrogéis e a sua porosidade fornecem uma interface favorável para interação e adesão bacteriana. A adesão bacteriana em superfícies de hidrogel é um processo complexo governado por múltiplos fatores, incluindo rigidez do hidrogel, porosidade, espessura, rugosidade superficial, e motilidade bacteriana. A rigidez do hidrogel é a propriedade mais amplamente estudada, mas não há consenso sobre a correlação entre a rigidez do hidrogel e a adesão e crescimento bacteriano. É importante observar que o processo de adesão bacteriana em hidrogéis não é universalmente aplicável para todas as espécies/cepas bacterianas, uma vez que cada bactéria possui características celulares únicas (Dsouza et al., 2022).

5.2.1. Avaliação do desenvolvimento da planta

Analisando os resultados obtidos sobre o número de rebentos e os valores do alongamento do caule de todos os tratamentos testados, podemos observar que, sem o auxílio do hidrogel, composto orgânico (vermicomposto) ou mix, o número de novos rebentos foi baixo, e o alongamento do caule também foi pequeno (Fig.18 e Fig. 20). Esse facto comprova que a adição de hidrogel, vermicomposto e inóculo microbiano (Mix) ajudaram no desenvolvimento e crescimento da planta. O tratamento que obteve o maior número de rebentos foi o HM (3 rebentos) e o tratamento onde houve maior alongamento foi o HVM (54,33cm).

Estudos comprovam que ambos os organismos (mix - bactéria + fungo) promovem o crescimento das plantas através da melhoria da nutrição das plantas e da inibição de patógenos fúngicos das plantas (Emmanuel & Babalola, 2020). Um estudo pretendeu estudar o efeito de uma BPCV nativa e dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em combinação na produtividade do trigo. Um total de três bactérias nativas e cinco não-nativas foram usadas com e sem FMA numa experiência em vaso aberto com duas variedades de trigo para avaliar seu efeito na produtividade do trigo, na absorção de nutrientes e nos parâmetros de saúde do solo. Plantas de trigo submetidas ao tratamento com uma BPCV nativa (*Bacillus subtilis*) e FMA deram os melhores resultados com referência ao teor de macronutrientes (nitrogénio e fósforo), micronutrientes (ferro e zinco) em grãos de trigo e parâmetros relacionados ao rendimento como o número de grãos por espiga (Yadav et al., 2020.)

Outro estudo encontrado teve como objetivo avaliar o efeito do corretivo orgânico (vermicomposto) e da adição de FMA na fitorremediação de solos contaminados com cobre. As plantas utilizadas foram de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e foram inoculadas com o FMA *Rhizophagus clarus*. Verificou-se que o uso de vermicomposto aumentou o crescimento das plantas (Rangel, et al., 2023).

Relativamente ao hidrogel, existe um estudo que teve como objetivo determinar como o hidrogel de lignina biodegradável afetou a disponibilidade de água no solo para o milho cultivado em condições de seca. Foi utilizado um hidrogel de lignina nas concentrações de 0,3% e 0,6% (em peso) em vasos submetidos à deficiência ou suficiência hídrica, e comparado ao hidrogel de poliacrilato de sódio que foi aplicado nas mesmas doses. As plantas de milho eram mais altas, tinham maior teor de fósforo e mais biomassa quando cultivadas em solo com hidrogel de lignina e hidrogel de poliacrilato de sódio do que sem hidrogel (Mazloom et al., 2020).

5.2.2. Avaliação do pH e da condutividade

Neste trabalho foram avaliados o pH e a condutividade do solo de todos os tratamentos testados. No solo, a disponibilidade de nutrientes está relacionada com a concentração de iões de hidrogénio, que é a medida do pH do solo. A variação do pH no ambiente tem impacto direto na disponibilidade de nutrientes e no crescimento das plantas. A faixa de pH entre 5,5-6,5 é a ideal para o crescimento das plantas pois a disponibilidade de nutrientes é a ideal. O “solo” da escombreira utilizado nesta experiência pode ser classificado como fortemente ácido e analisando o pH do solo de todos os tratamentos testados, verificou-se que apenas a adição de composto orgânico conseguiu aumentar bastante o pH (Tab.11). Na literatura existem estudos que comprovam que a adição de compostos orgânicos corrige o pH do solo de minas, como o estudo que teve como objetivo determinar os efeitos a médio prazo de correções orgânicas nas propriedades físicas do solo e na resposta hidrológica do solo, a conclusão deste estudo afirma que o uso de corretivos orgânicos deve ser incentivado na recuperação de solos de minas e deve ser fortemente recomendado por seus comprovados benefícios ambientais (aumento da estrutura e infiltração do solo e redução das perdas de solo) (Luna, et al., 2017). Outro estudo foi para avaliar os efeitos de corretivos orgânicos na estabilização de metais e o potencial de *Brassica juncea* L. para fitoestabilização em solos de minas, em que os resultados mostraram adição de estrume pode ser eficaz para a estabilização de metais e para aumentar a capacidade de fitoestabilização de *B. juncea* em solos de minas, que tal como no meu

ensaio experimental, o pH aumentou após a adição do corretivo orgânico (Esteban, et al., 2014). A condutividade elétrica (CE) é a medida da capacidade do solo de conduzir corrente elétrica e é o método mais comum para a avaliação *in situ* da salinidade do solo (que nos indica a quantidade de sais no solo), também avalia indiretamente a disponibilidade de nutrientes no solo (CE muito baixo – baixa disponibilidade de nutrientes; CE muito alto – excesso de nutrientes) (Friedmann, 2005). A condutividade elétrica do solo é influenciada por propriedades físico-químicas (sais solúveis), teor em argila e mineralogia, teor de água no solo, densidade do solo, matéria orgânica, e temperatura do solo (Corwin & Lesch, 2005). A condutividade do “solo” foi testada para todos os tratamentos estudados e os resultados obtidos sugerem que a adição do composto orgânico aumentou bastante a condutividade do solo; a adição do hidrogel e mix também aumentou ligeiramente a condutividade do solo. Todos os tratamentos encaixam na classificação de um solo não salino (NRSC, 2017). Alguns tratamentos como o C1 e o C2 têm uma EC muito baixa o que também indica baixa disponibilidade de nutrientes. Um estudo examinou o efeito da adição de 15 compostos orgânicos (estrume de galinha, porco, cavalo, gado e codorna, lodo de esgoto 1 e 2, serragem de eucalipto, substrato vegetal, fibra de coco, casca de pinus, casca de café, turfa, composto de cal e biochar) em solos, no seu pH e condutividade. O uso de alguns adubos e composto aumentou o pH para níveis acima daqueles considerados adequados para o crescimento das plantas. A condutividade do solo também aumentou com a adição dos compostos orgânicos (Carmo et al., 2016). O estudo que pretendeu avaliar a utilização de diferentes dosagens de hidrogel (4, 8 e 12 g por vaso com 8 kg de solo) no armazenamento de água, utilizando hidrogel (co-polímero de poliácido acrílico de potássio), confirmou que todas as doses utilizadas nesse estudo causaram o acréscimo na condutividade elétrica do solo radicular (Mendonça et al., 2013). O aumento da condutividade com a adição do Mix, pode ser devido ao facto de que a inoculação de BPCV e o FMA tenha aumentado a disponibilidade de nutrientes no “solo”, pois está descrito que estas melhoram a qualidade do solo (Yu et al., 2022).

5.2.3. Avaliação da atividade biológica do solo através da análise de produção de enzimas extracelulares

Para avaliar a atividade biológica do “solo” dos diferentes tratamentos desta experiência foram analisadas as suas atividades enzimáticas, nomeadamente da fosfatase, da desidrogenase, da urease e da hidrólise de diacetato de fluoresceína. O fósforo é um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, e a maior parte deste que se encontra no solo está sob a forma de fosfatos inorgânicos, não podendo ser utilizados pelas plantas. Existem diversos microrganismos no solo que são capazes de solubilizar fósforo auxiliando as plantas no seu desenvolvimento. A capacidade de solubilização de fosfatos está relacionada com a capacidade de os microrganismos produzirem ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos extracelulares e pela produção de enzimas fosfatases (Ribas et al., 2016). As fosfatases são enzimas e catalisam a hidrólise de compostos fosfatados orgânicos com a produção de fósforo solúvel, sendo fundamentais nos processos de transformação de compostos de fósforo orgânico e disponibilizando fontes inorgânicas de fósforo para as plantas. A velocidade de mineralização foi positivamente associada ao pH do solo e ao teor de matéria orgânica (Nahas, 2002). A atividade enzimática da fosfatase (Fig. 20a) foi registada em

todos os tratamentos testados, os valores variam entre 26,93 e 123,38 (μg p-nitrophenol/g solo fresco/hora). Os tratamentos em que o pico de atividade se destacou foram os que continham corretivo orgânico, principalmente o V.

As desidrogenases fazem parte dos grupos enzimáticos presentes no solo. Estas enzimas são de relevante importância pois ocorrem em todas as células vivas dos microrganismos, pois estão ligadas aos processos redox microbiológicos. A atividade da desidrogenase reflete a capacidade metabólica do solo e a sua atividade é considerada proporcional à biomassa dos microrganismos no solo (Kaczyńska et al., 2015). Vários fatores ambientais podem afetar a atividade da desidrogenase no solo, tais como a humidade do solo, disponibilidade de oxigénio, potencial oxidação-redução, pH, teor em matéria orgânica, temperatura, contaminação por metais, fertilização do solo ou uso de pesticidas. Relativamente à contaminação do solo com metais esta inibe a atividade da desidrogenase. O pH ideal para a atividade da desidrogenase é entre 5,5-5,73. A utilização de corretivos orgânicos aumenta a atividade da desidrogenase (Wolińska & Stępniewska, 2012). A atividade da enzima desidrogenase neste trabalho (Fig.20b), registou valores entre 0,62 e 70,31 (μg TPF/g solo fresco/dia). Os picos de atividade significativos da desidrogenase foram nos tratamentos que contém o composto orgânico, sendo o maior pico de atividade no tratamento VH.

A urease é uma enzima extracelular produzida por vários microrganismos (como bactérias e fungos), esta enzima catalisa a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amónia (Lanna, et al, 2010). A análise da atividade de urease no solo pode fornecer uma indicação do potencial do solo em converter N orgânico em mineral, dando início ao processo de mineralização do N (Cordero, et al., 2019). A amónia, o principal produto da hidrólise da urease, pode ter vários destinos, de acordo com as condições ambientais, sendo o N possível de ser imobilizado pelos microrganismos, absorvido pelos vegetais, adsorvido pelos minerais de argila, além de ser oxidado a nitrato, iniciando assim o processo de nitrificação (Lanna et al., 2010.) A sua atividade é aparentemente ótima em pH 8,5 a 9,0. (Lanna et al., 2010.) A enzima urease está negativamente relacionada com o pH. A grande variação na atividade da urease é causada pela matéria orgânica. A atividade é maior em solos vegetados do que não vegetados (devido à maior atividade microbiana e proliferação na rizosfera (Koçak, 2020). A atividade da urease (Fig. 20d) foi registada em todos os tratamentos testados exceto no tratamento H, os valores variam entre 0 e 28,38 (μg NH_3 / g/ hora). No tratamento HM houve o maior pico da atividade da enzima.

O ensaio de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) mede a atividade enzimática de populações microbianas e pode fornecer uma estimativa da atividade microbiana geral numa amostra ambiental. O ensaio é considerado inespecífico porque é sensível a atividade de várias classes de enzimas, incluindo lipases, esterases e proteases. A atividade dessas enzimas resulta na clivagem hidrolítica do FDA (incolor) em fluoresceína (fluorescente verde-amarelo) (Frilov et al., 2022; Silva et al., 2004). A atividade FDA (Fig. 20c) foi registada em todos os tratamentos testados, os valores variam entre 1,38 e 4,90 (μg Fluoresceína / g solo fresco / hora). Nos tratamentos que contém composto orgânico e/ou a mix o pico de atividade do FDA foi mais elevado que nos outros tratamentos. No tratamento HVM houve o maior pico da atividade da enzima.

Microrganismos como bactérias, fungos e actinomicetes influenciam profundamente as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos. As atividades desses organismos incluem a decomposição de resíduos vegetais e outros materiais orgânicos, e a formação de húmus. Como a maioria das reações biológicas no solo são alterações enzimáticas, a atividade enzimática pode ser considerada um parâmetro importante para caracterizar a atividade biológica do solo (Emmanuel & Babalola, 2020). Os resultados espectáveis seriam que o composto orgânico, o hidrogel e a Mix adicionados aos tratamentos melhorassem a atividade biológica do solo, devido a estudos que o comprovam, como o estudo sobre o efeito do hidrogel à base de palha de arroz nas propriedades bioquímicas do solo. Os resultados obtidos mostram que o hidrogel aumenta a matéria orgânica (MO), melhorando a atividade biológica do solo expressa como contagem total de bactérias, bem como na atividade da desidrogenase e da fosfatase (Saini & Malve, 2022). Ou o estudo que explorou o efeito dos FMA na atividade enzimática do solo por meio de uma metanálise. A inoculação de FMAs aumentou as atividades da maioria das enzimas do solo. Em todas as observações, os FMA melhoraram a atividade enzimática do solo (Qin et al., 2020). Existe também um estudo cujos resultados do estudo indicam que as atividades de urease, desidrogenase do solo na rizosfera de uma planta inoculada foram significativamente maiores do que aquelas no tratamento de controle não inoculado (Tang et al., 2023). Outro estudo foi conduzido para avaliar o impacto de alguns aditivos orgânicos nas atividades enzimáticas de um solo arenoso Calcário. Os corretivos orgânicos incluíram composto de estrume de aves, biomassa de bagaço de cana-de-açúcar e o seu biocarvão. Os resultados indicaram um aumento considerável nas atividades enzimáticas após a adição de corretivos orgânicos ao solo (Nourmandipour et al., 2021.)

Neste ensaio experimental, em geral, nas atividades enzimáticas avaliadas o que contribuiu para a melhoria da atividade biológica foi apenas o composto orgânico. Os motivos para isso ter sucedido podem ser:

- i) Como foi descrito acima a quantidade de hidrogel adicionado pode não ter sido a ideal.
- ii) As interações entre AMF e PGPB na rizosfera podem resultar em efeitos que melhoram o crescimento e a qualidade das plantas, mas já foram relatadas algumas interações antagônicas onde os fungos micorrízicos arbusculares às vezes alteram a comunidade BPCV na rizosfera através da competição por nutrientes (Emmanuel & Babalola, 2020)
- iii) As espécies que podem não ser compatíveis entre si e/ou com a planta hospedeira (Saini & Malve, 2022).

5.2.4. Avaliação da atividade biológica do solo através da análise da respiração do solo

A respiração do solo é um dos mais antigos parâmetros para quantificar a atividade microbiana. A respiração é a medida do dióxido de carbono (CO_2) libertado do solo, resultado de processos metabólicos de todos os microrganismos presentes. Esta representa a oxidação da matéria orgânica por microrganismos aeróbios do solo (Schmitz, 2003). É um importante indicador da saúde do solo, porque mede o nível de atividade microbiana, decomposição da matéria orgânica e também reflete a condição física e química do solo. As taxas de respiração do solo dependem de diversos fatores,

como o conteúdo de MO no solo, temperatura, humidade, salinidade, pH e aeração. A respiração microbiana aumenta à medida que a temperatura aumenta, até um certo ponto 35 a 40 °C. A partir destas temperaturas estas limitam o crescimento da planta, a atividade microbiana e a respiração. A respiração do solo geralmente aumenta à medida que a humidade aumenta; no entanto, o oxigénio é limitado quando os poros do solo estão cheios de água (NRCS, 2014).

Neste ensaio experimental, todos os tratamentos estudados registaram atividade microbiana através do método da respiração microbiana. Os tratamentos em que se registou uma maior atividade foram os que contém composto orgânico. No tratamento V registou-se o maior pico da atividade da respiração microbiana (Fig. 21). Na literatura existe artigos que comprovam que os compostos orgânicos aumentam a respiração do solo, como o estudo em que foi realizado um ensaio de campo para estudar os efeitos do Lodo de Esgoto (LS), Composto de Resíduos Urbanos (RCM) e Vermicomposto (VC) com e sem adubação química, na Respiração Microbiana do Solo (SMR) em solo cultivado com soja. Os resultados ilustraram que a aplicação de corretivos orgânicos aumentou a SMR e o rendimento da soja em comparação com os tratamentos de controlo e fertilizantes químicos (Gilani & Bahmanyar, 2008). A explicação para a respiração microbiana aumentar na presença de composto orgânico, deve dever-se ao facto de o composto orgânico melhorar as características físicas, químicas e biológicas do solo e aumentar o nível de MO no solo (compostos de origem animal/vegetal). Os microrganismos têm uma maior disponibilidade de MO e assim ao efetuar a decomposição de mais MO, a respiração microbiana aumenta.

5.2.5. Avaliação da biodisponibilidade de metal(óide)s no “solo”

Os meta(óide)s desempenham um papel fundamental nos processos vitais dos microrganismos, como é o caso do cálcio, cromo, cobalto, cobre, ferro, magnésio, manganês, níquel, potássio, sódio e zinco, pois estes servem como micronutrientes e são utilizados para processos redox; como componentes de várias enzimas; e para regulação da pressão osmótica. Mas existem outros metal(óide)s (por exemplo, prata, alumínio, cádmio, ouro, chumbo e mercúrio) que não têm papel biológico e não são essenciais e são potencialmente tóxicos para os microrganismos (Olaniran et al., 2013). A presença de metal(óide)s no solo por si só não afeta os seres vivos. Estes elementos necessitam de entrar em contacto com os organismos. Para que isso aconteça, é necessário que os metais estejam numa forma específica, ou seja, para um contaminante ser assimilado este tem de ser móvel, possibilitando desta forma o seu transporte, e tem de estar biodisponível para o organismo (Costa, 2015). A biodisponibilidade é a fração da quantidade total de um contaminante, presente no solo ou em outro compartimento ambiental, que está disponível ou pode ser disponibilizado para ser absorvida por seres vivos (Olaniran et al., 2013; Costa, 2015). A toxicidade dos metais muitas vezes não está diretamente relacionada com a concentração total de metais presentes, pois a toxicidade e a biodisponibilidade dos metais podem ser influenciadas por propriedades físico-químicas do solo, destacando-se o pH, o potencial de oxidação-redução (redox), a matéria orgânica, os óxidos e hidróxidos de ferro e manganês, os minerais de argila e a capacidade de troca catiónica (Bradham et al., 2004; Costa, 2015).

Relativamente a este ensaio experimental foi estudada a concentração dos metais Zn, Fe, Mg, Ca, Cu e Na biodisponíveis em cada tratamento testado (Tab.13), através da técnica ICP-OES. Relativamente ao Zn, Ni e Fe os resultados das concentrações destes metais foi muito baixa ou nula, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. A concentração dos metais Mg, Ca e Na aumentou bastante nos tratamentos em que se adicionou composto orgânico. No caso do metal Ca, a adição da Mix também contribuiu para o aumento da sua concentração. Relativamente ao Cu, o que causou um grande decréscimo da sua concentração foi a adição do composto orgânico. Estes resultados devem-se ao facto de o composto orgânico aumentar o pH do solo, sendo que o pH, é um fator muito importante que controla a mobilidade dos metal(óide)s em solos contaminados, e que a mobilidade dos metais é maior em solos ácidos do que em solos alcalinos (Fayiga & Nwokw, 2017).

O composto orgânico melhora as características físicas, químicas e biológicas do solo e aumenta o nível de MO no solo (compostos de origem animal/vegetal). Também está comprovado que a MO é um importante adsorvente para metal(óide)s em solos devido à presença de cargas que reduzem sua mobilidade e disponibilidade no solo (Fayiga & Nwokw, 2017). Existem na literatura vários artigos que comprovam que a adição de compostos orgânicos diminui a concentração de metal(lóide)s em solos contaminados. Como exemplo, temos o estudo efetuado em Madaka, estado do Níger, Nigéria, em que foi utilizado vermicomposto de fezes de galinha e vermicomposto de estrume de cabra para auxiliar as plantas *Melissa officinalis L.* e *Sida acuta* durante o processo de fitorremediação de solos contaminados com cádmio, arsénio e chumbo, em que ambas as plantas foram consideradas adequadas para fitoextração e foram classificadas como fitoestabilizadoras (Aransiola et al., 2023).

Para além do composto orgânico, a adição da Mix também diminuiu a concentração de Cu. Isto deve-se ao facto de que a presença de bactérias e fungos no solo aumenta a biomassa vegetal e a absorção de metal(óide)s (Fayiga & Nwokw, 2017). Na literatura existem artigos que demonstram isso, como o estudo que teve como objetivo avaliar o efeito do corretivo orgânico (vermicomposto) e da adição de FMA na fitorremediação de solos contaminados com cobre. As plantas utilizadas foram de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e foram inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus*. O uso de vermicomposto aumentou o crescimento das plantas e o acúmulo de cobre nos tecidos aéreos, tornando-o adequado para uso na fitoextração de cobre. O uso de FMA aumentou a massa seca de raízes e nódulos, tornando-a recomendada para fitoestabilização. Assim, a fitorremediação do cobre por *C. ensiformis* é aumentada com o uso de vermicomposto e FMA (Rangel et al., 2023).

Um estudo que teve como objetivo investigar o efeito interativo dos resíduos sólidos da azeitona (OSW) e dos FMA em plantas de trigo sob estresse de arsenito (As III). Verificaram que os efeitos interactivos de AMF e OSW melhoraram a fertilidade do solo e aumentaram o crescimento das plantas de trigo. No geral, este estudo sugeriu a eficácia do OSW e AMF como uma abordagem promissora para mitigar a toxicidade do AsIII no crescimento, fisiologia e bioquímica do trigo (Albqmi, et al., 2023). Outro estudo relata os resultados obtidos utilizando *P. vittata* inoculado com FMA, para extração de Arsénio (As) de uma área industrial altamente contaminada. Foram realizados dois ensaios experimentais: i) as plantas foram colonizadas por FMAs e cultivadas durante dois anos sob condições controladas em solo proveniente do sítio metalúrgico e foram detetados efeitos positivos na saúde das plantas e na fitoextração; ii) realizaram um ensaio *in*

situ de três anos na área industrial; os resultados mostraram que a colonização de *P. vittata* com FMA melhorou o processo de remediação de As com impacto significativo na profundidade de 0–0,2 m (Cantamessa et al., 2020).

As adições de hidrogel nos tratamentos testados neste ensaio experimental não obtiveram muita influência na concentração dos meta(lóide)s presentes no “solo”, apenas tendo diminuindo um pouco a concentração de Cu. Na literatura existem artigos sobre como os hidrogéis reduzem as concentrações de meta(lóide)s no solo, como o estudo que avalia um corretivo de solo baseado em partículas de hidrogel de polímero de acrilamida reticulada funcional-tiol de tamanho microm (X3) que liga irreversivelmente metais solúveis tóxicos e reduz significativamente suas concentrações na solução do solo. O hidrogel X3 foi misturado com resíduos fitotóxicos de minas em vasos, em condições de estufa. No final do ensaio concluiu-se que o X3 reduziu as concentrações totais solúveis de contaminantes tóxicos 88,6-96,4% e aumentou a retenção de água do substrato e a disponibilidade de água para as plantas. A melhoria da qualidade do solo por X3 permitiu o estabelecimento precoce e bem-sucedido da gramínea nativa *Astrelba lappacea* (Bigot et al., 2013). Outro estudo foi conduzido para determinar o efeito do polímero superabsorvente de poli(acrilamida) (SAP) e dos corretivos de solo da mistura de biochar de casca de banana SAP, na mobilidade e absorção de metais pesados (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) por plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e espinafre (*Spinacia oleracea* L.) irrigado com águas residuais sintéticas, bem como no crescimento das plantas. Os resultados deste estudo revelam que todos os tratamentos exibiram aumento da retenção de água no solo em comparação com o controle, as alterações SAP e SAP-biochar casca de banana podem reduzir a mobilidade de metais no solo e absorção pelas plantas (Dhiman, 2019).

Segundo a literatura seria de esperar que nos resultados, comparando o tratamento C1 com o tratamento C2, o facto de apenas se ter cultivado a planta Vetiver (*Vetiveria zizanioides*) diminuísse um pouco a concentração de metal(lóide)s. A Vetiver é uma planta com elevada adaptabilidade, baixos requisitos de nutrientes, com tolerância a condições extremas do solo, como pH (3,3-12,5) e elevadas concentrações de metais e metalóides. Existem diversos artigos na literatura que comprovam que a planta Vetiver é um bom candidato para a fitorremediação de solos contaminados, como o estudo que tem como objetivo avaliar a taxa de contaminação por metais pesados (Cd, Cu, Mn, Pb, Zn, Ni, Cr) de um solo agrícola nas regiões agrícolas do Burkina Faso e avaliar a eficiência de remoção de metais pesados usando Vetiver em duas misturas diferentes contaminadas com metais pesados. Após 3 e 6 meses de crescimento em condições de laboratório, plantas foram colhidas e as concentrações de metais pesados na parte aérea e nas raízes foram determinadas. Os resultados indicam a Vetiver como um fitoestabilizadora eficaz para estes metais e indicaram o Vetiver como uma planta eficiente para fitoextração (Abaga et al., 2021). Outro estudo foi conduzido para compreender o potencial da vetiver na absorção de metais pesados do solo e com irrigação de águas residuais. Foram aplicados quatro tratamentos principais de irrigação, incluindo T1 (águas residuais industriais tratadas), T2 (proporção de 1:1 de águas residuais municipais:industriais), T3 (águas residuais municipais tratadas) e T4 (água doce). Para além disso foi avaliado o efeito do FMA, *Glomus mosseae*, no crescimento das plantas e na concentração de metais pesados. Os resultados

mostraram que comparando o tratamento com e o sem tratamento sem planta, a vetiver pode diminuir significativamente as concentrações de metais pesados no solo. Nas plantas inoculadas com FMAs as variáveis de crescimento aumentaram em comparação às plantas não inoculadas. Além disso, os FMA tiveram efeito significativo nas concentrações de Zn, Fe, Cu, Cd e Pb nas partes das plantas inoculadas em comparação com o tratamento controle (não inoculado) (Kafil et al., 2019).

5. Conclusão e perspectivas futuras

O problema mundial com os solos contaminados continuará a agravar-se se não forem implementadas medidas de contenção adequadas para prevenir, diminuir ou mitigar a contaminação dos solos. Em Portugal, até ao dia de hoje, ainda não foi aprovada nenhuma Lei que contemple a prevenção da contaminação e remediação dos solos.

Um dos principais contaminantes do solo são os metais(óides), estes elementos são tóxicos para os seres vivos mesmo em baixas concentrações, danificando as estruturas celulares, tecidos e órgãos, interferindo com o metabolismo podendo causar anemia, cansaço, distúrbios no sistema nervoso central e cardiovascular. Alguns metais, como o cádmio, arsénio e sulfuretos e óxidos de níquel são cancerígenos. Uma das principais fontes destes contaminantes é a extração mineira, em Portugal existem diversas minas que estão desativadas e que não tiveram as medidas de contenção necessárias. Como o caso da mina da Borralha estudada neste trabalho. Após o encerramento das minas deveria se fazer uma monitorização ambiental para as zonas contaminadas, pois a atividade mineira muitas vezes leva à contaminação de solos agrícolas próximos.

A fitoremediação pode ser uma solução viável sendo um processo que é potencialmente barato e de fácil implementação e tem apresentando resultados positivos nas últimas décadas em ambientes associados à exploração mineira. Existem diversas estratégias para tentar maximizar a potencialidade da fitoremediação como: i) o uso de plantas adequadas ao terreno, com tolerância a elevados teores de contaminantes pode favorecer e com capacidade de remover/acumular/degradar os contaminantes; ii) o uso de microrganismos (como AMF e BPCV) para conferir uma maior tolerância da planta aos contaminantes e potenciar o seu crescimento, pois estas tendem a crescer mais lentamente e a ter menor biomassa em solos contaminados podendo limitar a sua eficiência na sua remediação/recuperação; iii) o uso de corretivos orgânicos para melhorar as qualidades físico-químicas e biológicas do solo, e assim facilitar o crescimento das plantas; iv) o uso de hidrogéis para facilitar a aquisição de água. Neste ensaio experimental os resultados mostraram que a adição de hidrogel, vermicomposto e inóculo microbiano (Mix) ajudaram no desenvolvimento e crescimento da planta no solo combinado. O que contribuiu para uma melhoria da qualidade do solo da escombreira da mina da borralha foi o composto orgânico, relativamente às concentrações dos metais biodisponíveis no solo, também foi o composto orgânico que mais contribuiu para a diminuição das concentrações dos metais, a mix apenas ajudou na diminuição da concentração de Cu. Esses resultados podem dever-se à quantidade de hidrogel adicionado que pode não ter sido a ideal ou as espécies que podem não ser compatíveis entre si e/ou com a planta hospedeira, por isso mais estudos devem ser efetuados para tentar entender as limitações encontradas.

A preservação e gestão adequada do solo são fundamentais para garantir a sustentabilidade dos ecossistemas, a segurança alimentar e o bem-estar das comunidades. Por isso a continua pesquisa por formas de remediação de solos contaminados “amigas” do ambiente, deveria ser uma demanda primordial tendo em conta a percentagem de solos contaminados no mundo.

6. Bibliografia

1. Abaga et al., 2021. Phytoremediation Potential of Vetiver Grass (*Vetiveria Zizanioides*) in Two Mixed Heavy Metal Contaminated Soils from the Zoundweogo and Boulkiemde Regions of Burkina Faso (West Africa). *Journal of Geoscience and Environment Protection*, Vol.9 No.11, 2021.
2. Abhilash, 2021. Restoring the Unrestored: Strategies for Restoring Global Land during the UN Decade on Ecosystem Restoration (UN-DER). *Land*, 10, 201. Doi:<https://doi.org/10.3390/land10020201>
3. Adam & Duncan, 2001. Development of a Sensitive and Rapid Method for the Measurement of Total Microbial Activity Using Fluorescein Diacetate (FDA) in a Range of Soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 943-951. Doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)
4. Agante, 2021. Remediação de solos contaminados por metais pesados por aplicação de biochars. Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química, orientada pela Professora Doutora Maria da Graça Bontempo Vaz Rasteiro e pelo Professor Doutor António Alberto Santos Correia e apresentada no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 152pp.
5. Albqmi, et al., 2023. "Interactive Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Olive Solid Waste on Wheat under Arsenite Toxicity" *Plants* 12, no. 5: 1100. Doi:<https://doi.org/10.3390/plants12051100>
6. Andrade et al., 2009. Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo: I – Fitoextração. *Poluição do solo e qualidade ambiental • Rev. Bras. Ciênc. Solo* 33 (6). Doi:<https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000600037>
7. Aransiola, et al., 2023. Vermicompost-assisted phytoremediation of toxic trace element-contaminated soil in Madaka, Nigeria, using *Melissa officinalis* L and *Sida acuta*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 20, 1823–1836. Doi:<https://doi.org/10.1007/s13762-022-04105-y>
8. Ausay, L., 2018. Evaluación de métodos de aplicación de polyter en cultivo de fresa (*Fragaria vesca*). Documento final del proyecto de investigación como requisito para obtener el grado de ingeniero agrónomo. Facultad de ciencias agropecuarias.pp.80.
9. Avaliação técnica e económica para a implementação de vermicompostagem nos municípios do Oeste. WEBER Portugal – Engenharia e Projectos, S.A.
10. Azevedo, I. 2013. Remediação de solos contaminados por compostos farmacêuticos. Mestrado em Engenharia Química. Instituto Superior de Engenharia do Porto. 106pp.
11. Begum, N. et al, 2019. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.*

12. Belliturk, et al. 2014. The Importance of Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soil Using Vermicompost for Sustainable Agriculture. *J Rice Res* 3:e114. doi: [10.4172/2375-4338.1000e114](https://doi.org/10.4172/2375-4338.1000e114)
13. Bernard R. Glick, "Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications", *Scientifica*, vol. 2012, Article. ID 963401, 15 pages, 2012. Doi:<https://doi.org/10.6064/2012/963401>
14. Bernardino et al., 2018. Fitotecnologias: situação atual e perspectivas futuras. *Acta Brasiliensis* 2(2): 63-68, 2018 Revisão <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra>; Doi:<http://dx.doi.org/10.22571/2526-433877>
15. Bhattacharyya et al., 2020. Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Sci Rep* 10, 15536. Doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72439-z>
16. Bigot, et al., 2013. Metal-binding hydrogel particles alleviate soil toxicity and facilitate healthy plant establishment of the native metallophyte grass *Astrelba lappacea* in mine waste rock and tailings. *Journal of Hazardous Materials*. Volumes 248–249, Pages 424-434.
17. Bradham et al., 2004. Bioavailability of metals in contaminated soil and dust. Presented at 19th Annual Regional Risk Assessors Meeting, Boston, MA.
18. Bredemier & Mundstock, 2000. Regulation of nitrogen absorption and assimilation in plants. *Cienc. Rural* 30 (2) . Doi:<https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000200029>
19. Cabral, et al., 2010. Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 1, 25-29, 2010.
20. Cantamessa, et al., 2020. "Phytoremediation of a Highly Arsenic Polluted Site, Using *Pteris vittata* L. and Arbuscular Mycorrhizal Fungi" *Plants* 9, no. 9: 1211. Doi:<https://doi.org/10.3390/plants9091211>
21. Capitão, 2020. Efeito de corretivos orgânicos de resíduos vinícolas com diferentes tempos de compostagem na cultura da alface. Mestrado em Agricultura Biológica. Instituto Politécnico de Viana do Castelo. 57pp.
22. Cappuccino & Sherman, 1992. Negative staining. In: Cappuccino JC, Sherman N (eds) *Microbiology: a laboratory manual*, 3rd edn. Benjamin/Cummings PubCo, Redwood City, pp 125–179.
23. Caralinda, I., 2022. Análise de Risco para a Saúde Humana devido à Contaminação de Solos com Metais Pesados - Caso de Estudo. Mestrado em Geologia do Ambiente, Riscos Geológicos e Ordenamento do Território. Universidade de Lisboa – Faculdade de ciências, Departamento de geologia. 100pp.
24. Cardoso, 2020. Remediação de solos contaminados por metais pesados. Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente, na área de Especialização em Território e Gestão do Ambiente, orientada pelo Professor Doutor António Alberto Santos Correia. Faculdade de Ciências e Tecnologia da

Universidade de Coimbra Departamento de Engenharia Civil – Universidade de Coimbra. 69pp.

25. Carmo et al., 2016. Soil Fertility and Electrical Conductivity Affected by Organic Waste Rates and Nutrient Inputs. Division – Soil Use and Management. Rev. Bras. Ciênc. Solo 40. Doi:<https://doi.org/10.1590/18069657rbc20150152>
26. Cattelan et al., 1999. Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. Division S-3-Soil Biology & Biochemistry. V63. Pp 1670-1680. Doi:<https://doi.org/10.2136/sssaj1999.6361670x>
27. Cipolla et al., 2022. The Genetic relatedness of Burkholderia contaminans clinical isolates from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in Argentina. J Infect Dev Ctries;16(5):835-842.10.3855/jidc.13928.
28. Communication from the commission to the council, The European Parliament, The economic and social committee and the committee of the regions, 2002. Towards a Thematic Strategy for Soil Protection. Commission of the European Communities, Brussels,179 final.
29. Cordero, et al., 2019. High throughput method for measuring urease activity in soil. Soil Biol Biochem. 2019 Jul;134:72-7. doi: [10.1016/j.soilbio.2019.03.014](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.03.014). PMID: 31274933; PMCID: PMC6559327.
30. Cordis, 2021. Saúde do solo: colher os benefícios de solos saudáveis para os alimentos, as pessoas, a natureza e o clima. Disponível em:<https://cordis.europa.eu/article/id/429351-soil-health-reaping-the-benefits-of-healthy-soils-for-food-people-nature-and-the-climate/pt>
31. Cornell et al., 2021. Do Bioinoculants Affect Resident Microbial Communities? A Meta-Analysis. Front. Agron. Sec. Plant-Soil Interactions. Volume 3. Doi:<https://doi.org/10.3389/fagro.2021.753474>
32. Corwin & Lesch,2005. Apparent soil electrical conductivity measurements in agriculture. Computers and Electronics in Agriculture. Volume 46, Issues 1–3, Pages 11-43.
33. Costa, et al., 2015. Solos contaminados - O Problema e as Soluções de Remediação. Apemeta- associação Portuguesa De Empresas De Tecnologias Ambientais.
34. Costa, 2015. Concentração de metais pesados nos solos utilizados para agricultura urbana na cidade de Lisboa. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente. Universidade de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia. 141pp. Disponível em: https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/10915/1/TESE_HugoCosta_vFinal.pdf
35. Cotta, et al., 2015. Compostagem versus vermicompostagem: comparação das técnicas utilizando resíduos vegetais, esterco bovino e serragem. Eng Sanit Ambient. v.20 n.1.65-78. Doi:[10.1590/S1413-41522015020000111864](https://doi.org/10.1590/S1413-41522015020000111864)

36. Dhalaria, et al., 2020. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Potential Agents in Ameliorating Heavy Metal Stress in Plants. *Agronomy* 2020, 10(6), 815. Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy10060815>
37. Dhiman, 2019. Use of hydrogel based soil amendments to promote safe use of wastewater in agriculture. Department of Bioresource Engineering McGill University Montreal, Canada. 187 pp.
38. Dias & Santos, 2022. Bactérias promotoras de crescimento de plantas: conceitos e potencial de uso. Nova Xavantina, MT: Pantanal. 98p. Doi: <https://doi.org/10.46420/9786581460631>.
39. Dsouza et al., 2022. Multifunctional Composite Hydrogels for Bacterial Capture, Growth/Elimination, and Sensing Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2022, 14, 42, 47323–47344. Doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.2c08582>
40. Emmanuel & Babalola, 2020. Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*. Volume 239. ISSN 0944-5013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126569>.
41. Estrela, M. et al. 2018. Fitorremediação como solução para solos contaminados por metais pesados. *Revista Ceuma Perspectivas*, vol. 31, 2018. ISSN Eletrônico: 2525-5576.
42. Evangelou et al, (2015). Phytomanagement: Phytoremediation and the Production of Biomass for Economic Revenue on Contaminated Land. In: Ansari, A., Gill, S., Gill, R., Lanza, G., Newman, L. (eds) *Phytoremediation*. Springer, Cham. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-10395-2_9
43. Ezzatian, et al., 2009. Effects of Puccinellia Distans and Tall Fescue on Modification of C/N Ratios and Microbial Activities in Crude Oil-Contaminated Soils. *Petroleum Science and Technology*. V27, Issue 5. Doi: <https://doi.org/10.1080/10916460802097079>
44. FAO & UNEP, 2021. Global assessment of soil pollution - Summary for policy makers. Rome, FAO. Doi: <https://doi.org/10.4060/cb4827en>
45. Fayiga & Nwoke, 2017 Metal(Loid)s in Farmland soils and Strategies to Reduce Bioavailability. *Open J Environ Bion* 2(1): 009-024. Doi:10.17352/ojeb.000003
46. Ferreira, 2023. Remediação de solos contaminados. Universidade aberta.
47. Freitas, J. et al. 2019. Fotodegradação de hidrogel de poliacrilamida na presença de substâncias químicas para o uso na agricultura. *Matéria (Rio J.)* 24 (3). Doi: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620190003.0722>
48. Friedman, 2005. Soil properties influencing apparent electrical conductivity: a review. *Computers and Electronics in Agriculture*. Volume 46, Issues 1–3, March 2005, Pages 45-70
49. Frlolov et al., 2022. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 1093 012016

50. Gilani & Bahmanyar, 2008. Impact of Organic Amendments with and Without Mineral Fertilizers on Soil Microbial Respiration. *Journal of Applied Science*, vol. 8, Issue 4, p.642-647.
51. Gomes & Lanceiro, 2019. Actas do colóquio solos contaminados, ricos invisíveis. Instituto de Ciências Jurídico-Políticas Centro de Investigação de Direito Público. Pp.242. ISBN: 978-989-8722-47-8.
52. Gomides, 2022. Isolamento de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) em cana-de-açúcar. Trabalho de projeto apresentado ao curso Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas. 35pp.
53. Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192–195
54. Gupta et al., 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int J Microbiol.* 2012:578925. Doi: 10.1155/2012/578925. PMID: 22315612; PMCID: PMC3270400.
55. Handy et al., 2021. Identification of Plant Growth Promoting Bacteria Within Space Crop Production Systems. *Front. Astron. Space Sci.*, 19. Sec. Astrobiology. V8. Doi: <https://doi.org/10.3389/fspas.2021.735834>
56. Inui, 2009. Isoamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxins em solo com cana-de-açúcar. Universidade estadual paulista – Faculdade de ciências agrarias e veterinárias. Brasil. 90 pp.
57. IPBES (2018): Summary for policymakers of the assessment report on land degradation and restoration of the Intergovernmental SciencePolicy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. IPBES secretariat, Bonn, Germany. 44 pages.
58. Isidoro et al., 2010. O grande desafio da cadeia laticinista brasileira: a emergencia dos microrganismos psicrotróficos. Doi:<http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/bitstream/123456789/2303/5/M000583.pdf>
59. Jebara et al., 2017. Potentialities and Limit of Legume-Plant Growth Promoting Bacteria Symbioses Use in Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soils, *Internacional journal of plant biology & research*.
60. Kaczyńska et al., 2015. Soil Dehydrogenases as an Indicator of Contamination of the Environment with Petroleum Products. *Water Air Soil Pollut.* 2015;226(11):372. doi: [10.1007/s11270-015-2642-9](https://doi.org/10.1007/s11270-015-2642-9). Epub 2015 Oct 11. PMID: 26478635; PMCID: PMC4600725.
61. Kafil et al., 2019. Phytoremediation potential of vetiver grass irrigated with wastewater for treatment of metal contaminated soil. *Int J Phytoremediation.* 2019;21(2):92-100. doi: 10.1080/15226514.2018.1474443. PMID: 30656949.

62. Khan, 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 355–364.
63. Koçak, 2020. Importance of urease activity in soil. Conference: V. International Scientific and Vocational Studies Congress – Science and Health.
64. Kulkova et al., 2023. Plant Growth Promotion Using *Bacillus cereus*. *Int J Mol Sci*;24(11):9759. Doi: [10.3390/ijms24119759](https://doi.org/10.3390/ijms24119759). PMID: 37298706; PMCID: PMC10253305.
65. Lanna, et al, 2010. Urease activity as influenced by planting system and plant cover in soil under common bean. *Fertilidade do solo e nutrição de plantas. Rev. Bras. Ciênc. Solo* 34 (6). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000600018>
66. Latif, et al., 2023. Remediation of Environmental Contaminants Through Phytotechnology. *Water Air Soil Pollut* 234, 139. Doi:<https://doi.org/10.1007/s11270-023-06112-2>
67. Lei ProSolos: será desta? DAR A PALAVRA À ECOLOGIA. Partido ecologista os verdes. 2023. Disponível em:<https://osverdes.pt/dar-a-palavra-a-ecologia/lei-prosolos-sera-desta/> Acesso em:18/8/2023.
68. Luna et al., 2017. Organic amendments and mulches modify soil porosity and infiltration in semiarid mine soils. *Land Degradation & Deveopment*.
69. Méjia et al, 2014. Metodologia para Seleção de Técnica de Fitorremediação em Áreas Contaminadas. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*.
70. Mello, 2020. Fitorremediação em Solos Contaminados com Herbicidas. Editora Appris. 73 pp. EAN: 9786555239072
71. Mendonça et al., 2013. Hidrogel como alternativa no aumento da capacidade de armazenamento de água no solo. *Water Resources and Irrigation Management*. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, PB. v.2, n.2, p.87-92. doi: <http://www3.ufrb.edu.br/seer/index.php/wrim/article/view/1612/844>
72. Meshram & Saxen, 2016. Potential fibrinolytic activity of na endophytic *Lasiodiplodia pseudotheobromae* species. *3 Biotech* 6:114 Doi: [10.1007/s13205-016-0428-4](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0428-4)
73. Millennium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.
74. Miller et al., 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66(11): 4744–4753.
75. Miransari, 2011. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnol Adv*. 29(6):645-53. Doi: [10.1016/j.biotechadv.2011.04.006](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.006).
76. Morales et al., 2023. Analysis of the Physiological Response and Reactive Oxygen Species in Castor Oil Plant (*Ricinus Communis*) in the Phytoremediation Processes

- with Plant Growth Promoter Bacteria (PGPB). *Bull Environ Contam Toxicol.*110(6):105. Doi: [10.1007/s00128-023-03738-0](https://doi.org/10.1007/s00128-023-03738-0). PMID: 37284982.
77. Moreira H. et al. 2021a. Phytomanagement of Metal(loid)-Contaminated Soils: Options, Efficiency and Value. *Sec. Toxicology, Pollution and the Environment*. Doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.661423>
78. Moreira et al., 2021b. Technical Guide on strategies to enhance phytomanagement efficiency at metal(loid)-polluted/degraded sites: planting patterns bioinoculation and soil organic amendments. 1st Edition. EU PhytoSUDOE (SOE1/P5/E0189).
79. Morita & Moreno, 2021. Fitorremediação aplicada a áreas de disposição final de resíduos sólidos urbanos. Artigo técnico. *Eng. Sanit. Ambient.* 27 (2). Doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-415220210105>
80. Msimbira & Smith, 2016. The Roles of Plant Growth Promoting Microbes in Enhancing Plant Tolerance to Acidity and Alkalinity Stresses. *Front. Sustain. Food Syst.* Sec. Crop Biology and Sustainability. Volume 4 – 2020. Doi: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00106>
81. Mitra et al. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungal association boosted the arsenic resistance in crops with special responsiveness to rice plant. *Environmental and Experimental Botany.* Volume 193.ISSN 0098-8472. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104681>.
82. Nahas, 2002. Microrganismos do solo produtores de fofdsteses em diferentes sistemas agrícolas. Solos e irrigação.. Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas (UNESP). Via de acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 Jaboticabal (SP). *Bragantia*, Campinas, v. 61, n. 3, 267-275.
83. Nannipieri P, et al.,1980. Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Sci Soc Am J* 44:1011–1016.
84. Nascimento, 2018. Promoting plant growth using ACC deaminase-producing bacteria: insights into plant-bacterial interactions and agricultural and biotechnological applications. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/193069>
85. Nautiyal, 1999. An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS)*, 170, 265-270. Doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
86. Negrodo et al, 2017. Infección urinaria por *Lelliottia amnigena* (Enterobacter amnigenus): un patógeno infrecuente. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). Oviedo. *Rev Esp Quimioter*; 30(6):483-484.

87. Nourmandipour et al, 2021. Effects of Organic Amendments on Enzymes Activities in a Calcareous Sandy Soil. *Eurasian Soil Sc.* **54**, 271–284. Doi: <https://doi.org/10.1134/S1064229321020113>
88. NRCS, 2014. Soil Respiration. Soil Health – Guide for educators. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service.
89. Ojuederie et al., 2017. "Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review" *International Journal of Environmental Research and Public Health* **14**, no. 12: 1504. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
90. Olaniran et al., 2013. Bioavailability of heavy metals in soil: impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *Int J Mol Sci.* **14**(5):10197-228. doi: 10.3390/ijms140510197. PMID: 23676353; PMCID: PMC3676836.
91. Orterga & Bernal, 2011. *Cupriavidus pauculus* catheter related bacteremia. *Infectio*, Volume 15, Issue 4. Pages 289-292. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70743-3](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70743-3)
92. Osei et al., 2022. Isolation, identification, and pathogenicity of *Lelliottia amnigena* causing soft rot of potato tuber in China. *Microbial Pathogenesis*, **V 164**. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105441>
93. Paula, 2018. Bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas ao sorgo. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae. Viçosa minas gerais – BRASIL. Pp. 51.
94. Pérez-Esteban *et al.*, 2014. Phytostabilization of metals in mine soils using *Brassica juncea* in combination with organic amendments. *Plant Soil* **377**, 97–109. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1629-9>
95. Pérez & Eugenio, 2018. Status of Local Soil Contamination in Europe: Revision of the Indicator “Progress in the Management Contaminated Sites in Europe. EUR 29124 EN. Luxembourg: Publications Office of the European Union. Doi:10.2760/093804
96. Petersen et al, (2023). Uso da fitorremediação como tratamento para recuperação de áreas degradadas. *revista foco*, **16**(02). Doi: <https://doi.org/10.54751/revistafoco.v16n2-112>
97. Phy2sudoe - Borralha, 2020. European Regional Development Fund - Borralha Local S3.
98. Phy2SUDOE, 2022. European Regional Development Fund. Doi: <https://www.phytosudoe.eu/en/>. Acesso: 28/10/22
99. Polyter, 2020. POLYTER – Hydro-retentive, Fertilizer. Doi: <https://www.polyter.com/en/>
100. Poria et al., 2022. Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Front. Plant Sci.* **13**:999866. doi: [10.3389/fpls.2022.999866](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.999866)

101. Prasad, 2003. Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology* 50, 686–701). Doi: <https://doi.org/10.1023/A:1025604627496>
102. Qin et al., 2020. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on soil enzyme activity is coupled with increased plant biomass. *Eur J Soil Sci.*; 71: 84–92. Doi: <https://doi.org/10.1111/ejss.12815>
103. Ramos et al., 2018. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.17, n. 3., p. 417-427.
104. Ramos et al., 2006. Reactivity of soil acidity correctives and conditioners in lysimeters. *Fertilidade do solo e nutrição de plantas. Rev. Bras. Ciênc. Solo* 30 (5). Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832006000500011>
105. Rangel et al., 2023. Organic fertilization and mycorrhization increase copper phytoremediation by *Canavalia ensiformis* in a sandy soil. *Environ Sci Pollut Res* 30, 68271–68289. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-023-27126-7>
106. Redondo & Santos, 2013. Produção de mudas de *vetiver chrysopogon zizanioides (l) robery* em casa de vegetação do tipo “glasshouse. faculdade de agronomia e medicina veterinária - universidade de Brasília. pp29.
107. Ribas et al., 2016. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. *Revista Brasileira de Biociências*. ISSN 1980-4849 (on-line) / 1679-2343. Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2967>.
108. Rezaie & Raiesi, 2016. 'Effect of superabsorbent polymers on soil microbial respiration and biomass under drought stress condition', *Journal of Sol Biology*, 3(2), pp. 151-162. doi: 10.22092/sbj.2016.105966
109. Ribeiro, 2010. Levantamento do estado de contaminação de solos e águas superficiais da antiga mina da borralha. Dissertação realizada no âmbito do Mestrado em Engenharia de Minas e Geo-Ambiente. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. 83pp.
110. Ribeiro, 2013. Contaminação do solo por metais pesados. Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente – Gestão e Ordenamento Ambiental no Curso de Mestrado em Engenharia do Ambiente conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa. pp.249.
111. Rocha & Moura, 2015. A fitorremediação como ferramenta para recuperação de áreas contaminadas. II workshop de pós graduação das ciências agrárias. Cidade Universitária Paulo IV – Tirirical - São Luís/MA
112. Saadani et al., 2019. Effect of *Vicia faba* L. var. minor and *Sulla coronaria* (L.) Medik associated with plant growth-promoting bacteria on lettuce cropping system

- and heavy metal phytoremediation under field conditions. *Environ Sci Pollut Res Int.* (8):8125-8135. Doi: 10.1007/s11356-019-04302-2. PMID: 30693447.
113. Saini & Malve, 2022. Impact of Hydrogel on Agriculture – A review. *Eco. Env. & Cons.* 29 (January Suppl. Issue). pp. (S36-S47). Doi: <http://doi.org/10.53550/EEC.2023.v29i01s.007>.
 114. Saleh SS, Glick BR (2001) Involvement of gasS and pros in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Can J Microbiol* 47:698–705
 115. Schmitz, 2003. Indicadores biológicos da qualidade do solo. Universidade federal do rio grande do sul. faculdade de agronomia. programa de pós-graduação em ciência do solo. Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em Ciência do Solo. Porto Alegre (RS), Brasil. 176pp.
 116. Silva, et al., 2004. Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiana de um solo submetido a reflorestamento. *Ciência Rural* 34(5). Doi: [10.1590/S0103-84782004000500025](https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000500025)
 117. Silva et al., 2019. Fitorremediação de Solos Contaminados com Metais: Panorama Atual e Perspectivas de uso de Espécies Florestais. *Rev. Virtual Quim.*, 2019, 11 (1), 18-34.
 118. Souza, et al, 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol.* 2015 Oct-Dec; 38(4): 401–419. Doi: [10.1590/S1415-475738420150053](https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053)
 119. Tang et al., 2023. "Effects of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria on Soil Bacterial Community, Soil Physicochemical Properties, and Soil Enzyme Activities in the Rhizosphere of Alfalfa under Field Conditions" *Diversity* 15, no. 4: 537. Doi: <https://doi.org/10.3390/d15040537>
 120. The Vetiver Network International (2022). Patron – H.R.H Princess Maha Chakri Sirindhorn of Thailand. Disponível em: <https://www.vetiver.org>. Acesso em: 18/8/2023.
 121. Tsao, 2003. Overview of phytotechnologies. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 78:1-50. Doi: [10.1007/3-540-45991-x_1](https://doi.org/10.1007/3-540-45991-x_1). PMID: 12674397
 122. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, 2017. National soil survey handbook, title 430-VI. Doi: <https://directives.sc.egov.usda.gov>
 123. Vasconcelos, 2019. Desenvolvimento de *Atriplex nummularia* submetida à doses de hidrogel aplicado em solo sódico. 65f. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2019.
 124. Vieira, 2014. Risco associado à exposição a teores elevados de metais na área mineira da Borralha. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Geológica. Pp.140.

125. Walter, 2017. Comportamento mecânico do solo em operações agrícolas [recurso eletrônico. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP, 2017. 223 p. : il. ISBN: 978-85-922384-0-7 Doi: [10.11606/9788592238407](https://doi.org/10.11606/9788592238407).
126. Wohler, I. 1997. Auxin-indole derivatives in soils determined by a colorimetric method and by high performance liquid chromatography. *Microbiological Research*. 152: 399-405. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80058-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80058-4)
127. Wolińska & Stępniewska, 2012. Dehydrogenase Activity in the Soil Environment. Doi: [10.5772/48294](https://doi.org/10.5772/48294)
128. Wu et al., 2019. Isolation, characterization and the effect of indigenous heavy metal-resistant plant growth-promoting bacteria on sorghum grown in acid mine drainage polluted soils. *J Gen Appl Microbiol*.65(5):254-264. Doi: [10.2323/jgam.2018.11.004](https://doi.org/10.2323/jgam.2018.11.004). PMID: 31243191.
129. Yadav et al., 2020. Bacteria from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi augment wheat yield and biofortification. *Plant Physiology and Biochemistry*. V 150. Pages 222-233. ISSN 0981-9428. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.039>.
130. Yan, et al., 2020. Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Front. Plant Sci., Sec. Plant Biotechnology*. V 11. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
131. Yu et al, 2023. A review on adsorption characteristics and influencing mechanism of heavy metals in farmland soil. *The Royal Society of Chemistry*, Doi: [10.1039/D2RA07095B](https://doi.org/10.1039/D2RA07095B) (Review Article) *RSC Adv.*, **13**, 3505-3519.
132. Yu et al., 2022. Cooperation between arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria and their effects on plant growth and soil quality. *PeerJ*. 2022 Mar 21;10:e13080. Doi: [10.7717/peerj.13080](https://doi.org/10.7717/peerj.13080). PMID: 35341045; PMCID: PMC8944337.
133. Xie et al., 2016. Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. *Front Plant Sci.*;7:755. Doi: [10.3389/fpls.2016.00755](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00755). PMID: 27303431; PMCID: PMC4885870.
134. Zulfiqar et al, 2022. Metabolites produced by inoculated *Vigna radiata* during bacterial assisted phytoremediation of Pb, Ni and Cr polluted soil. *Published*. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277101>.

