

EMANUELLE BURGOS CARDOSO

**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA E APLICAÇÃO DE FUNGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA A REVEGETAÇÃO EM  
SÍTIO DE PÓS-MINERAÇÃO DE FERRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C268d  
2019  
Cardoso, Emanuelle Burgos, 1989-  
Diversidade da microbiota e aplicação de fungos  
micorrízicos arbusculares para a revegetação em sítio de  
pós-mineração de ferro / Emanuelle Burgos Cardoso. – Viçosa,  
MG, 2019.

ix, 118 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Micorrizas vesículo-arbusculares. 2. Revegetação.  
3. Barragens de rejeitos. 4. Ferro - Minas e mineração.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. II. Título.

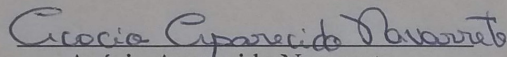
CDD 22. ed. 579.51785

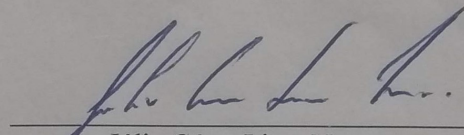
EMANUELLE BURGOS CARDOSO

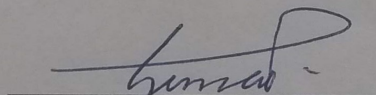
**DIVERSIDADE DA MICROBIOTA E APLICAÇÃO DE FUNGOS  
MICORRÍZICOS ARBUSCULARES PARA A REVEGETAÇÃO EM  
SÍTIO DE PÓS-MINERAÇÃO DE FERRO**

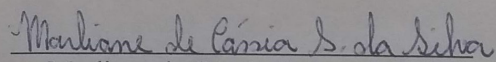
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

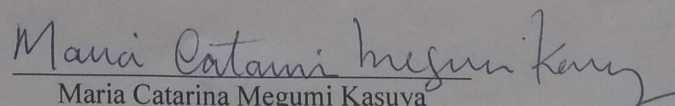
APROVADA: 3 de julho 2019.

  
Acácio Aparecido Navarrete

  
Júlio César Lima Neves

  
Eduardo Gusmão Pereira  
(Coorientador)

  
Marliane de Cássia Soares da Silva  
(Coorientadora)

  
Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Orientadora)

## *Dedicatória*

*À minha mãe, pelo amor  
incondicional, total incentivo e  
amparo em toda a minha  
trajetória;*

*Às mulheres da família Burgos, pelos  
exemplos de coragem, acolhimento,  
motivação e carinho;*

*Ao Leonardo, pelo amor e  
companheirismo em todos os  
momentos.*

*Dedico*

*“O vento é o mesmo:  
mas sua resposta é diferente, em cada folha.”*

*Cecília Meireles*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e se fazer presente constantemente na minha vida.

A minha mãe pelo amor, carinho incondicional, por ser minha referência de força, resiliência e resistência diante dos desafios da vida e ser minha grande incentivadora.

Ao meu pai, pelo amor, carinho, incentivo incondicional em todos os momentos.

Ao meu avô, primas, primos, tias e tios pelo amor, motivação, acolhimento por grandes momentos de alegria nas idas e vindas para casa.

A Leonardo, pelo amor, companheirismo, compreensão, por compartilhar momentos bons e ruins e contribuir na ressignificação de muitas situações.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) pela concessão de bolsa de estudos durante o curso e juntamente com a CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro às pesquisas. À empresa Vale, pelo financiamento desta pesquisa.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola: professores, estudantes e funcionários que cooperaram das mais diversas formas para a execução desta tese. Ao Bioagro, pela grande parte da infraestrutura necessária a realização deste trabalho.

À professora Catarina, por ter me confiado este projeto e pela orientação, à Marliane pela coorientação e ao professor Eduardo pela coorientação e por garantir o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Acácio e Júlio César, que se dispuseram a participar da banca e colaborar com o aprimoramento desta tese.

Ao professor Raphael, pelo auxílio e disponibilidade com as análises de física do solo, ao professor Júlio César, pela prontidão em tirar dúvidas e por me encorajar diante às dificuldades. Ao Cláudio e Evandro, do Laboratório de Física do solo pela recepção e suporte com as análises.

Ao Antônio Carlos que colaborou com o preparo dos materiais para campo e nos experimentos conduzidos em casa de vegetação, bem como os demais técnicos e funcionários: Sr. Paulo da portaria, Sr. Paulo da autoclave, Robson, Danilo, Emília, Célio, Letícia, Gabriel, Camila, Jaqueline e Elizete. Ao Sr. Valter por nos conduzir com todo cuidado e segurança para as coletas, no campo.

Aos companheiros de laboratório que me auxiliaram nos trabalhos de campo e de laboratório e tornaram as análises e coletas mais divertidas: Thuany, Alex, Tiago Martins, Aninha, Felipe, Nayron, Bethânia, Sidonie, Thiago Iglesias, Camila, Duda, Matheus, Paulo e Bruno Moreira.

Ao Karl pela amizade e auxílio com a identificação dos esporos das micorrizas arbusculares.

Ao professor Bruno Moreira pelo acolhimento, ensinamentos e colaboração na execução inicial deste trabalho.

Ao Tomás pela solicitude e benevolência em sempre ajudar e por compartilhar seu conhecimento. Ao Paulo pela participação ativa em todo o desdobramento do trabalho e ao Alan pela presteza em auxiliar nas análises. Gratidão por proporcionarem trocas de saberes e de scripts, que muito contribuíram para o amadurecimento deste trabalho. Ao Leandro Lemos, Helena e Débora Romaskevis pelo auxílio no entendimento das análises.

Aos demais companheiros do Laboratório de Associações Micorrízicas: Maria Elisabeth, Karen, Leandro, Nicolly, Tiago Almeida, Emiliane, Daniela, Rafaela, Marcos, Fernanda, José Maria, Everaldo, Bethânia, Fábio, Letícia Miranda, Lidiane, Phillipi, Raíssa, Meiriele...

Às amigas que algumas disciplinas proporcionaram: Rafaela Teixeira, Daniel, Thaline e Monique. Ao reencontro das companheiras da graduação Kaliane e Rita, que seguiram a mesma rota aqui na UFV. A Aneli, Vanessa, Larissa, Lorena, Letícia Ferreira, Juliana Fraleon, Helbert, Felipe, Emuriela, Maíra, Karen, Tiago Ferreira, Aristides, Alan, Paulo e Sandro pelo carinho, amizade e vibrações positivas.

Aos integrantes e colaboradores do NEMA (Núcleo de Estudos em Microbiologia Agrícola) pelo aprendizado mútuo.

Às amigas que minha fé proporcionou: Rafael, Rodrigo, Fabiana, Nilce, Pedro, Iarley, Débora Freitas, Bruna Horta e Pâmela.

Aos mestres, orientadores e amigas da UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia), da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária - Mandioca e Fruticultura), que me proporcionaram as experiências iniciais no campo da microbiologia e também as amigas e orientadores da UFLA (Universidade Federal de Lavras), que também fizeram parte da minha trajetória acadêmica, por todo o incentivo e exemplos positivos. A todos os mestres que contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal durante toda a minha trajetória estudantil.

A Bruna Cardoso e Laís do Vale pela empatia e profissionalismo, que auxiliaram no trato da minha saúde.

A minha eterna gratidão ao Paulo, Alan e Sandro, por me acolherem na Pombo's House, em um dos períodos mais difíceis para mim aqui em Viçosa.

**Minha sincera gratidão!**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
Introdução.....	1
Referências.....	5
<b>CAPÍTULO 1: Iron exploration mine after 10 years of closure of activities revealed higher diversity of prokaryotes at the post-mining site in contrast to adjacent native site.....</b>	<b>9</b>
Abstract.....	9
Introduction.....	10
Metodology.....	11
Site and sampling design.....	11
DNA extraction, Nested-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis for NFB and actinobacteria .....	13
Illumina sequencing of 16S rRNA gene amplicons and Bioinformatic analysis.....	14
Soil chemical and physical properties .....	15
Statistical analysis .....	16
Results .....	16
DGGE clusters of NFB and Actinobacteria.....	16
Prokaryotic composition in iron mining sites .....	17
Discussion.....	24
References .....	28
Supplementary Information.....	35
<b>CAPÍTULO 2: Estrutura e dinâmica espacial-temporal da comunidade fúngica em sítios de pós-mineração.....</b>	<b>40</b>
Resumo.....	40
Introdução.....	40
Metodologia .....	42
Sítio de estudo e desenho amostral .....	42
Extração de DNA e sequenciamento de amplicons do gene ITS rRNA a análises de bioinformática .....	44
Nested-PCR e análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) para Glomeromycota .....	44
Extração, quantificação e identificação de esporos de FMAs .....	45
Extração e quantificação de proteína do solo relacionada à glomalina .....	46
Caracterização química e física do solo.....	47
Análises estatísticas .....	47
Resultados .....	48
Comunidade de fungos nos sítios de mineração .....	48

Perfil da comunidade de Glomeromycota em NT e RV por DGGE.....	56
Contagem de esporos e espécies identificadas de FMAs.....	57
Características físicas e químicas do solo e influências na comunidade de fungos .....	58
Discussão .....	60
Referências.....	65
Material suplementar.....	74
<b>CAPÍTULO 3: Comunidade fúngica do inoculante de FMA obtido por <i>on-farm</i> e seu efeito no crescimento de <i>Paspalum densum</i> cultivado em rejeito de mineração de ferro e pilha de estéril com adição de cama de frango.....</b>	<b>83</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>83</b>
Introdução.....	84
Metodologia .....	86
Sítios de estudo e obtenção do inóculo.....	86
Obtenção dos inóculos.....	87
Extração de DNA, sequenciamento de amplicons do gene ITS rRNA e análises de bioinformática da comunidade fúngica dos inoculantes obtidos pelo método <i>on-farm</i> ..	88
Extração e quantificação de esporos de FMAs dos inóculos obtidos pela técnica <i>on-farm</i> .....	89
<b>Experimento 1: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de <i>P. densum</i> cultivada em rejeito de mineração .....</b>	<b>89</b>
<b>Experimento 2: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de <i>P. densum</i> cultivada em pilha de estéril, no campo.....</b>	<b>90</b>
Quantificação da colonização micorrízica em <i>P. densum</i> .....	91
Características químicas do rejeito de mineração de ferro utilizado no experimento 1 e da pilha de estéril utilizada no experimento 2 .....	91
Análises estatísticas .....	92
Resultados .....	92
Caracterização da comunidade fúngica dos inóculos .....	92
Quantidade de esporos de FMAs dos inoculantes .....	96
<b>Experimento 1: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de <i>P. densum</i> cultivada em rejeito de mineração .....</b>	<b>97</b>
<b>Experimento 2: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de <i>P. densum</i> cultivada em pilha de estéril, no campo.....</b>	<b>99</b>
Discussão .....	102
Referências.....	107
Material suplementar.....	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	117

## RESUMO

CARDOSO, Emanuelle Burgos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Diversidade da microbiota e aplicação de fungos micorrízicos arbusculares para a revegetação em sítio de pós-mineração de ferro.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Eduardo Gusmão Pereira e Marliane de Cássia Soares da Silva.

A ocorrência e distribuição da comunidade microbiana do solo é um dos critérios utilizados na avaliação do progresso dos sítios pós-mineração assim como estabelecimento da vegetação nesses ambientes. O papel crucial dos microrganismos na remediação, recuperação, reabilitação, restauração ou alguma combinação dessas práticas tem sido reconhecido por empresas que visam as boas práticas de mineração, principalmente no processo de descomissionamento. Neste contexto, o encerramento das atividades de exploração de ferro na mina Retiro das Almas, localizada no Quadrilátero Ferrífero, um dos maiores depósitos de minério de ferro do Brasil é alvo dos nossos estudos, que visam caracterizar a comunidade microbiana de dois sítios dentro da mina: um nativo (NT) e outro de pós-mineração revegetado (RV), além de avaliar a eficiência dos inoculantes de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), obtidos *in situ* no cultivo da gramínea ferro tolerante *Paspalum densum* para revegetar o sítio de pós-mineração. Assim, a estrutura da comunidade de procariotos abordada e revelada de forma pontual no capítulo 1, indicou maiores métricas ecológicas de diversidade e riqueza no sítio RV do que no sítio NT. Apesar das diferenças na estrutura da comunidade, a maioria dos filos e gêneros de procariotos foram compartilhados entre ambos os sítios, assim como o metabolismo de C e N, além do perfil microbiano de fixadores de nitrogênio e actinobactérias, o que indica resiliência de RV após 10 anos de descomissionamento deste sítio. Toda a comunidade de procariotos foi influenciada por características físico-químicas do solo, assim como a comunidade fúngica, abordada no capítulo 2. Para a comunidade fúngica avaliada em dois períodos distintos, o sítio NT e o período seco revelaram maiores métricas ecológicas de riqueza e diversidade e padrões de distribuição na abundância complexos, sobretudo para o filo Glomeromycota, associado com cerca de 90% das plantas terrestres. A inoculação de FMAs, provenientes da técnica *on-farm*, em rejeito de mineração e pilha de estéril, revelada do capítulo 3 demonstrou que a influência positiva entre ambos ou apenas um destes fatores no crescimento e colonização micorrízica de *P. densum*. Nossos resultados mostraram que uso da cama de frango em ambos os subprodutos da mineração é fortemente recomendada no processo de revegetação desta gramínea.

## ABSTRACT

CARDOSO, Emanuelle Burgos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Microbial diversity and application of arbuscular mycorrhizal fungi for revegetation at iron post-mining site.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Eduardo Gusmão Pereira and Marliane de Cássia Soares da Silva.

The occurrence and distribution of the soil microbial community is one of the criteria for assessment of progress in post-mining sites just as vegetation establishment in these environments. The crucial role of microorganisms in remediation, recovery, restoration or some combination of these practices has been recognized by companies that aim best mining practices, mainly in the decommissioning process. In this context, the closure of the iron exploration activities in Retiro das Almas mining, located in Quadrilátero Ferrífero, one of the largest iron deposits in Brazil is target of our studies, that aimed characterized the microbial community of the two sites inside the mining: one native site (NT) and other of post-mineration revegetated (RV), besides evaluating the efficiency of inoculants of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), obtained *in situ*, in iron tolerant grass *Paspalum densum* cultivation to revegetation of post-mining site. Thus, the structure of the prokaryotic community revealed in chapter 1 indicated higher ecological metrics of diversity and richness at RV site than at NT site. Despite differences in community structure, most prokaryotic phyla and genera were shared between both sites, as well as C and N metabolism, furthermore microbial profile of N-fixators and Actinobacteria, which indicates the RV resilience after 10 years of decommissioning this site. The whole community of prokaryotes was influenced by physical chemical soil characteristics, as well as the fungal community, discussed in chapter 2. For fungal community evaluated in two different periods, the NT site and dry period revealed the higher ecological metrics of diversity and richness, furthermore complex patterns in distribution and abundance, especially for the phylum Glomeromycota, associated with about 90 % of terrestrial plants. The AMF inoculation, from *on-farm* methodology, in iron mining tailings and overburden, revealed in chapter 3, demonstrated the positive influence between either or only one of these factors in biomass and mycorrhizal colonization of *P. densum*. Our results showed that chicken litter use in both mining tailings is recommended in the revegetation process of this grass.

## Introdução

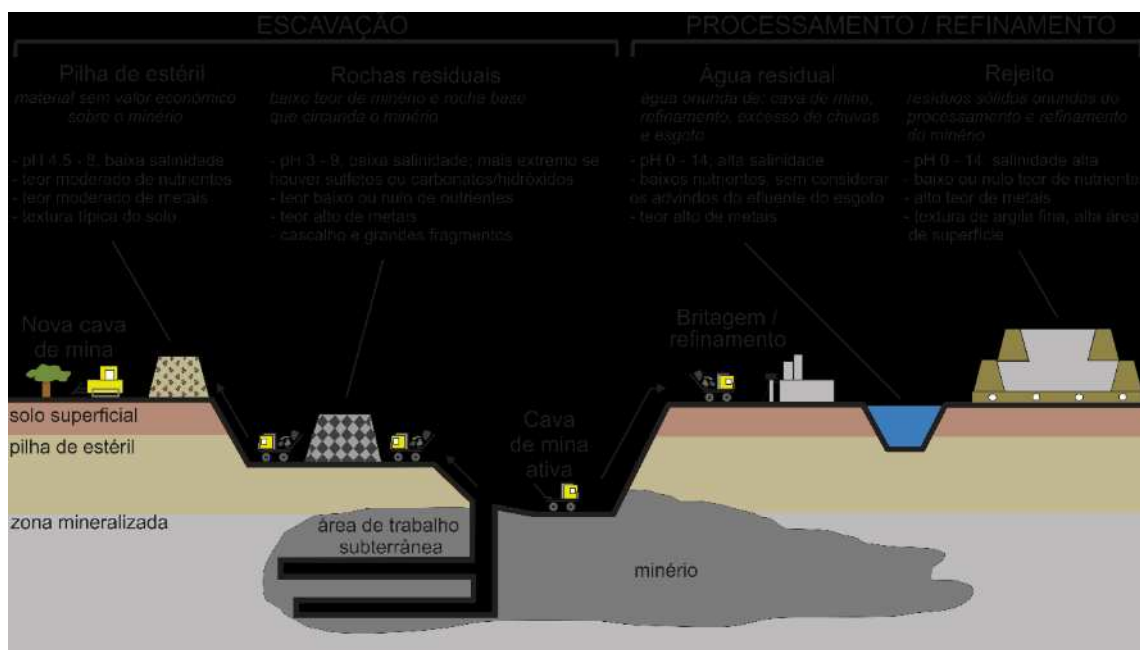
A mineração de ferro é responsável, pela maior porcentagem do produto nacional bruto de muitos países e também por impactos mais significativos no ecossistema, pois toda a cadeia produtiva, que vai da extração ao depósito de resíduos e rejeitos estéreis modifica intensamente a paisagem local (Chatuverdi *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018).

As regulações governamentais sobre as operações de mineração em vários países estabelecem as diretrizes e políticas de gestão ambiental, que referem-se invariavelmente à necessidade de remediar, recuperar, reabilitar, restaurar ou alguma combinação dessas práticas, após o descomissionamento do local de mineração (Lima *et al.*, 2016; Garris *et al.*, 2016; Macdonald *et al.*, 2015). No entanto, as características específicas dos diferentes sítios de pós-mineração como geologia, mineralogia e as propriedades físico-químicas do solo, associadas ao distúrbio causado pela mineração, conduzem a abordagens diferentes para gerenciar a reabilitação desses locais, o que dificulta e torna desafiadora a determinação dessas práticas pós-mineração (Claassens *et al.*, 2012; Kuter, 2013; Carrenho *et al.*, 2018).

No contexto da mineração, a restauração refere-se à reintegração do ecossistema pré-mineração em todos os seus aspectos estruturais e funcionais (Maiti, 2013). Se o restabelecimento do ecossistema original não é viável, mas a intenção é recuperar um dos serviços ecossistêmicos fornecidos pelo ecossistema original chega-se à recuperação (Lima *et al.*, 2016). Um exemplo desta prática seria a estabilização física de um terreno minerado para trazer o solo de volta ao estado apropriado que poderia hospedar os habitantes originais, ou aqueles similares aos originais (Kuter, 2013; Bozzano *et al.* 2014, Lima *et al.*, 2016; Festin *et al.*, 2018). A reabilitação, por sua vez, implica na reparação de processos ecossistêmicos, produtividade e serviços, próxima à condição anterior de uso da terra, ou para um novo ecossistema se as perturbações no ecossistema forem muito extremas (Festin *et al.*, 2018). Inclui um estado ecológico equilibrado, que não contribui substancialmente para a deterioração ambiental e seja consistente com os valores estéticos circundantes (Maiti, 2013; Festin *et al.*, 2018).

No processo de mineração para a extração do ferro (Fig. 1), ocorre a remoção da vegetação, da camada superficial (*topsoil*, relativo aos horizontes A e B do solo) e qualquer outra camada do subsolo necessária para acessar o minério (Strohmayr, 1999; Lima *et al.*, 2016; Festin *et al.*, 2018). Essas camadas de *topsoil* e subsolo, sem potencial econômico para beneficiamento do minério (pilha de estéril) são estocadas separadamente até que as atividades de mineração sejam concluídas, o subsolo seja reaplicado e nivelado

e o *topsoil* seja utilizado para recobri-lo (Strohmayer, 1999; Dangi *et al.*, 2012). A purificação do minério de ferro pode ser realizada pela pirometalurgia, que envolve o uso de tratamento térmico e gera subprodutos de alta temperatura (escória) ou hidrometalurgia, que envolve a utilização de meio aquoso, e resulta em subprodutos de refino aquoso geralmente dispostos em lagoas, resultando em barragens de rejeitos (Festin *et al.*, 2018; Santini e Gagen, 2018).



**Fig. 1.** Esquema da mineração de ferro nas etapas de escavação e refinamento do minério. Fonte: Santini e Gagen, (2018) adaptado

Durante a mineração são gerados volumes substanciais de resíduos, que são rejeitos triturados e quimicamente tratados, dos quais os minérios foram extraídos e, frequentemente, possuem estrutura física e hidrologia precárias, geoquímica instável e condições químicas potencialmente tóxicas (Kumaresan *et al.*, 2017; Barnejee *et al.*, 2018). Como resultado, os impactos pós-mineração envolvem a desestruturação física do solo, um aumento inicial da mineralização da matéria orgânica, compactação, diluição de nutrientes com alterações significativas nos componentes físicos, químicos e biológicos do solo, este último inclui a estrutura da comunidade microbiana, o que dificulta o estabelecimento da vegetação, tornando os processos naturais de revegetação e a sucessão espontânea de plantas lentas ou mesmo impossíveis. (Dangi *et al.*, 2012; Lienbenberg *et al.*, 2013; Kneller *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2013).

A recomposição das características edáficas é diretamente relacionada ao estabelecimento de comunidades de plantas e atividade biológica do solo, que inclui os microrganismos (Claassens *et al.*, 2005). A existência de microrganismos em sítios de mineração resulta na capacidade dos mesmos de acoplarem transformações geoquímicas para promover o crescimento ou mediar as transformações metálicas, como parte de uma resposta adaptativa, que os permite tolerar a toxicidade destes ambientes (Garris *et al.*, 2016). A avaliação do sucesso da recuperação se concentra na medição da ocorrência e distribuição da comunidade da microbiota edáfica, que é regulada pelas interações entre as disponibilidades de C e nutrientes (Sheoran *et al.*, 2010). Assim, o papel crítico desempenhado pelas comunidades microbianas para o progresso da reabilitação em áreas de mineração tem sido reconhecido (Claassens *et al.*, 2012).

No processo de reabilitação em ambientes de mineração, um dos aspectos mais críticos é a melhoria do rejeito para sustentar o crescimento de plantas (Claassens *et al.*, 2005). Uma vez que os subprodutos abundantes da mineração apresentam consideráveis restrições abióticas que comprometem a sobrevivência das plantas e microrganismos (Kumaresan *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018), a introdução de resíduos orgânicos como o uso de esterco, palha, cama de frango tem se mostrado promissoras em estratégias para a revegetação de locais pós mineração, pois estimulam a atividade microbiana e introduzem quantidades consideráveis de nutrientes para o crescimento vegetal (Sheoran *et al.*, 2010; Festin *et al.*, 2018).

Plantas que crescem e/ou são nativas de sítios de mineração, geralmente são tolerantes a metais pesados (Leung *et al.*, 2007; Festin *et al.*, 2018). As gramíneas também são consideradas como boas candidatas à fitorremediação, processo no qual as plantas são utilizadas para degradar, extrair, conter ou imobilizar contaminantes de solo ou água visando a melhoria da ecologia do solo perturbado (Yang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015). Gramíneas como *Paspalum densum* (Poir.) são espécies de plantas pioneiras no processo de sucessão vegetal, que possuem características morfológicas e fisiológicas que lhes permitem sobreviver em ambientes hostis, sobretudo em elevadas concentrações de ferro (Jacobi *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2014; siqueira- Silva *et al.*, 2019). Assim, apresentam um grande potencial na recomposição de áreas degradadas pela mineração (Maiti & Maiti, 2015).

A inoculação de microrganismos é considerada benéfica e necessária para a restauração ecológica dos ecossistemas perturbados pela mineração, uma vez que têm o potencial de aliviar e minimizar os efeitos tóxicos de metais pesados no solo e valores extremos de pH (Festin *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017). O uso de fungos micorrízicos

arbusculares (FMAs) como inóculo pode ser particularmente importante para o estabelecimento bem-sucedido das comunidades de plantas em locais de mineração, pois as restrições ambientais dificultam a recuperação da biota do solo sem o auxílio destes fungos (Eman, 2016; Rapai *et al.*, 2016). Estes simbioses mutualistas beneficiam as comunidades vegetais, aumentam a resistência ao estresse biótico e abiótico, aumentam a diversidade e abundância de microrganismos benéficos para a planta além de contribuir para a agregação e estabilização do solo (Asmelash *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017).

A produção de inoculante micorrízico pelo método *on-farm* é uma alternativa para estimular o uso de inoculante microbiano no sistema de produção vegetal (Czerniak e Stürmer, 2014), consiste em explorar a colonização micorrízica com isolados fúngicos adaptados às condições locais, o que pode ser mais eficaz, em algumas situações, do que introduzir inóculos obtidos de outros locais (Douds *et al.*, 2005). Este método tem sido largamente adotado, uma vez que utiliza o solo nativo, o que aumenta significativamente o crescimento das plantas e reduz o custo do inóculo. Todo esse processo pode ser realizado em condições naturais ou mesmo controladas, com uma única ou várias espécies de FMAs selecionados e com uma grande variedade de substratos (Gaur *et al.*, 2000; Douds *et al.*, 2005; Ijdo *et al.*, 2011). Além de apresentar baixo custo, pois pode ser empregado em potes ou vasos de mudas de tamanhos variados ou ainda, em caixas elevadas (Millner & Kitt, 1992; Douds *et al.*, 2005).

Diante do exposto, o conhecimento da diversidade das comunidades microbianas em sítios de pós-mineração é de suma importância, pois possibilita identificar e compreender os parâmetros de distribuição das mesmas, com intuito de implementar estratégias de conservação e recomposição vegetal. Os nossos estudos foram conduzidos na mina Retiro das Almas, localizada em Minas Gerais, na região do Quadrilátero Ferrífero, uma das mais importantes reservas de minério de ferro do Brasil. Dentro da mina Retiro das Almas, dois sítios de: pós-mineração, atualmente revegetado e outro sítio nativo, não perturbado pela mineração foram alvo dos nossos estudos de levantamento do microbioma e também de introdução da gramínea tolerante ao ferro *Paspalum densum* (Poir.) com inóculos de FMAs obtidos pelo método *on-farm* e adubação orgânica para fins de revegetação na área pós-mineração.

O levantamento das comunidades de Procariotos, demonstrado no capítulo 1 permitiu correlacionar e evidenciar que a matéria orgânica, Fe, acidez potencial, argila dispersa, Ca, pH e P foram umas das características físico-químicas mais significativas ( $p < 0.05$ ) para a distribuição da comunidade de procariotos e que ambos os sítios nativo e pós-mineração revegetado compartilham grupos taxonômicos, assim como funções

metabólicas preditivas semelhantes, o que pode ser um indicativo da resiliência do sítio revegetado em direção ao sítio nativo.

No capítulo 2, o estudo das comunidades de fungos seguiu uma abordagem semelhante ao capítulo 1, porém a introdução da variável tempo evidenciou a dinâmica das comunidades fúngicas nos períodos estudados. A influência espacial do sítio nativo, relacionadas aos nutrientes do solo, juntamente com período seco demonstraram efeitos sobre a estrutura das comunidades fúngicas, que também exibiram padrões complexos de distribuição e abundância, sobretudo o filo Glomeromycota.

Por fim, o capítulo 3 mostrou os efeitos distintos da aplicação da cama de frango e inóculos de FMAs obtidos pela técnica *on-farm*, na biomassa e colonização micorrízica de *Paspalum densum* (Poir.), em rejeito de mineração, sob casa de vegetação, e em pilha de estéril, no campo. A composição da comunidade fúngica de cada inoculante evidenciou a riqueza do inóculo nativo, que também foi o mais eficiente, em conjunto com a cama de frango, na biomassa de *P. densum*, em casa de vegetação. Nas duas condições estudadas o papel da cama de frango foi crucial tanto para a biomassa da planta como para a colonização micorrízica, sendo amplamente recomendado para a revegetação pós-mineração.

## Referências

Araújo, T.O.; Freitas-Silva, L.; Santana, B.V.N.; Kuki, K. N.; Pereira, E.G.; Azevedo, A. A.; da Silva, L.C. (2014) Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:2777–2784

Asmelash, F., Bekele, T., & Birhane, E. (2016) The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in the restoration of degraded lands. In *Front. Microbiol.* 7: pp. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01095>.

Barnejee, R. Goswami, P.; Mukherjee, A. (2018) Stabilization of iron ore mine spoil dump sites with vetiver system. In: Prasad, M.N.V.; Favas, P.J.C.; Maiti, S.K. (eds) *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. Elsevier.

Bozzano M.; Jalonen, R.; Thomas, E.; Boshier, D.; Gallo, L.; Cavers, S.; Bordács, S.; Smith, P.; Loo, J. (2014) Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. *State of the World's Forest genetic resources—thematic study*. Rome, FAO and Bioversity International.

Carrenho, R.; Alves, L. de J.; Santos, I de S. (2018) Arbuscular mycorrhizal fungi, interactions with heavy metals and rehabilitation of abandoned mine lands. In: In: Prasad,

M.N.V.; Favas, P.J.C.; Maiti, S.K. (eds) *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. Elsevier. pp. 271-272.

Chaturvedi, N.; Ahmed, Md. J.; Dhal, N.K. (2014) Effects of iron ore tailings on growth and physiological activities of *Tagetespatula* L. *Journal of Soils and Sediments* 14: 721-730.

Claassens, S.; Riedel, K.J.; van Rensburg, L.; Morgenthal, T.L. and Jansen van Rensburg, P. J. (2005) Soil microbial properties in coal mine tailings under rehabilitation. *Appl. Ecol. Env. Res.*, 4:75–83.

Claassens, S.; van Rensburg, P.J.; Liebenberg, D. (2012) A Comparison of microbial community function and structure in rehabilitated asbestos and coal discard sites. *Water Air. Soil. Pollut.* 223:1091–1100.

Dangi, S.R.; Stahl, P.D.; Wick, A.F.; Ingram, L.J.; Buyer, J.S. (2012) Soil microbial community recovery in reclaimed soils on a surface coal mine site. *Soil. Sci. Soc. Am. J* 76:915–924.

Douds, D. D.; Nagashi, G.; Pfeffer, P.E.; Kayser, W.M.; Reider, C. On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum (2005) *Can. J. Plant. Sci.* 85: 15-21.

Eman, T. Local soil, but not commercial AMF inoculum, increases native and non-native grass growth at a mine restoration site (2016). *Restor. Ecol.* 24:35–44.

Festin, E. S.; Tigabu, M.; Chileshe, M. N.; Syampungani, S.; Odén, P. C. (2018) Progresses in restoration of post-mining landscape in Africa *J. For. Res.* doi:10.1007/s11676-018-0621-x.

Garris, H.W.; Baldwin, S.A.; Van Hamme, J.D.; Gardner, W.C.; Fraser, L.H. (2016) Genomics to assist mine reclamation: A review. *Restoration Ecology*, 24: 165–173. <https://doi.org/10.1111/rec.12322>.

Gaur, A.; A. Adholeya and K.G. Mukerji. (2000) On-farm production of VAM inoculum and vegetable crops in marginal soil amended with organic matter. *Trop. Agric.* 77:21-26.

Guo, W.; Zhao, R.; Yang, H.; Zhao, Ji.; Zhang, J. (2013) Using native plants to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on revegetation of iron tailings in grasslands. *Biol. Fert. Soils.* 49:617–626. DOI 10.1007/s00374-012-0751-9.

Ijdo, M.; Cranenbrouck, S.; Declerck, S. (2011) Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. *Mycorrhiza* 21:1–16.

Jacobi, C.M.; do Carmo, F.F.; Vincent, R.C.; Stehmann, J.R. (2007) Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodivers Conserv* 16:2185–2200. DOI 10.1007/s10531-007-9156-8

Kneller, T.; Harris, R.J.; Bateman, A.; Muñoz-Rojas, M. (2018) Native-plant amendments and topsoil addition enhance soil function in post-mining arid grassland, *Sci. Total Environ.* 621: 744-752

Kumar, S.; Singh, A.K.; Ghosh, P. (2018) Distribution of soil organic carbon and glomalin related soil protein in reclaimed coal mine-land chronosequence under tropical condition. *Sci. Total Environ.* 625: 1341–1350.

Kumaresan D, Cross TM, Grez, MB, Kariman K, Nevill P, Stevens J. *et al.* (2017) Microbial Functional Capacity Is Preserved Within Engineered Soil Formulations Used In: Mine Site Restoration. *Sci. Rep.*7: 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00650-6>.

Kuter, N. (2013) Reclamation of degraded landscapes due to opencast mining, advances in landscape architecture. <http://www.intechopen.com/books/advances-in-landscape-architecture/reclamationof-degraded-landscapes-due-to-opencast-mining>. Accessed 15 Jan 2019.

Liebenberg, D.; Claassens, S.; Van Rensburg, L. (2013) Insights and lessons learned from the long-term rehabilitation of an iron ore mine. *International Journal of Environmental Research* 7: 633-644.

Lima, A.T.; Mitchell, K.; O'Connell, D.W.; Verhoeven, J.; Van Cappellen, P. (2016) The legacy of surface mining: remediation, restoration, reclamation and rehabilitation. *Environ Sci Policy* 66:227–233.

Leung, H.M.; Ye, Z.H.; Wong, M.H. (2007) Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere* 66: 905–915.

Macdonald, S.E, Landhäusser, S.M., Skousen, J., Franklin, J., Frouz, J., Hall, S., Jacobs, D.F., Quideau, S. (2015) Forest restoration following surface mining disturbance: challenges and solutions. *New Forests* 46:703–732.

Maiti, S.K. (2013) Ecology and Ecosystem in Mine-Degraded Land. In: *Ecorestoration of the coalmine degraded lands*. Springer, India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-0851-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-0851-8_2).

Maiti, S.K.; Maiti, D. (2015) Ecological restoration of waste dumps by topsoil 1 blanketing, coirmatting and seeding with grass-legume mixture. *Ecol. Engin.* 77: 74-84.

Millner, PD; Kitt, DG. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (1992). *Mycorrhiza*, 2:9-15.

Pinheiro, G.M.S (2018) Ferruginous Geosystems and the Current Situation of Iron in Brazil: Economic Growth or Environmental Regression? In: Acevedo, R. D., Frías, J. M. (eds) *Geoethics in Latin America*. The Latin American Studies Book Series. Springer, Cham.

Rios, C. O.; de Souza, B.C.; Siqueira-Silva, A.I.; Pereira, E.G. (2017) Assessment of iron toxicity in tropical grasses with potential for revegetating mined areas. *Pol. J. Environ. Stud.* 26:2167-2173. DOI: 10.15244/pjoes/68429.

Rapai, S. B.; Hunt, S.; Bainard, L.D.; Turgeon, M-H e Newmaster, S. G. (2016) Soil Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi Promotes the Growth of Boreal Plant Communities in Gold Mine Overburden 34: 216-224.

Santini, T. C. and Gagen, E. J. (2018) The geomicrobiology of mining environments. *Microbiol. Aust.* 39:37– 41.

Silva, A.O.; Costa, A. M.; Teixeira, A.F.S.; Guimarães, A.A.; Santos, J.V. Moreira, F.M.S. (2018) Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. *Ecol. Indic.* 93: 142-151.

Siqueira-Silva, A. I., Rios, C. O., & Pereira, E. G. (2019) Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers. *J. Environ. Sci.*, 78, 257-266.

Strohmayer, P. (1999). Soil stockpiling for reclamation and restoration activities after mining and construction. *Restoration and Reclamation Review*, 4: 1-4.

Yan, D.; Zhao, F. & Sun, O. J. (2013) Assessment of vegetation establishment on tailings dam at an iron ore mining site of suburban Beijing, China, 7 years after reclamation with contrasting site treatment methods. *Environ. Manage.* 52:748–757, doi:10.1007/s00267-013-0092-y.

Yang, Y.; Liang, Y.; Ghosh, A.; Song, Y.; Chen, H.; Tang, M. (2015) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi status and heavy metal accumulation characteristics of tree species in a lead–zinc mine area: potential applications for phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res.* 22: 13179. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4521-8>.

Zhou, L.; Li, Z.; Liu, W.; Liu, S.; Zhang, L.; Zhong, L.; Luo, X.; Liang, H. (2015) Restoration of rare earth mine areas: organic amendments and phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 22:17151–17160. DOI 10.1007/s11356-015-4875-y.

Sheoran V, Sheoran, AS., & Poonia, P (2010) Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water*, 3: 1–21. <https://doi.org/Available> at: <http://scholarworks.umass.edu/intljssw/vol3/iss2/13>.

Wang, F. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applications (2017) *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 47: 1901–1957. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1400853>.

## **CAPÍTULO 1: Iron exploration mine after 10 years of closure of activities revealed higher diversity of prokaryotes at the post-mining site in contrast to adjacent native site**

### **Abstract**

Prokaryotes play crucial roles in revegetation process to restore the ecologic integrity of disturbed areas. This work reported profiles of N-fixers microorganisms and Actinobacteria, as well as embracing prokaryotic composition, physicochemical soil characteristics and the microbial putative functions of prokaryotic taxa, comparing a mining disturbed site, deactivated about ten years ago, when revegetation process was begun and a reference site, both in the Quadrilátero Ferrífero region, in Minas Gerais State, Brazil. In both sites archaeal and bacterial groups, like Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria and Verrucomicrobia were reported as most abundant, and revealed differences in their diversity indices and distribution. Proteobacteria and Actinobacteria were most abundant in revegetated site (RV), while Acidobacteria and Verrucomicrobia in reference site, with natural vegetation (NT). Furthermore, exclusive and less abundant phylum Bathyarchaeota (Archaea) and GAL 15 (Bacteria), were found only in NT, while Gracilibacteria, Ignavibacteriae, BJ-169 and BRC1 were only found in RV. The majority identified bacterial genera were shared by RV and NT. The soil chemical and physical characteristics displayed differences that driven the prokaryotic composition and organic matter (OM), Fe, potencial acidity (H+Al), dispersed clays, Ca, pH and P were one of the most significant ( $p < 0.05$ ). Putative metabolic features revealed the predominance in both sites of the nitrogen and carbon metabolism. We concluded that revegetation at iron mining site after ten years of mining closure reveal higher prokaryotes diversity compared to NT site and prokaryotic community distribution is directly related to the physical-chemical characteristics of the soil. Thus, the similarities in the taxonomy of prokaryotes, furthermore N and C predictive metabolism is indicative of resilience of RV toward to NT site.

**Keywords:** Actinobacteria, nitrogen fixing bacteria, Quadrilátero Ferrífero, microorganisms

## Introduction

Post-mining activities require a mitigating process to restore the ecological integrity of areas under the recovery process [1, 2], including restoration of soil characteristics, revegetation and microbiota reestablishment [3, 4, 5], which promotes essential ecosystem services, such as the cycling of organic matter and the biological fixation of nitrogen.

The difficulties of revegetation in post-mining sites are due to changes in the physico-chemical and biological properties of topsoil and subsoil, which may take decades or centuries to reach ecological stability levels [1, 6, 71]. For accelerate this process, woody and herbaceous species such as legumes (Fabaceae) and grasses (Poaceae) have been introduced, mainly those tolerant and effective in acid soils and with high concentrations of heavy metals [1, 7]

Rhizosphere of plant species tolerant to heavy metals and toxic elements are associated with prokaryotes, and help in the revegetation process of derelict mining environments [8], such as Firmicutes, Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, *Nitrospira* e Archaea: *Ferroplasma*, *Thermoplasma*, *Sulfolobus*, *Methanothermus* [8, 9, 10]. Prokaryotic community communities adapted to mining environments play a significant role in plant growth due capacity to solubilize phosphate, to biologically fix nitrogen, to produce phytohormones and to increase tolerance to biotic and abiotic stress. Furthermore, play a significant role in plant growth and detoxification from harmful chemicals at these sites [2, 11]. The complexity, functions and microbial composition in post-mining environments are incipient [12]. Thus, the characterization of microbial communities in mining environments undergoing restoration provides comprehension into how undisturbed ecosystems and revegetation areas work [10, 13].

Actinobacteria can tolerates stress conditions in heavy metal contaminated soils [14, 15], due to mechanisms such as production of chelants that reduce metal toxicity [16]. Thereby, constitute an important functional group in processes of bioremediation and ecological restoration [17]. Rhizobia participates of nitrogen fixing and favor the succession of plant and microorganisms more sensitive to low N availability [18, 19]. Furthermore, rhizobia present high abundance and genetic diversity, with formation of a greater number of nodules in soil coming from rehabilitated areas, when compared to adjacent undisturbed soils [20].

It is recognized that metals in post-mining areas can affect microbial community profile, causing population changes, including abundance, diversity and ecological

functions [21]. These evaluations were increased with fingerprint techniques, such as DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis [22, 72] and DNA sequencing, enhance the knowledge about the microbial community composition, diversity and complexity in post-mining sites [2, 23].

However, there are gaps in the application of microbial genomics to monitor, understand and propose solutions for post-mining recovery for mine closure [23, 2]. However, there are gaps in the application of microbial genomics to monitor, understand and propose solutions for post-mining recovery for mine closure [2, 23]. Considering that the resilience is the process of a community under stress persist, maintain or recovery their original or new state, in terms of composition and function succeeding disturbance [73,74], we hypothesized that the community structure of microbial taxonomic and functional groups reveals soil resilience to important functions performed by microorganisms after 10 years of mine closure. Thus, we aimed to compare, to infer the putative function by prokaryotic composition and evaluate the effect of soil physicochemical properties in this prokaryotic community. Two sites inside a mining area were assessed: one post-mineration site, under revegetation process (RV) and other adjacent undisturbed, native site (NT).

## **Methodology**

### **Site and sampling design**

The study sites are located in the Retiro das Almas mine, which belongs to the Vale SA Company, located in the municipality of Ouro Preto, southern region of in Minas Gerais state and deactivated about ten years ago (Fig. 1a).

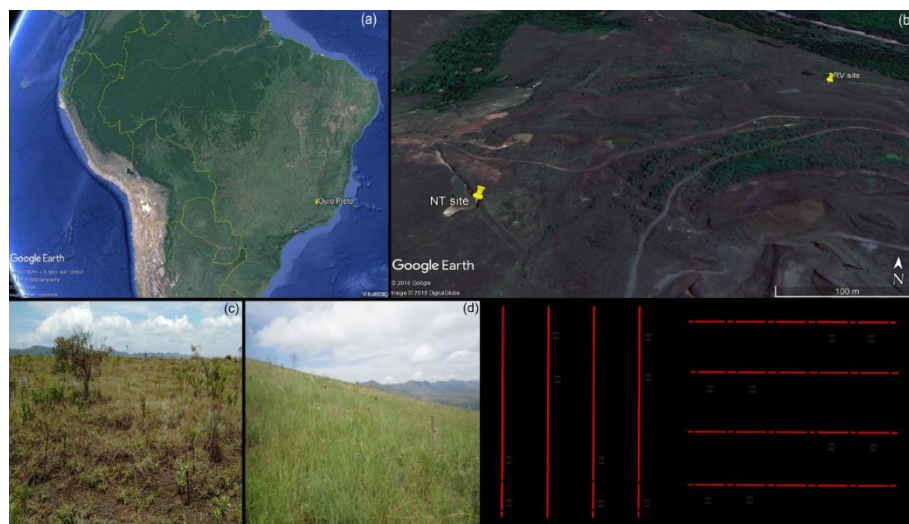
The Retiro das Almas mine are placed in Quadrilátero Ferrífero, one of the largest iron ore sources in Brazil, with an area of approximately 7,000 km<sup>2</sup>, located in the central-southeastern region of Minas Gerais [24]. The climate is humid subtropical, according to Köpper classification [25]. The annual average rainfall is 1,386 mm, the rainy season occurring from October to March and the dry season, from April to September. The annual average temperature is 20.1 °C.

The sampling was carried out in the dry season (June of 2015). Two different sites inside the mine, with a distance approximately 350 m were assessed: an overburden site, under revegetation process (RV) (S 20°24'09, 7" W43°52'02.9") and a reference mining undisturbed site, of native vegetation (NT) (S 20°24'17, 1" W43°54'15.8"), which has never been exploited and was considered as natural control (Fig. 1b, c and d). The total

area sampled for each site were 1.000 m<sup>2</sup>. Each site had a total of 20 experimental units, which were composed of five subsamples at distance of 5 m from one another, which were collected and mixed to compose four soil samples (0–20 cm deep). The soil samples under revegetation process were named RV1, RV2, RV3 and RV4, and those from the undisturbed site, NT1, NT2, NT3 and NT4 (Fig. 1e and f). These samples were used for chemical and microbial molecular analysis. Two of each five subsamples were collected for physical analysis at both sites. The samples for microbial DNA analysis were stored at –20 °C in the laboratory until the time for use.

Before the mining process, both sites originally had the identical vegetal composition, similar to the ferruginous rock grasslands found in other areas of Quadrilátero Ferrífero. The most prevalent angiosperm families reported in these areas were: Asteraceae, Orchidaceae, Poaceae, Melastomataceae, Cyperaceae, Myrtaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Bromeliaceae, Solanaceae and Velloziaceae [26, 27]. Basically, the vegetation of ironstone outcrops from ferruginous rock grasslands are adapted to substrates abundant in heavy metals, and possibly contains metallophytes or at least metal-tolerant species [26].

Under RV, the most common plants were *Andropogon bicornis* L., *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC and *Baccharis reticularia* DC. During the revegetation process, other species, such as *Brachiaria* sp., *Crotalaria* sp., *Sthylosantes* sp., *Mimosa scabrella* Benth. and an exotic species of grass, *Melinis minutiflora* P. (Beauv.), were introduced. The most abundant plant species in NT were: *A. satureioides* (Lam.) DC, *B. reticularia* DC, *Paspalum guttatum* Trin. and *Echinolaena inflexa* (Poir.) Chase.



**Fig. 1** The study area and sampling sites. **(a)** Municipality of Ouro Preto, in the southern region of the state of Minas Gerais, Brazil. **(b)** RV and NT sites location **(c)** characteristic vegetation of site RV. **(d)** characteristic vegetation of site NT. **(e)** Sampling scheme of RV site. **(f)** Sampling scheme of NT site.

#### **DNA extraction, Nested-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis for NFB and actinobacteria**

The total DNA was extracted from 0.5 g of soil, using NucleoSpin® Soil kit (Macherey-Nagel Laboratories, Bethlehem, PA, USA), according to the manufacturer's instructions.

The Nested PCR was performed with the total DNA in two steps to amplify the specific regions of the *nifH* gene, for NFB, and the 16S rRNA gene, for Actinobacteria. The first pair of primers used to amplify the *nifH* gene was 19F (5'GCIWPTYTAYGGIAARGGIGG-3') and 407R (5'-AAICCRCCRCAIACIACRTC-3') [28]. The PCR mixture consisted of: 1 µL of template DNA (20 ng), 0.2 µM of each oligonucleotide, 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 µg µL<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA), 10 µM Go Taq flex buffer and 0.25 µL of GO Taq DNA polymerase (equivalent to 1.25 units of GO Taq DNA polymerase) (Promega, Madison, USA) in a total reaction volume of 50 µL. The cycling conditions were made according to Coelho *et al.* [29]. The specific primers for the second reaction were: 278R (5'-GCGCAGCCCIACICCCIGGYTC- 3') and 19F-GC (5'GCIWPTYTAYGGIAARGGIGG-3') [30]. The other mixture components, final volume and amplification conditions followed the same standards of the first step.

The first pair of primers used to amplify actinobacterial 16S rRNA gene fragment was composed of S-C-Act-0235-a-S-20F (5'- CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3') and

S-C-Act-878-a-A-19R (5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3') [31]. The first PCR step mixture consisted of: 1 µL of template DNA (20 ng) 0.2 µM of each oligonucleotide, 0.4 mM dNTP, 0.8 µg µL<sup>-1</sup> bovine serum albumin (BSA), 10 µM Go Taq buffer and 0.25 µL of GO Taq DNA polymerase (equivalent to 1.25 units of GO Taq DNA polymerase) (Promega, Madison, USA) in a total reaction volume of 50 µL. Amplification was performed by 30 cycles of 45 s of denaturation at 95 °C, 45 s at 60 °C for primer annealing, and 1 min at 72 °C for primer extension, followed by a final step at 72 °C for 5 min cooling to 4 °C. The specific primers to the second PCR were: F243A (5'-GGATGAGCCCGCGGCCTA-3') and R513-GC (5'-gc. -CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA-3') and the cycling conditions were made according to Silva *et al.* [32].

In order to confirm the presence of the DNA fragments for BFN and Actinobacteria, 5 µL products of the second step of PCR were checked by agarose gel electrophoresis (1.5% w / v) stained with ethidium bromide and visualized under UV light in the Molecular Imaging System photodocumentator (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

The DNA fragments obtained from the nested-PCR were analyzed by DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Samples containing 20 µL of PCR products ranging from 150 to 200 ng of DNA were loaded onto an 8 % (w/v) polyacrylamide gel in a 1 X Tris-acetate- EDTA (TAE) buffer. The denaturing gradient gel ranged from 50 to 65 % for NFB amplicons [33] and from 40 to 60 % for Actinobacteria amplicons (where 100 % denaturation indicates a concentration of 7 mol L<sup>-1</sup> urea and 40 % [v/v] formamide).

The gels were subjected to vertical electrophoresis at a constant temperature (60 °C) and voltage (100 V) for 12h and then stained for 40 min with Sybr Gold (1x) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The gels were then photographed under UV light on a Molecular Imaging System (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi). The DGGE profiles were analyzed using the BioNumerics software system (Version 5.1, Applied Maths NV). The dendrograms were constructed by the Pearson correlation index and cluster analysis, by the unweighted pair group method, using arithmetic averages (UPGMA).

### **Illumina sequencing of 16S rRNA gene amplicons and Bioinformatic analysis**

The paired-end sequencing (2 x 250 bp) of DNA was performed on an Illumina MiSeq sequencer, using the primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), which target the V4 region of the 16S SSU rRNA. The sequences were analyzed using Quantitative Insights into Microbial

Ecology (QIIME, version 1.17) [34] USEARCH [35], UCHIME [36] and UPARSE (version 7.1) (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>), following the pipeline implemented by the Brazilian Microbiome Project (BMP) [37]. The raw FASTQ files were de-multiplexed and quality-filtered to obtain a minimum average quality score of 20 using USEARCH [35]. Chimeric sequences were identified and removed using UCHIME. Operational taxonomic units (OTUs) were classified at a 97 % similarity level using UPARSE (version 7.1) and, for each OTU, the taxonomy was assigned based on the Silva database version 128. QIIME was used to generate rarefaction plots with the observed OTUs of each sample and alpha diversity metrics (such as: ACE, Chao 1, Dominance, Simpson and Shannon).

### **Soil chemical and physical properties**

The soil chemical properties were analyzed at the Laboratory of Analysis of Soil, Plant Tissue and Fertilizer, in the Universidade Federal de Viçosa. The soil pH was measured using the 1:2.5 (v: v) soil: water suspension ratio; exchangeable Al, Ca and Mg extracted with 1 mol L<sup>-1</sup> [38]. Exchangeable P, Na, K, Fe, Zn, Mn, Cu, Cd, Pb, Ni, and Cr were extracted by Mehlich-1 extractor, (0.025 Mol L<sup>-1</sup> sulfuric acid and 0.05 Mol L<sup>-1</sup> hydrochloric acid), with the ratio solo: extractor 1:10.

Organic matter content was determined by wet digestion method according to [39]. The soil carbon content and percent soil OM was performed by multiplying percent soil organic carbon by a factor of 1.724 following the propositions that organic matter is composed of 58% carbon [39].

For soil physical analysis, the samples were air-dried and sieved through a 2.0 mm mesh sieve for analysis of the texture, granulometry, particle density, total porosity, microporosity, and macroporosity. Soil density (Sd) was obtained by the volumetric ring method [40] and the particle density (Pd), by volumetric flask, using alcohol as the penetrant liquid [41, 42]. Microporosity and macroporosity was determined from tension table method, with 0.006 MPa of water column and total porosity was obtained from macro and microporosity determination [41].

The clay and silt fractions were determined by the pipette method [42]. Stokes law was calculated in order to attain sedimentation time of these soil fractions.

## **Statistical analysis**

For each site, the ecological metrics of ACE, Chao 1, Dominance, Simpson and Shannon were compared by one-way ANOVA at 0.05 confidence, as well as the physico-chemical soil attributes that followed ANOVA assumptions. The other soil physico-chemical data were analyzed by Mann Whitney test at 0.05 confidence, using the free version of Minitab 17 statistical software.

Both Principal coordinate analysis (PCoA) and distance-based redundancy analysis (db-RDA) were calculated using a distance matrix (Bray-Curtis metric). PCoA was carried out to evaluate the differences in microbial composition. Db-RDA was used to quantify whether the variance of the microbial community distribution was due to environment variables between the sites and a Mantel test was carried out to correlate them. The significant exploratory variables, which could explain the community structure, were selected from the data set and ranked by the db-RDA results using the correlation coefficient and significance values: ( $p$ -value < 0.1) and ( $p$  < 0.05). The Vegan and Phyloseq packages in R software v.3.1.3 project (R Development Core Team. 2015)

Heatmap plots of Bacteria and Archaea composition and functional features were calculated using the packages Gplot, Vegan, Heatplus and RColorbrewer v1.0.8 in R software v.3.1.3 project (R Development Core Team. 2015). Firstly, all archaeal OTUs were used and the ten most abundant bacterial OTUs in each sample were selected. Next, it was transformed into relative abundance. The Bray–Curtis dissimilarity matrix was calculated and used to perform the heatmap.

For the functional features, all the prokaryotic genera identified were submitted to the Functional Annotation of Prokaryotic Taxa (Faprotax) software [43]. The abundance of functions related to these prokaryotes > 1% was selected and showed in bar graph

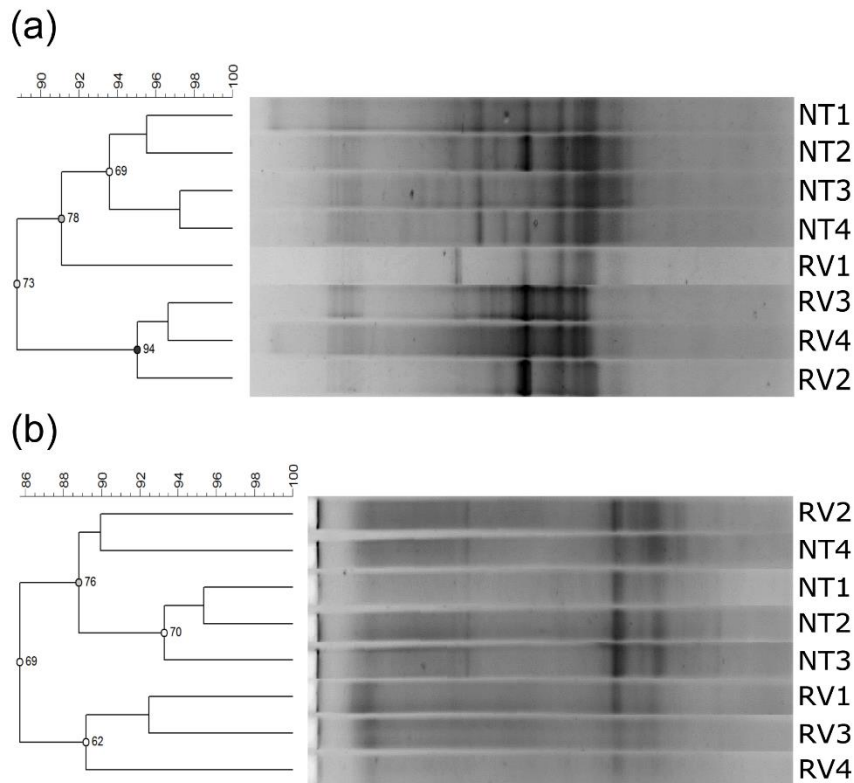
A Venn diagram of the total Bacteria genera each site was performed using the online tool <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> available at <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/>. In combination with the Venn diagram, the bacterial genera with mean > 1 % of relative abundance in each site was considered dominant.

## **Results**

### **DGGE clusters of NFB and Actinobacteria**

The community profiles of NFB and Actinobacteria exhibited separation between the samples of NT and RV. The NFB dendrogram showed two main groups with 89 %

similarity (Fig. 2a). The four samples from NT were clustered with 93 % similarity, while three samples from RV remained clustered with 95 % similarity. For NFB, the profile bands ranged from 8-19 to RV and 17-18 to NT. The Actinobacteria dendrogram (Fig. 2b) exhibited two main clusters, basically composed of RV and NT samples with approximately 86 % similarity. The profile bands ranged to 3-7 to RV and 4-7 to NT.



**Fig. 2** Dendrograms of PCR-DGGE, constructed by the Pearson correlation index and the cluster analysis by the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA). **a** Nitrogen Fixing Bacteria. **b** Actinobacteria. RV = Revegetation, with the samples RV1, RV2, RV3, RV4 and NT = natural vegetation site, undisturbed, with samples NT1, NT2, NT3, NT4. Scale = similarity (%)

### Prokaryotic composition in iron mining sites

The Illumina sequencing yielded a total of 547,025 reads from eight samples. The sequences per sample ranged from 49,489 to 64,666 and normalized to 49,489 (total archaeal sequences 979 and bacterial sequences 394,933). After quality filtering, chimeras and singletons sequences removal, an amount of 450,190 reads were obtained of which 6,447 were grouped into OTUs. The number of sequences, OTUs and measures

of diversity indices per site were summarized (Table 1). The rarefaction analysis of OTUs per sample tended to a saturation plateau, suggesting adequate sampling (Fig. 3).

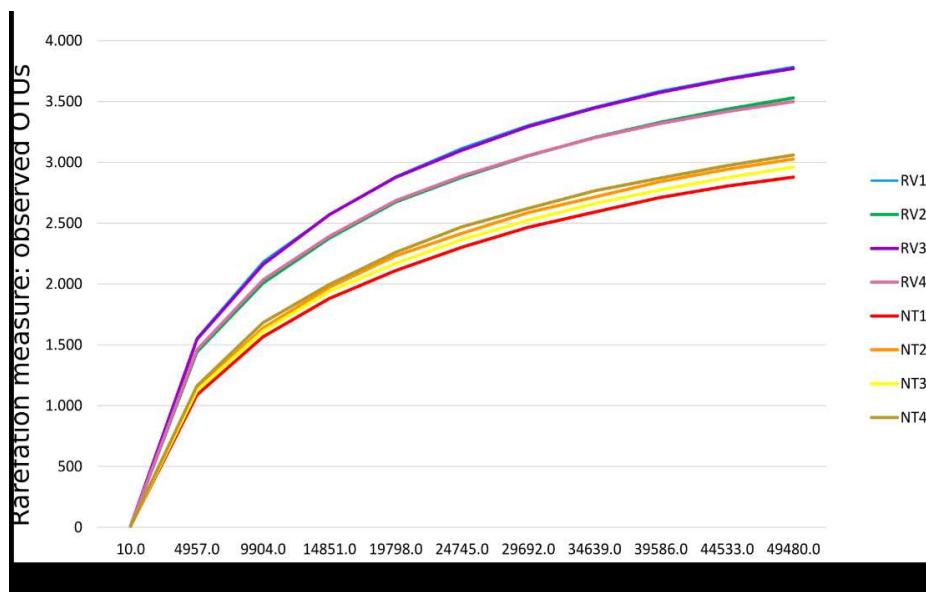
There was no significant difference in the number of sequences ( $p$ -value = 0.183). The RV presented a higher number of observed OTUs than NT ( $p$ -value = 0.000) (Table 1). RV presented lower dominance, higher ACE, Chao 1, Simpson and, therefore, higher Shannon diversity than NT ( $p$ -value = 0.000), which corroborates the complementarity of these metrics (Table 1).

Bray-curtis-based PCoA revealed strong clustering for NT microbial community, while RV samples showed higher dispersion of the RV1 sample than other samples of the RV site (Fig. 4).

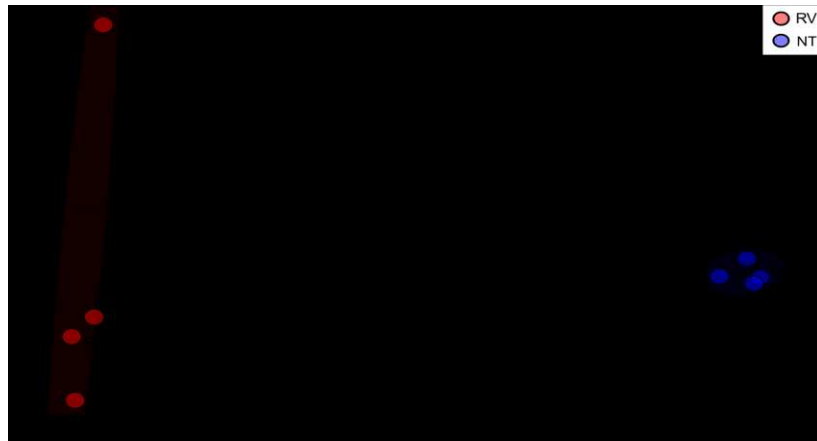
**Table 1.** Illumina MiSeq sequencing results and ecological metrics for each site: Revegetation (RV) and natural (NT). Means with different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ), by Tukey's test

Sites	Sequences	OTUs	ACE	Chao1	Dominance	Simpson	Shannon
NT	53,772a	2,984.2b	3659b	3572.8b	0.012a	83.12b	8.678b
	± 1274	± 69.4	± 112.4	± 138.7	± 0.001	± 7.17	± 0.101
RV	58,997a	3,646.5a ±	4284a	4197.7a	0.003b	360.3a	9.984a
	± 6825	153	± 163,6	± 155.8	± 0.000	± 20.6	± 0.094

± Standard deviation of the average for each of four samples of soil

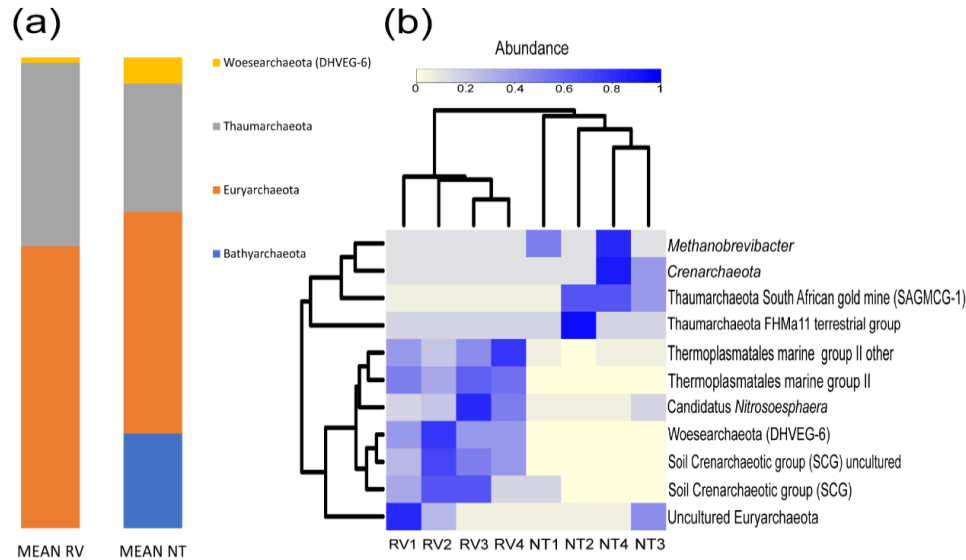


**Fig. 3** Rarefaction curve of OTUs clustered at 97 % sequence identity across samples of the revegetation site (RV) and undisturbed natural vegetation site (NT)



**Fig. 4** Principal coordinate analysis (PCoA) based on 16S rRNA gene sequencing in revegetation site RV, with the samples RV1, RV2, RV3, RV4 and undisturbed site, with natural vegetation, NT with the samples NT1, NT2, NT3, NT4

The OTUs belonging to Archaea were classified into four different phyla (Bathyarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota and Woesearchaeota). Bathyarchaeota was exclusive to the NT, specifically in NT2 and NT3 (Supplementary Material Fig. S1), corresponding to 20 % of the identified sequences (Fig. 5a). Euryarchaeota was the most abundant phylum, with a mean of 47 % in NT and 59.90 % in RV, followed by Thaumarchaeota, with 38.93 % in RV and 27.25 % in NT; and Woesearchaeota, with 1.16 % in RV and 5.56 % in NT. Only one genus was identified for Euryarchaeota (*Methanobrevibacter*) and Thaumarchaeota (*Candidatus Nitrososphaera*) (Fig 5b). The difference in Archaea abundance may be corroborated by the heatmap that separated the two sites based on their archaeal OTUs composition (Fig 5b).

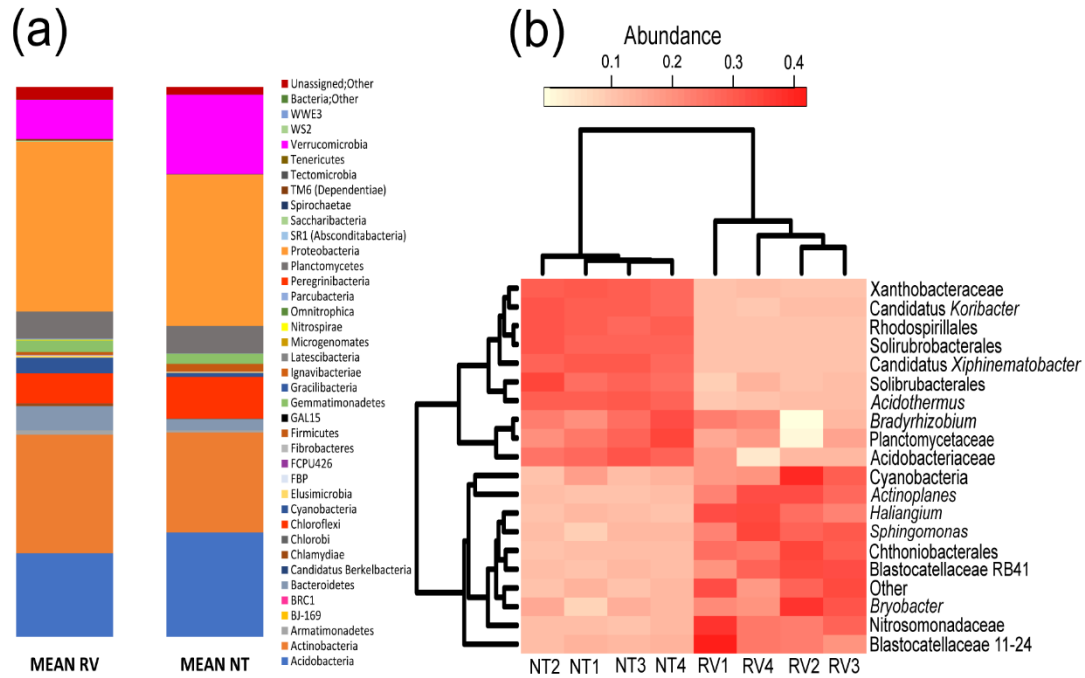


**Fig. 5** Archaeal composition revealed by high throughput sequencing of the 16S rRNA gene in the revegetation site (RV1, RV2, RV3, RV4) and undisturbed site, with native vegetation (NT1, NT2, NT3, NT4). **(a)** Bar plots show means by site of the relative phylum abundance within Archaea. **(b)** The heatmap cluster analyses of Archaeal community were based on Bray–Curtis distance matrix, calculated from all OTUs, classified in the lowest taxonomic level possible. The relative abundance values for archaeal genera are expressed by color intensity with the legend indicated at the upper right corner

Thirty eight phyla of Bacteria were found, four of which were rare and exclusive for at least one of the RV samples (Supplementary Material Fig. S2): Gracilibacteria (0.005%), Ignavibacteriae (0.001 %) and two new phyla BJ-169 (0.002 %) and BRC1 (0.004 %). The GAL 15 (0.01 %) phylum was rare and exclusive for NT. The other phyla were present at both sites, but with different abundances. Inside the Bacteria domain, the mean of unassigned OTU was 2.29 % in RV and 1.38 % in NT (Fig.6).

The most abundant bacterial phyla (Fig. 6a) in both areas were Proteobacteria (30.86 % in RV and 27.46 % in NT), followed by Actinobacteria (21.52 % in RV and 18.16% in NT), Acidobacteria (15.28 % in RV and 19.04 % in NT) and Verrucomicrobia (7.12 % in RV and 14.41 % NT). The differences between NT and RV abundance were evidenced by heatmap (Fig. 6b). Genera such as *Candidatus Koribacter* (Acidobacteria), *Candidatus Xiphinematobacter* (Verrucomicrobia), *Acidothermus* (Actinobacteria) and *Bradyrhizobium* (Proteobacteria) were more abundant in NT, while *Actinoplanes*

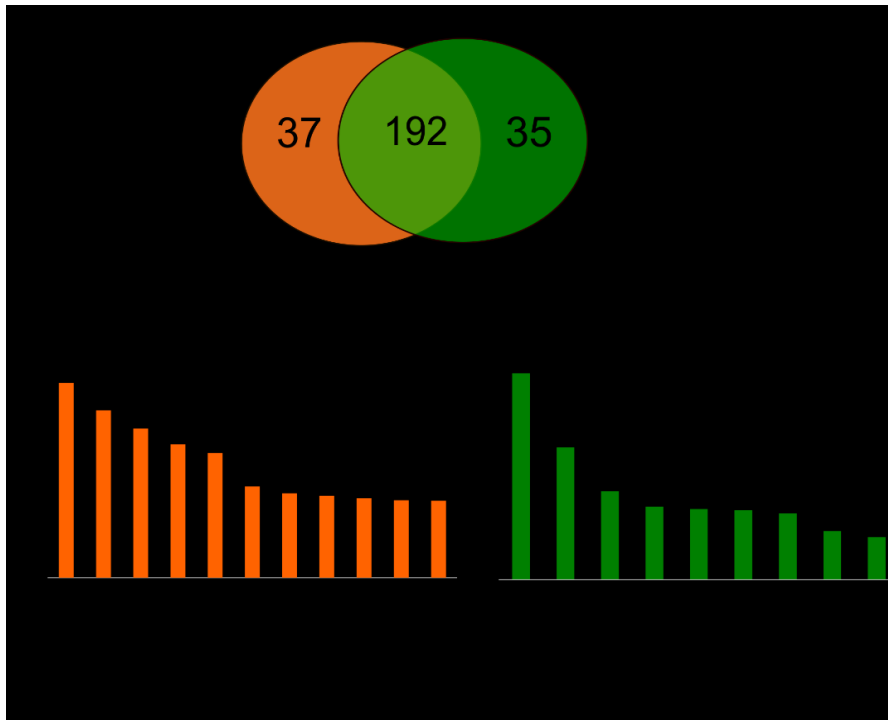
(Actinobacteria), *Haliangium* (Proteobacteria), *Sphingomonas* (Proteobacteria) and *Bryobacter* (Acidobacteria) were more abundant at the RV site (Fig. 6b).



**Fig. 6** Bacterial composition revealed by high throughput sequencing of the 16S rRNA gene in the revegetation site (RV1, RV2, RV3, RV4) and undisturbed site with native vegetation (NT1, NT2, NT3, NT4). **(a)** Bar plots show means by site of the relative abundances at the phylum level within Bacteria. **(b)** Heatmap cluster analyses of major abundances of Bacterial community, based on Bray–Curtis distance indices calculated by the ten most abundant OTUs, classified in the lowest taxonomic level possible. The relative abundance values for bacterial genera are expressed by color intensity with the legend indicated at the upper right corner

A total of 264 genera were identified, most of which were found at both sites (Fig. 7a) (Supplementary Material Table S1) and each site presented different dominant genera (Fig. 7b). In NT site, the dominant genera belonged predominantly to Acidobacteria phyla, except *Xiphymenatobacter*, which pertain to Verrucomicrobia phyla. At RV, the dominant genera resulted in the phyla: Acidobacteria (*Bryobacter*, *Solibacter*), Proteobacteria (*Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Haliangium*, *Acidibacter*,

*Anaeromyxobacter*) and Actinobacteria (*Actinoplanes*, *Jatrophihabitans*, *Pseudocardia*, *Nocardioides*).

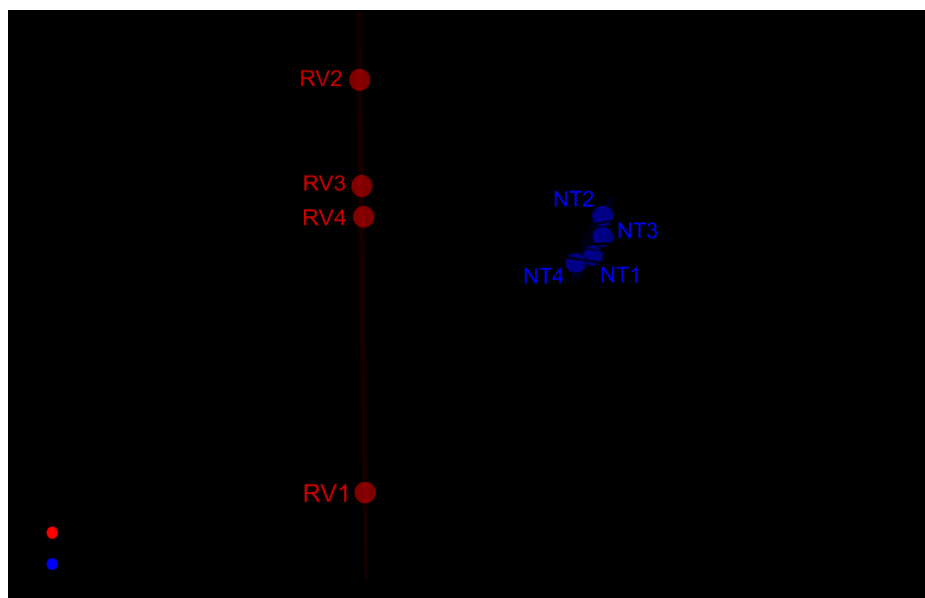


**Fig. 7** Bacterial genera found at the revegetation site (RV - orange) and native site (NT-green). **(a)** Venn diagram depicts the number of known bacterial genera in RV, NT and both sites. **(b)** Dominant genera in each site, referring to the genera with abundance > 1%

The majority of soil attributes were different in RV and NT for comparisons between averages, mainly for organic matter (OM), pH, some micronutrients like iron (Fe), copper (Cu), manganese (Mn), heavy metals as chromium (Cr), nickel (Ni), physical characteristics as macroporosity, particle density (Supplementary Material Table S2). The medians also showed differences between sites for microporosity, clay, some macronutrients as phosphorus (P) and potassium (K) (Supplementary Material Table S3).

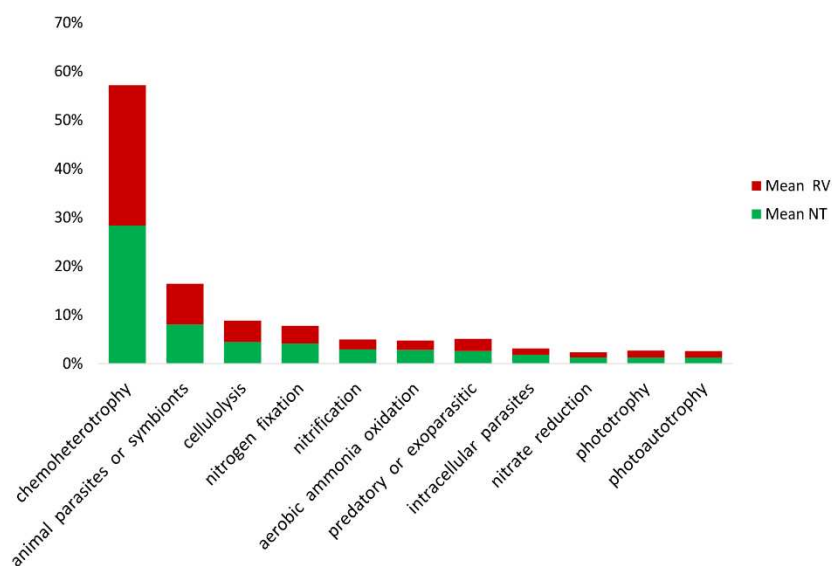
The db-RDA of soil physical-chemical characteristics and prokaryotic community composition exhibited two groups according to land-use (Fig. 8). The RV and NT were grouped into distinct clusters along the first axis, with 95.35 % of the total variation in prokaryotic community composition. Each soil physical-chemical characteristics revealed significant association with bacterial community composition (Supplementary Material Table S4), also corroborated by Mantel test (Fig. 8). While RV prokaryotic

community were grouped with particle density, pH, P, Mn and Cd, these environmental variables were negatively associated with NT prokaryotic community. The most soil physical-chemical characteristics including Fe, Mg, OM and calcium (Ca) ( $p < 0.01$ ) (Supplementary Material Table S4) were grouped with NT prokaryotic community and revealed, in turn, negative association with RV site.



**Fig. 8** Distance-based redundancy analysis (db-RDA) performed for distribution of microbial abundances and physical-chemical soil characteristics at both sites RV and NT. The values of the axis label show the percentage of the total variance explained by each axis. The free permutation was performed (999 permutations) to determine the statistical significance between the environmental variables and the response variables. The Mantel test was carried out to correlate the Prokaryotic composition and physicochemical soil characteristics performed with 999 permutations with  $p < 0.05$

The putative functional features of the prokaryotic communities were similar between RV and NT. Several microbial functions were linked to nitrogen metabolism, such as nitrogen fixation, nitrate reduction, nitrification and aerobic ammonia oxidation, in addition to cellulolysis and other functions in both sites (Fig. 9).



**Fig. 9** Putative functional characterization based in relative abundance obtained from FAPROTAX software to the samples of RV and NT

## Discussion

The composition, abundance and diversity of archaeal and bacterial groups in RV and from chemical characteristics of the soil in RV and NT present differences and influenced the distribution of the prokaryotic community.

The difference in the NFB community profile between RV and NT may reflect the ability of these microorganisms to act as early colonizers, capable of increasing the availability of N in the soil, which facilitates colonization by other later successive species [44, 19]. The NFB community can colonize revegetated areas and present great abundance and diversity [20, 19, 45] by mediating nutrient turnover, as well as serving as indicators of soil quality [1, 46]. Although between RV and NT there is not much difference in the numbers of bands, numerically NT higher than RV. Thus, physico-chemical soil differences of RV and NT might result in differences in the BFN community profile.

The distinction between the Actinobacteria community profile between RV and NT was lower when compared to the BFN community profile. Although the differences in the band profile between RV and NT were minimal, numerically NT was higher than RV. Actinobacteria also have nitrogen fixing members such as *Frankia*, this phylum is considered a microbiological indicator of the ecosystem rehabilitation of revegetated sites [16, 48]. This can be attributed to their ability to tolerate heavy metals and produce

siderophores, which can form stable complexes with metals [16, 50], allowing for differences in the community profile of Actinobacteria in RV and NT.

The higher prokaryotic diversity of in the RV agrees with the intermediate disturbance hypothesis, which highest diversity indicates intermediate rates of disturbance [50]. Other studies revealed a similar pattern; the succession process after 10 years of revegetation may favor an increase in the diversity of important ecological groups [9,10]; such as nitrogen fixing bacteria [20, 44] and groups tolerant to the availability of heavy metals, such as Actinobacteria [14, 15, 16]. The highest diversity in sites as RV revealed the adaptation of the microbial community to environmental stress conditions [45], indicating that revegetation with grasses and legumes favors the rehabilitation of the microbiota in post-mining areas [1, 5, 9, 45]. Some bacterial groups are known for resistance to heavy metals due to mechanisms of tolerance and detoxification, which provides competitive advantages for their survival in metalliferous soils [52, 53].

The most abundant Archaea in the sequencing were also found in other mining environments, for example, Euryarchaeota and Thaumarchaeota in underground mercury mine [52], gold mining deposit [53], copper mining wastes and contaminated soil [50], coal mining [19] and iron exploration area [54]. Bathyarchaeota phylum were reported only in RV and related to CO<sub>2</sub> fixation via acetogenesis and methanogens [55, 56], being able to hydrolyse plant exudates [56]. Studies about Woesearchaeota suggests a host-dependent lifestyle [55, 57].

The most abundant bacterial phyla in this study were reported in others works conducted in mining areas [9, 19, 58]. RV and NT presented phylum (Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Verrucomicrobia) and genera (*Candidatus Koribacter*, *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas* and *Candidatus Xiphinematobacter*) in common, but with different relative abundances that may reflect the differences in physical-chemical characteristics between RV and NT. This similarity in composition and abundance of prokaryotic groups may be indicative of beginning of RV rehabilitation [45]. The genera as *Bryobacter* and *Bradyrhizobium* were one the most dominant bacterial group in both sites, mainly in RV and also were dominant at mining site considered as moderately polluted [10]. *Bradyrhizobium* is considered an NFB due to its association with legumes and also is a plant growth promoting rhizobacteria in other plants [8]. Furthermore, resistance of certain strains can be assigned to the cobalto-nickel resistance, by *cnr* operon [50]. *Bryobacter* plays an important role in the biogeochemical carbon cycle [59].

Together with the other dominant taxa, these genera play important roles in the two habitats.

Some exclusive taxa, including less abundant taxa contributed to differences in prokaryotic composition between the sites and were also detected in other mining environments. Phyla such as Gracilibacteria was observed in mining-impacted stream sediment [60], Ignavibacteriae in formation of an acid mine drainage [61], BRC1 in ultra-deep gold mines [62] and GAL 15 in tropical freshwater stream sediment [63]. Although the ecological role of these phyla aforementioned is not fully understood, the report in these environments may help to elucidate their distribution and adaptation strategies in these complex environments.

The structure of soil bacterial communities (PCoA) revealed the formation of two distinct groups between RV and NT, indicating the dissimilarity of the prokaryotic community between the sites. Once that during the iron mining process overburden soil are deposited on the surface and after mining, revegetation introduced in RV site may have contributed to restructuring of the soil with microenvironments formation [9, 64], which formed new niches [50], contributes to greater prokaryotic diversity and dissimilarity in RV samples.

Soil texture between RV and NT are distinct, and this determines pore size, water and gas dynamics, nutrient availability and, consequently, influences the composition of prokaryote communities, due to availability of niches to soil prokaryotic communities [50, 65]. Mantel test indicated that soil physical and chemical characteristics influenced the community prokaryotic composition. The sites NT and RV were grouped in distinct clusters according to land-use. Once that the soil of both sites had the same origin before mining process, the post-mining showed differences between sites by soil physical-chemical characteristics. NT was more positively influenced by most physical-chemical soil characteristics, which includes clay, nutrients and organic matter, while RV was positively influenced by few soil characteristics, that includes particle density, pH, Mn, P and Cd. This can be due the mining exploration, which deeply altered the physical-chemical characteristics of the soil.

The RV and NT soils were acidic, but the RV site highest pH value than the NT site. Acidic soils, with pH values lower than 5, provide greater solubility of heavy metals, increasing the bioavailability of Fe, Ni and Cd [1, 53]. The pH and availability of metals can affect prokaryotic communities by changing the taxonomy, diversity, and network of archeal and bacterial communities [50, 66]. The revegetation processes at post-mining

site, should establish strategies to correct the pH of areas in the process of rehabilitation, favoring the colonization of plants and the recruitment of beneficial microorganisms.

Despite differences in soil characteristics between RV and NT, there was similarity in the guilds related to carbon and nitrogen resources, as demonstrated by the putative analysis. The revegetation in RV allowed the increase of the input of nutrients and organic matter, due to the fixation of carbon and nitrogen [44, 19], increasing soil fertility [9]. The presence of functional groups capable of nitrogen fixing biologically [13], for instance Euryarchaeota methanogens members [55, 67] and phyla of bacteria such as: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* [53, 54, 68, 69] is indicative of recovery of important ecological functions. Thaumarchaeota phylum which oxidizes the ammonia, for example *Candidatus Nitrososphaera* and *Nitrospira* nitrite-oxidizing bacterium, play a role in the nitrogen cycle [50, 55]. Acidobacteria members have a broad metabolic repertoire that includes the use of several carbohydrates and both inorganic nitrogen sources (ammonia and/or nitrate/nitrite) and organic (amino acids and other high molecular weight compounds) [70]. The continuous input of nitrogen and carbon, in both sites revealed by metabolic characteristics may have influenced the growth and metabolism of the others microorganisms contributing, mainly, to the higher diversity of RV, even after ten years of closing the mining activities, compared to NT site.

In conclusion, revegetation at the iron mining site, after ten years of mine closure, altered and increased the diversity of prokaryotes. The distribution these microorganisms is directly related to the physical and chemical characteristics of the soil, mainly regarding nutrients concentrations. The similarities in the taxonomic composition of the community and also in the metabolism of N and C revealed one of the aspects of the resilience in RV, that is the recovery after the disturbance in comparison to NT, which is considered as environment goal for RV.

### **Acknowledgements**

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) and the Vale S.A. for financial support (ACA 5500023606/5900022781). To the professor Rapahel Bragança Alves Fernandes from Soil department of Universidade Federal de Viçosa to provide the Soil Physics Laboratory for our analyzes,

the professor Júlio César Lima Neves from Soil department of Universidade Federal de Viçosa and Tomás Gomes Reis Velloso for assisting with the analyzes.

## References

[1] Sheoran V, Sheoran, AS., & Poonia, P (2010). Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review. *Int. J. Soil Sediment Water*, 3:1–21. [https://doi.org/Available at: http://scholarworks.umass.edu/intljssw/vol3/iss2/13](https://doi.org/Available%20at%3A%20http%3A%2F%2Fscholarworks.umass.edu%2Fintljssw%2Fvol3%2Fiss2%2F13).

[2] Garris, HW, Baldwin, SA, Van Hamme, JD, Gardner, WC, and Fraser, LH (2016) Genomics to assist mine reclamation: A review. *Restoration Ecology*, 24: 165–173. <https://doi.org/10.1111/rec.12322>

[3] Claassens S, Riedel, KJ, van Rensburg, L, Morgenthal, TL and Jansen van Rensburg, P. J. (2005) Soil microbial properties in coal mine tailings under rehabilitation. *Applied Ecology and Environmental Research*, 4:75–83. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-31744448026&partnerID=40&md5=ee8d9dfc194ef60c58c8dee53ea67ae5>.

[4] Heneghan L, Miller SP, Baer S, Callahan MA, Montgomery J, Pavao-Zuckerman, M, Rhoades, CC; Richardson S (2008) Integrating soil ecological knowledge into restoration management. *Restoration Ecology*, 16: 608–617. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2008.00477.x>.

[5] Escobar, IEC, Santos VM, da Silva, DKA, Fernandes MF, Cavalcante UMT, Maia, LC (2015) Changes in Microbial Community Structure and Soil Biological Properties in mined dune areas during re-vegetation. *Environmental Management* (2015) 55: 1433- 1445. <https://doi.org/10.1007/s00267-015-0470-8>.

[6] Yan D, Zhao F, & Sun, OJ (2013) Assessment of vegetation establishment on tailings dam at an iron ore mining site of Suburban Beijing, China, 7 years after reclamation with contrasting site treatment methods. *Environmental Management*, 52: 748–757. <https://doi.org/10.1007/s00267-013-0092-y>.

[7] Araújo TO, de Freitas-Silva L, Santana BVN, Kuki KN, Pereira EG, Azevedo AA, da Silva LC (2015) Morphoanatomical responses induced by excess iron in roots of two tolerant grass species. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 2187–2195. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3488-1>.

[8] Thavamani P, Samkumar, RA, Satheesh, V, Subashchandrabose, SR, Ramadass, K, Naidu R, Venkateswarlu K, Megharaj M (2017) Microbes from mined sites:

Harnessing their potential for reclamation of derelict mine sites. *Environmental Pollution* 230: 495-505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.056>.

[9] Li Y, Wen H, Chen L, & Yin T (2014) Succession of bacterial community structure and diversity in soil along a chronosequence of reclamation and re-vegetation on coal mine spoils in China. *PLoS ONE*, 9: 1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0115024.

[10] Hong C, Si Y and Li Y (2015) Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environ Sci Pollut Res*. 22: 10788–10799.

[11] Roccotiello E, Marescotti P, Di Piazza S, Cecchi G, Mariotti MG, Zotti M (2015) Biodiversity in Metal-Contaminated Sites – Problem and Perspective – A Case Study, Biodiversity in Ecosystems - Linking Structure and Function, Dr Juan A. Blanco (Ed.), InTech, doi: 10.5772/59357. Available from: <https://www.intechopen.com/books/biodiversity-in-ecosystems-linking-structure-and-function/biodiversity-in-metal-contaminated-sites-problem-and-perspective-a-case-study>.

[12] Kumaresan D, Cross TM, Grez, MB, Kariman K, Nevill P, Stevens J. *et al.* (2017) Microbial Functional Capacity Is Preserved Within Engineered Soil Formulations Used In Mine Site Restoration. *Sci. Rep.*7: 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00650-6>.

[13] Harris J (2009) Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or followers? *Science* 325: 573-574. <https://doi.org/10.1126/science.1172975>.

[14] Ivshina IB, Kuyukina MS, Kostina LV (2013) Adaptive mechanisms of nonspecific resistance to heavy metal ions in alkanotrophicactinobacteria. *Russ J Ecol* 44:123–130.

[15] Větrovský T, Baldrian P (2015) An in-depth analysis of actinobacterial communities shows their high diversity in grassland soils along a gradient of mixed heavy metal contamination. *Biol Fertil Soils* 51:827–837. DOI 10.1007/s00374-015-1029-9.

[16] Alvarez A, Saez JM, Costa JSD, Colin, VL, Fuentes, MS, Cuozzo, SA *et al.* (2017) Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* 166:41-62.

[17] Polti MA, Amoroso MJ, Abate CM (2007) Chromium (VI) resistance and removal by actinomycete strains isolated from sediments. *Chemosphere* 67:660-667.

[18] Chapin FS, Walker LR, Fastie CL & Sharman LC (1994) Mechanisms of

primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecol Monogr* 64: 149–175.

[19] Li Y, Jia Z, Sun Q, Zhan J, Yang Y, Wang D (2016) Ecological restoration alters microbial communities in mine tailings profiles. *Sci. Rep.* 6: 25193 1-11; doi:10.1038/srep 25193.

[20] de Castro JL, Souza MG, Rufini M, Guimarães AZ, Rodrigues TL, Moreira FMS (2017). Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 41: e0160525.

[21] Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek MH, Kirchmann H, Kandeler E (2001) Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Environ. Microb. Appl. Environ. Microb.* 67: 4215–4224.

[22] Torsvik V. and Øvreås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240–245. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00324-7.

[23] Fraser LH, Garris HW, Baldwin SA, Van Hamme JD (2015) Using genomics in mine reclamation. *Mine Closure* (June), 1–12.

[24] Guild PW (1957) Geology and mineral resources of the Congonhas do Campo District, Minas Gerais, Brazil. *US Geol Surv Prof Paper*, 290: 90p.

[25] Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek, G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 22: 711–728.

[26] Jacobi CM, do Carmo FF, Vincent RC, Stehmann JR (2007) Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodivers Conserv* 16:2185–2200. DOI 10.1007/s10531-007-9156-8.

[27] Alves RJV, Kolbek J (2010) Can campo rupestre vegetation be floristically delimited based on vascular plant genera? *Plant Ecol.* 207:67–79. DOI 10.1007/s11258-009-9654-8.

[28] Ueda T, Suga Y, Yahiro N, Matsuguchi T (1995) Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. *J. Bacteriol.* 177, 1414–1417.

[29] Coelho MRR, Marriel IE, Jenkins SN, Lanyon CV, Seldin L, et al. (2009) Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Appl Soil Ecol* 42: 48–53.

- [30] Stach, JEM., Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT (2003) New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology* 5: 828–841.
- [31] Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington, EMH (1997) Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl Environ Microb* 63: 3233–3241.
- [32] Silva M de CS, Paula T de A, Moreira BC, Carolino M, Cruz C, Bazzolli DMS, Silva CC, Kasuya MC (2014) Nitrogen-fixing bacteria in Eucalyptus globulus plantations. *PloS One*, 9: e111313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111313>.
- [33] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods*. 7:335-336.
- [34] Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.
- [35] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight, R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.
- [36] Pylro VS, Roesh LFW, Ortega JM, Amaral AM, Tótola MR, Hirsch PR et al. (2014) *Microb Ecol* 67: 237. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0302-4>.
- [37] Defelipo, BV & Ribeiro, AC (1997) *Análise química do solo (metodologia)*, 2. ed. Viçosa, MG: UFV, Boletim de extensão 29.
- [38] Murphy J. & Riley JP (1962) A modified single solution methods for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31–36.
- [39] Blake GR and Hartge KH Bulk density (1986) In: Klute, A. (Ed.). *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods*. 2nd edn. Agron. Madison, WI: American Society of Agronomy—Soil Science Society of America Monogr. 9. 363-375.
- [40] Kiehl EJ (1979) *Manual de Edafologia: relações solo-planta*. São Paulo: Ceres, pp. 262.
- [41] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa (2017) *Manual de métodos de análise de solo*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 573p.
- [42] Ruiz HA. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta da suspensão (silte + argila) (2005) *R. Bras. Ci. Solo*, 29: 297-300.

[43] Louca S, Parfrey LW, Doebeli M (2016) Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science* 353: 1272-1277.

[44] Huang LN, Tang FZ, Song YS, Wan CY, Wang SL, Liu WQ, Shu WS (2011) Biodiversity, abundance, and activity of nitrogen-fixing bacteria during primary succession on a copper mine tailings. *FEMS Microbiol Ecol* 78: 439–450, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01178.x>.

[45] Fernandes CC, Kishi LT, Lopes EM, Omori WP, de Souza JAM, Alves, LMC, Lemos, EGM (2018) Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. *Braz J Microbiol* 49: 489-502. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.006>.

[46] Nelson KN, Neilson JW, Root RA, Chorover J, Maier RM (2015) Abundance and Activity of 16S rRNA, AmoA and NifH Bacterial Genes During Assisted Phytostabilization of Mine Tailings. *International Journal of Phytoremediation*, 17: 493-502, doi: 10.1080/15226514.2014.935284.

[47] Maiti SK (2013) Ecology and Ecosystem in Mine-Degraded Land. In: *Ecorestoration of the coalmine degraded lands*. Springer, India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-0851-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-0851-8_2).

[48] Schmidt A, Haferburg G, Sineriz M, Merten D, Büchel G, Kothe E (2005) Heavy metal resistance mechanisms in actinobacteria for survival in AMD contaminated soils. *Chemie der Erde* 65: 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2005.06.006>.

[49] Connell JH (1978) Diversity in tropical rain forests and coral reefs. *Science* 199: 1302–1310.

[50] Deng S, Ke T, Li L, Cai S, Zhou Y, Liu Y, Guo, *et al.* (2018) Impacts of environmental factors on the whole microbial communities in the rhizosphere of a metal-tolerant plant: *Elsholtzia haichowensis* Sun. *Env. Pollut.* 237: 1088-1097.

[51] Kavamura VN, Esposito E (2010) Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnol Adv* 28: 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.09.002>.

[52] Mesa V, Gallego JLR, González-Gil R, Lauga B, Sánchez J, Méndez-García C and Peláez AI (2017) Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Diversity across Distinct Microhabitats in an Acid Mine Drainage. *Front. Microbiol.* 8:1756. doi: 10.3389/fmicb.2017.01756.

[53] Bonilla JO, Kurth DG, Cid FD, Ulacco JH, Gil RA, Villegas LB (2018) Prokaryotic and eukaryotic community structure affected by the presence of an acid mine drainage from an abandoned gold mine. *Extremophiles* 22: 699-

711. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1030-y>.

[54] Xing Y, Si, Y-X, Hong, C, Li Y (2015) Multiple Factors Affect Diversity and Abundance of Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Iron Mine Soil. *Arch Environ Contam Toxicol* 69: 20-31.

[55] Castelle CJ, Banfield JF (2018) Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life. *Cell*. 172: 1181 – 1197.

[56] Xiang X, Wang R, Wang H, Gong L, Man B, Xu Y (2017) Distribution of Bathyarchaeota communities across Different terrestrial settings and their Potential Ecological Functions. *Sci Rep*. 7: 45028. <https://doi.org/10.1038/srep45028>.

[57] Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas, BC, Hug LA, Brown CT, Wilkins MJ, Frischkorn KR *et al.* (2015) Genomic Expansion of Domain Archaea Highlights Roles for Organisms from New Phyla in Anaerobic Carbon Cycling. *Curr Biol* 25: 690–701.

[58] Li J, Liu F, Chen J (2016) The effects of various land reclamation scenarios on the succession of Soil Bacteria, Archaea, and Fungi Over the Short and long term. *Front. Ecol. Evol.* 4: 1-11. doi: 10.3389/fevo.2016.00032.

[59] Dedysh SN, Kulichevskaya IS, Huber KJ, Overmann J (2016) Defining the taxonomic status of described subdivision 3 *Acidobacteria*: the proposal of *Bryobacteraceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 498–501. [10.1099/ijsem.0.001687](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001687).

[60] Reis MP, Dias MF, Costa PS, Avila MP, Leite LR, de Araújo FMG, Salim ACM, *et al.* (2016) Metagenomic signatures of a tropical mining-impacted stream reveal complex microbial and metabolic networks. *Chemosphere* 161: 266-273.

[61] Kadnikov VV, Gruzdev EV, Ivasenko DA, Beletsky VA, Mardanov AV, Danilova EV, Karnachuck OV. *et al* (2019). Selection of a microbial community in the course of formation of acid mine drainage. *Microbiol.* 88: 292–299.

[62] Rastogi G, Osman S, Kukkadapu R, Engelhard M, Vaishampaya PA, Andersen GL, Sani RK. (2010) Microbial and mineralogical characterizations of soils collected from deep biosphere of the former homestake gold mine, South Dakota. *Microb. Ecol.* 60: 539-550.

[63] Costa PS, Reis MP, Ávila MP, Leite LR, de Araújo FMG, Salim ACM, Oliveira G. *et al.* (2015) Metagenome of a Microbial Community Inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. *PLoS ONE* 10(3): e0119465. doi: 10.1371/journal.pone.0119465.

[64] Gros R, Monrozier LJ, Faivre P (2006) Does disturbance and restoration of alpine grassland soils affect the genetic structure and diversity of bacterial and N<sub>2</sub>-fixing populations? *Environ. Microbiol.* 8: 1889–1901.

[65] Kaiser C, Wemheuer B, Korolkow V, Wemheuer F, Nacke H, Schöning I, Schrupf M *et al.* (2016) Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. *Nature* 6: 33696. <https://doi.org/10.1038/srep33696>.

[66] Nicol GM, Leininger S, Schleper C, Prosser JI (2008) The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 10: 2966–2978. doi <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01701.x>.

[67] Leigh JA (2000) Nitrogen Fixation in methanogens: The Archaeal perspective. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2: 125-131.

[68] Tsoy OV, Ravcheev DA, Cuklina J and Gelfand MS (2016) Nitrogen Fixation and Molecular Oxygen: Comparative Genomic Reconstruction of Transcription Regulation in Alphaproteobacteria. *Front Microbiol* 7:1-14. doi: [10.3389/fmicb.2016.01343](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01343).

[69] Morrissey EM, Mau RL, Schwartz E, Koch BJ, Hayer M, Hungate BA (2018) Taxonomic patterns in nitrogen assimilation of soil prokaryotes. *Environmental Microbiology* 20: 1112-1119.

[70] Eichorst SA, Trojan D, Roux S, Herbold C, Rattei T, Wobken D (2018) Genomic insights into the *Acidobacteria* reveal strategies for their success in terrestrial environments. *Environ. Microbiol.* 20: 1041-1063. doi: [10.1111/1462-2920.14043](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14043).

[71] Bradshaw, A. (2000) The use of natural processes in reclamation: advantages and difficulties. *Landsc. Urban. Plan.* 51: 89-100.

[72] Zhan, J & Sun, Q (2012) Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in the rhizosphere and non-rhizosphere of pioneer plants growing on wastelands of copper mine tailings. *J Microbiol Res.* 3: 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.006>.

[73] Azarbad H, van Gestel CA M, Niklinska M, Laskowski R, Roling WFM, and van Straalen NM (2016). Resilience of soil microbial communities to metals and additional stressors: DNA-based approaches for assessing “stress-on-stress” responses. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 933. doi: [10.3390/ijms17060933](https://doi.org/10.3390/ijms17060933).

[74] Hodgson D, McDonald JL, Hosken DJ (2015) What do you mean, “resilient”? *Trends Ecol. Evol.* 30: 503–506.

## Supplementary Information

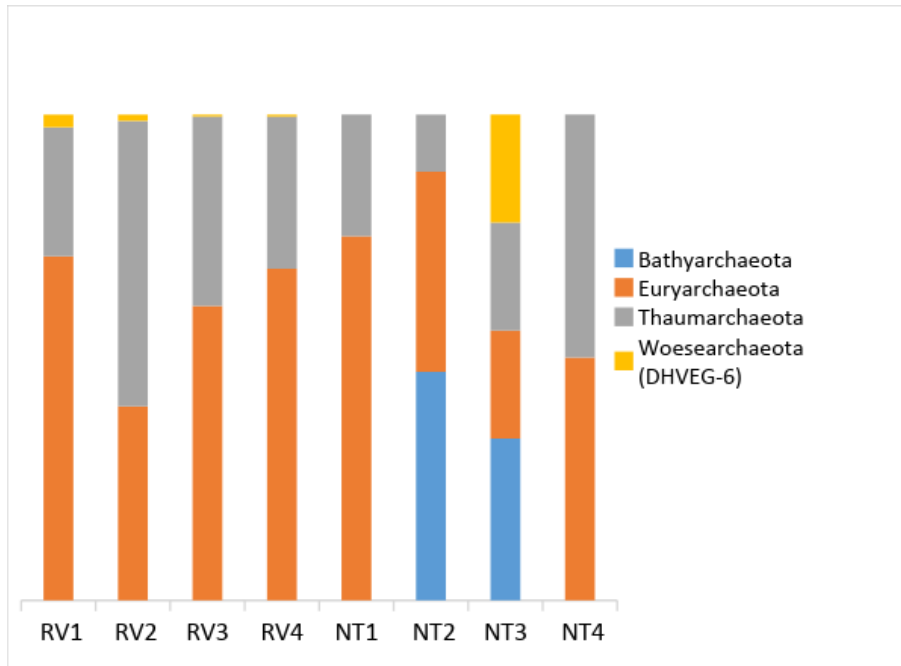


Fig. S1. Archaea phylum in each sample at sites: revegetation (RV) and native (NT)

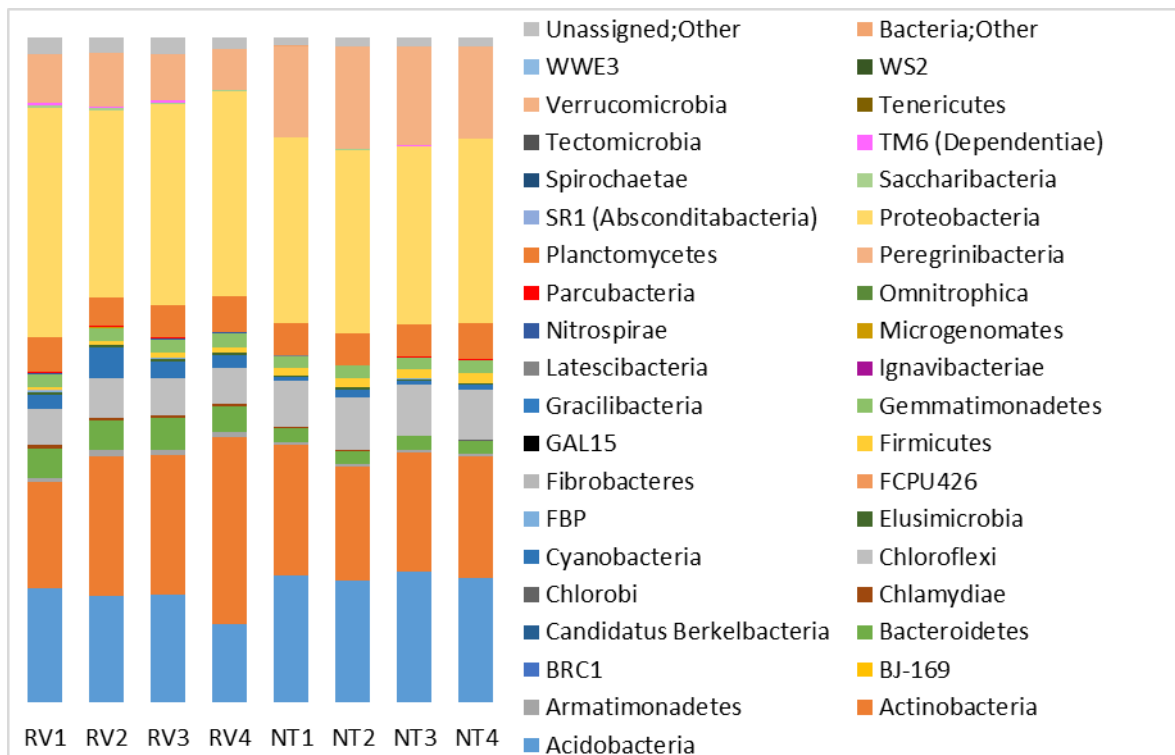


Fig. S2. Bacteria phylum in each in each sample at sites: revegetation (RV) and native (NT)

Table S1 Bacterial genera identified at revegetation site (RV), native site (NT) and both sites

Sites							
NT	RV	RV and NT					
<i>Brevibacillus</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Alkanibacter</i>	<i>Polycyclovorans</i>	<i>Nakamurella</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Tepidisphaera</i>
<i>Candidatus Saccharimonas</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hydrocarboniphaga</i>	<i>Skermanella</i>	<i>Coxiella</i>	<i>Roseomonas</i>	<i>Altererythrobacter</i>
<i>Dinghuibacter</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Ohtaekwangia</i>	<i>Microvirga</i>	<i>Candidatus Alysiosphaera</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Sphingopyxis</i>
<i>Elusimicrobium</i>	<i>Williamsia</i>	<i>Neochlamydia</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Dactylosporangium</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Blastococcus</i>	<i>Aridibacter</i>
<i>Actinoallomurus</i>	<i>Rubrobacter</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>Virgibacillus</i>	<i>Roseiflexus</i>	<i>Flavitalea</i>
<i>Alistipes</i>	<i>Rhodovastum</i>	<i>Marmoricola</i>	<i>Kineococcus</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Quadrisphaera</i>	<i>Thermosporothrix</i>
<i>Lachnoclostridium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Phaselicystis</i>	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Bryobacter</i>
<i>Peptoclostridium</i>	<i>Pasteuria</i>	<i>Gemmatimonas</i>	<i>Acidibacter</i>	<i>Acidicaldus</i>	<i>Rhodomicrobium</i>	<i>Schlesneria</i>	
<i>Metascardovia</i>	<i>Fluviicola</i>	<i>Nocardioides</i>	<i>Kineosporia</i>	<i>Spirosoma</i>	<i>Bryocella</i>	<i>Smaragdicoccus</i>	
<i>Treponema</i>	<i>Waddlia</i>	<i>Dongia</i>	<i>Rickettsiella</i>	<i>Solirubrobacter</i>	<i>Leifsonia</i>	<i>Methylovirgula</i>	
<i>Cerasicoccus</i>	<i>Spirochaeta 2</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Actinophytocola</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>Hymenobacter</i>	<i>Candidatus Koribacter</i>	
<i>Scytonema</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Luteibacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Candidatus Odysella</i>	<i>Sandaracinus</i>	<i>Niastella</i>	
<i>Microbacter</i>	<i>Acidisoma</i>	<i>Candidatus Protochlamydia</i>	<i>Ferruginibacter</i>	<i>Ideonella</i>	<i>Defluviicoccus</i>	<i>Bauldia</i>	
<i>Bosea</i>	<i>Fibrisoma</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Roseiarcus</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Annibacterium</i>	
<i>Ferrovum</i>	<i>Thiobacillus</i>	<i>Pedosphaera</i>	<i>Pseudolabrys</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Mucilaginibacter</i>	<i>Acidiphilium</i>	
<i>Phormidium</i>	<i>Endobacter</i>	<i>Chthonomonas</i>	<i>Burkholderia-Paraburkholderia</i>	<i>Flavisolibacter</i>	<i>Sediminibacterium</i>	<i>Paenalcaligenes</i>	
<i>Opitutus</i>	<i>Vogesella</i>	<i>Patulibacter</i>	<i>Nevskia</i>	<i>Candidatus Glomeribacter</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Chthoniobacter</i>	
<i>Exiguobacterium</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Terrimonas</i>	<i>Singulisphaera</i>	<i>Longispora</i>	

<i>Oceanobacillus</i>	<i>Acidocella</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Actinocatenispora</i>	<i>Serratia</i>	<i>Variibacter</i>	<i>Polymorphobacter</i>	
<i>Candidatus</i> <i>Armantifilum</i>	<i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma</i>	<i>Acidisphaera</i>	<i>Inquilinus</i>	<i>Phreatobacter</i>	<i>Gaiella</i>	<i>Nordella</i>	
<i>Mobilitalea</i>	<i>Adhaeribacter</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Candidatus</i> <i>Amoebophilus</i>	<i>Stigonema</i>	<i>Paenarthrobacter</i>	<i>Cytophaga</i>	
<i>Candidatus</i> <i>Symbiothrix</i>	<i>Siphonobacter</i>	<i>Aquicella</i>	<i>Candidatus</i> <i>Finniella</i>	<i>Iamia</i>	<i>Filimonas</i>	<i>Blastocatella</i>	
<i>Desulfomonile</i>	<i>Mastigocladopsis</i>	<i>Tyzzarella 3</i>	<i>Cohnella</i>	<i>Gemmatirosa</i>	<i>Rhodanobacter</i>	<i>Rhizorhapis</i>	
<i>Labilithrix</i>	<i>Chryseolinea</i>	<i>Jatrophihabitans</i>	<i>Conexibacter</i>	<i>Catenulispora</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Angustibacter</i>	
<i>Geobacter</i>	<i>Dokdonella</i>	<i>Ktedonobacter</i>	<i>Anaeromyxobacter</i>	<i>Legionella</i>	<i>Candidatus</i> <i>Methylacidiphilum</i>	<i>Asticcacaulis</i>	
<i>Tannerella</i>	<i>Aeribacillus</i>	<i>Chroococciopsis</i>	<i>Modestobacter</i>	<i>Chryseobacteriu</i> <i>m</i>	<i>Edaphobacter</i>	<i>Rhodoplanes</i>	
<i>Arachidicoccus</i>	<i>Parachlamydia</i>	<i>Sulfurifustis</i>	<i>Aciditerrimonas</i>	<i>Leptospirillum</i>	<i>Acidicapsa</i>	<i>Woodsholea</i>	
<i>Desulfovibrio</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Solitalea</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Oligoflexus</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Sporichthya</i>	
<i>Terrimicrobium</i>	<i>Larkinella</i>	<i>Terriglobus</i>	<i>Gemmata</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Pelomonas</i>	<i>Propionivibrio</i>	
<i>Meganema</i>	<i>Thauera</i>	<i>Tumebacillus</i>	<i>Chitinophaga</i>	<i>Hirschia</i>	<i>Telmatospirillum</i>	<i>Massilia</i>	
<i>Candidatus</i> <i>Endomicrobium</i>	<i>Paludibaculum</i>	<i>Rhizomicrobium</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Candidatus</i> <i>Microthrix</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Labrys</i>	
<i>Pelosinus</i>	<i>Parvibaculum</i>	<i>Reyranella</i>	<i>Noviherbaspirillum</i>	<i>Candidatus</i> <i>Solibacter</i>	<i>Planococcus</i>	<i>Kribbella</i>	
<i>Lactococcus</i>	<i>Taibaiella</i>	<i>Minicystis</i>	<i>Granulicella</i>	<i>Tahibacter</i>	<i>Isosphaera</i>	<i>Actinoplanes</i>	
<i>Arsenophonus</i>	<i>Candidatus</i> <i>Captivus</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Actinospica</i>	<i>Haliangium</i>	<i>Sorangium</i>	<i>Crossiella</i>	
<i>Sporocytophaga</i>	<i>Dyadobacter</i>	<i>Candidatus</i> <i>Omnitrophus</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Segetibacter</i>	<i>Acidobacterium</i>	<i>Brasilonema</i>	
	<i>Aureimonas</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Parafilimonas</i>	<i>Candidatus</i> <i>Nostocoida</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Steroidobacter</i>	
	<i>Beggiatoa</i>	<i>Candidatus</i> <i>Xiphinematobacter</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Phenyllobacteriu</i> <i>m</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Acidothermus</i>	

Table S2. Soil physical-chemical characteristics sampled 0–20 cm deep between sites native (NT) and post-mining revegetated site (RV). Means presented in the same line, by the same letter do not differ significantly by the Tukey test ( $p < 0.05$ )

Soil factors	Statistics	Means of sites	
	p-value	NT	RV
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	0.000*	143.13 A ± 2.27	34.86 B ± 2.21
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	0.002**	4.01 A ± 0.363	1.68 B ± 0.819
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	0.000**	94.36 B ± 8.54	160.36 A ± 5.26
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	0.281 <sup>ns</sup>	2.33 A ± 0.189	2.03 A ± 0.466
Cr (mg/dm <sup>3</sup> )	0.005**	1.175 A ± 0.379	0.186 B ± 0.242
Ni (mg/dm <sup>3</sup> )	0.020*	1.021 A ± 0.271	0.519 B ± 0.164
Cd (mg/dm <sup>3</sup> )	0.115 <sup>ns</sup>	0.119 A ± 0.034	0.178 A ± 0.054
S (mg/dm <sup>3</sup> )	0.000**	27.92 A ± 1.980	16.82 B ± 2.10
B (mg/dm <sup>3</sup> )	0.001**	0.623 A ± 0.073	0.313 B ± 0.059
Mg (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.001**	0.265 A ± 0.053	0.076 B ± 0.02
Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.000**	0.732 A ± 0.076	0.000 B ± 0.000
H+Al (potencial acidity) (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.000**	7.845 A ± 0.131	1.480 B ± 0.252
m (Aluminum saturation) (%)	0.000**	31.36 A ± 4.01	0.000 B ± 0.000
OM (dag/kg)	0.000**	5.520 A ± 0.263	0.369 B ± 0.118
pH H <sub>2</sub> O	0.000**	5.10 B ± 0.096	5.801 A ± 0.112
Ca (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.004**	1.339 A ± 0.1678	0.743 B ± 0.205
Macroporosity (m <sup>3</sup> / m <sup>3</sup> )	0.100 <sup>ns</sup>	0.170 A ± 0.0706	0.245 A ± 0.029
Particle density (m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> )	0.000**	2.773 B ± 0.1589	3.507 A ± 0.095

± Standart deviation

‘\*\*’,  $p < 0.01$

‘\*’  $p < 0.05$  and ‘<sup>ns</sup>’ not significant

Table S3. Soil physical-chemical characteristics between sites native (NT) and post-mining revegetated site (RV). Mann-Whitney test for medians in each site and respective p-values are showed

Soil factors	p-value	Median of sites	
		NT	RV
P (mg/dm <sup>3</sup> )	0,030*	1.89	11.25
K (mg/dm <sup>3</sup> )	0,029*	58.5	6.2
Microporosity (m <sup>3</sup> / m <sup>3</sup> )	0,885 <sup>ns</sup>	0.218	0.170
Dispersed clays (kg/kg)	0,030*	0.131	0,015
Sand (kg/kg)	0,030*	0.382	0.456
Clay (Kg/Kg)	0,030*	0,396	0,095

‘\*’  $p < 0.05$  and ‘<sup>ns</sup>’ not significant

Table S4. Statistical significance between the environmental variables and prokaryotic OTUs obtained by free permutation (999 permutations) from distance based redundancy analysis (db-RDA), with r and p values ranked

Variables	r <sup>2</sup>	P-value
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	0.9968	0.009 **
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	0.8239	0.032 *
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	0.9539	0.028 *
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	0.6823	0.037 *
Cr (mg/dm <sup>3</sup> )	0.7901	0.018 *
Ni (mg/dm <sup>3</sup> )	0.6670	0.065 <sup>ns</sup>
Cd (mg/dm <sup>3</sup> )	0.4058	0.246 <sup>ns</sup>
S (mg/dm <sup>3</sup> )	0.9013	0.022 *
B (mg/dm <sup>3</sup> )	0.8781	0.022 *
Mg (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.9107	0.008 **
Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.9664	0.031 *
H+Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.9924	0.022 *
M (%)	0.9566	0.031 *
OM (dag/Kg)	0.9986	0.002 **
pH	0.9216	0.029 *
P (mg/dm <sup>3</sup> )	0.8123	0.024 *
K (mg/dm <sup>3</sup> )	0.9562	0.015 *
Ca (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0.8866	0.004 **
Particle density	0.9148	0.023 *
Dispersed clays in H <sub>2</sub> O (kg/kg)	0.9761	0.012 *
Clay (kg/kg)	0.8655	0.031 *

\*\*\*, p < 0.01

\*\* p < 0.05

<sup>ns</sup> not significant

## **CAPÍTULO 2: Estrutura e dinâmica espacial-temporal da comunidade fúngica em sítios de pós-mineração**

### **Resumo**

A caracterização sítio-específica da área de referência uma das abordagens mais importantes para mitigar os impactos causados nas áreas de pós-mineração, promover a integridade ecológica e a biodiversidade, principalmente das comunidades de fungos. Estes são parte importante da biomassa do solo e sua distribuição pode co-variado com a dinâmica de nutrientes do ecossistema e efeitos do clima. Neste sentido, as comunidades fúngicas dentro de dois sítios da mina Retiro das Almas: um de pós mineração, revegetado (RV) e outro nativo (NT) foram analisadas a partir do sequenciamento da região ITS rDNA, pela plataforma Illumina Miseq. Para compreender a variação temporal e espacial desta comunidade, um período seco e outro chuvoso foram analisados além das características físico-químicas do solo de cada sítio. Os resultados mostram que os sítios e períodos de coleta influenciam, individualmente a comunidade de fungos. Assim, o sítio NT e o período seco evidenciaram maior riqueza e diversidade. As comunidades fúngicas foram estreitamente correlacionadas com as características físico-químicas do solo e, de acordo com o período, interagiram de forma peculiar com os táxons identificados, com NT exibindo mais características relacionadas a fertilidade do solo que RV. Os filos Ascomycota e Basidiomycota foram os mais abundantes nos dois sítios e períodos. Em ambos os períodos em RV foram detectados *Allocniothyrium*, *Hipoxylon*, *Antennariella*, *Umbilicaria* e *Penidiella* e em NT *Cancellidium*, *Clonostachys*, *Chaetomium*, *Lachnum*, *Paraconiothyrium* e *Arnium*. Para Glomeromycota, o período não afetou a contagem de esporos, contudo o perfil da comunidade, revelada por DGGE, o sequenciamento e a identificação de espécies, pela morfologia de esporos mostraram padrões peculiares para este grupo de fungos. A abordagem morfológica evidenciou mais espécies pertencentes às famílias Glomeraceae, Acaulosporaceae e Gigasporaceae que o sequenciamento. Este estudo evidenciou que as comunidades fúngicas em geral sofreram influências temporais e espaciais e evidenciaram que os táxons mais abundantes exibiram padrões de distribuição similares nos mesmos sítios em períodos distintos.

**Palavras-chave:** Fungos, pós-mineração, Quadrilátero Ferrífero, temporalidade

### **Introdução**

A mineração é uma atividade importante para a economia local e global, porém conduz a impactos substanciais no ambiente, que incluem modificação do relevo,

poluição hídrica, atmosférica e do solo, bem como a remoção da vegetação nativa, que prejudica a biota e suas relações ecológicas (Sheoran *et al.*, 2010; Kuter, 2013; Silva *et al.*, 2018). Assim, é necessário estabelecer estratégias para a recuperação das condições locais de minas a céu aberto (Kuter, 2013). A caracterização sítio-específica aliada ao conhecimento detalhado sobre o ecossistema de referência é a melhor abordagem na preservação ou restauração da biodiversidade em ambientes de mineração (Roccoliello *et al.*, 2015; Kuter, 2013).

No processo de mineração, a utilização do solo de superfície, ou *topsoil* para reabilitar essas áreas nem sempre é possível e as camadas mais profundas do solo são aproveitadas como substrato para esta finalidade (Bradshaw, 2000; Festin *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018). Estes solos não favorecem o crescimento da vegetação devido à alta densidade, deficiência em vários nutrientes, estrutura instável e propensa à erosão (Sheoran *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2018). Além da elevada biodisponibilidade de metais e compactação, teor elevado de areia, baixa capacidade de manutenção da umidade, e baixo teor de matéria orgânica; que conseqüentemente modula a composição microbiana (Sheoran *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2018; Festin *et al.*, 2018).

Entre os componentes bióticos do solo, plantas e fungos são os organismos que desempenham papel chave na colonização de sítios contaminados (Roccoliello *et al.*, 2015). Os fungos são parte importante da biomassa nos solos e desempenham papéis no ecossistema como mutualistas, patógenos e saprófitos (Narendrula-Kotha e Nkongolo, 2017; Tedersoo *et al.*, 2018). A riqueza e a composição das comunidades fúngicas geralmente co-variam com a vegetação e são responsivas a nutrientes do solo (Kolaříková *et al.*, 2018; Tedersoo *et al.*, 2014). Em escala local, a diversidade e a composição da comunidade de fungos podem variar em escalas temporais, como dias, meses, temporadas (He *et al.*, 2017). Mudanças sazonais nas comunidades fúngicas são relevantes para compreender a atuação dos fungos no funcionamento do ecossistema, além das suas respostas às mudanças climáticas globais, e como podem afetar a dinâmica da ciclagem de nutrientes e matéria orgânica destes microrganismos (Vargas-Gastélum *et al.* 2015).

O alto rendimento do sequenciamento de nova geração (NGS) tem conduzido ao aumento na resolução e na detecção de diversos filotipos de fungos em diversos ecossistemas, incluindo ambientes naturais (Crognale *et al.*, 2017). Estudos da diversidade microbiana, por meio desta ferramenta tem sido realizados nas áreas do Quadrilátero Ferrífero e ecossistemas adjacentes (Fernandes *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2018), que constituem um mosaico de habitats, distintos pela

configuração do substrato, composição florística, proporção de rocha exposta e presença de blocos rochosos e sedimentos de areia (Carvalho *et al.*, 2012). Estas áreas são consideradas como *hotspot* de diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), devido a abundância e nichos decorrentes do mosaico de solos e vegetações (Teixeira *et al.*, 2017).

Os FMAs destacam-se em estudos sobre recuperação de áreas de mineração, pois são simbioses obrigatórios de plantas, facilitam a revegetação, estabelecimento e sucesso das plantas em áreas degradadas (Harris, 2009; Leung *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). A rede de micélio extraradicular dos FMAs e a exsudação, pela hifa, da proteína do solo relacionada à glomalina (PSRG) contribuem para a formação de agregados do solo, tornando-o estável o suficiente para resistir à erosão eólica e hídrica, facilitar a retenção de água e a infiltração do ar, os quais são favoráveis para o crescimento vegetal e de microrganismos (Yang *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017). Devido a recalcitrância e longo tempo de permanência do solo, a PSRG desempenha um papel fundamental no armazenamento a longo prazo de carbono/nitrogênio e diminui a disponibilidade de metais pesados (Yang *et al.*, 2017).

Nós hipotetizamos que a estrutura da comunidade de fungos, do sítio de vegetação nativo, não perturbado pela mineração, apresenta os maiores estimadores ecológicos de riqueza e diversidade, devido à integridade e complexidade natural deste ambiente, em oposição ao sítio de pós-mineração revegetado, e que a composição da comunidade fúngica de ambos os sítios é influenciada pelo período de coleta e características edáficas. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar as comunidades de fungos nos dois sítios no período seco e chuvoso, dentro da mina Retiro das Almas, na região do Quadrilátero Ferrífero.

## **Metodologia**

### **Sítio de estudo e desenho amostral**

As áreas de estudo foram localizadas na mina Retiro das Almas, pertencentes a Companhia Vale S. A., localizada no município de Ouro Preto, no estado de Minas Gerais, Brasil e desativada a cerca de dez anos (Fig. 1, A, capítulo 1). Estes sítios são situados no sul da região do Quadrilátero Ferrífero, onde o clima é subtropical úmido de acordo com a classificação de Köpper (Alvares *et al.*, 2013). A média anual de chuvas é de 1.386 mm, com a estação chuvosa de outubro a março e a estação seca de abril a setembro. A média anual de temperatura é de 20,1 °C. Atualmente, a área da mina Retiro

das Almas abrange sítios de mineração a céu aberto, pilha de estéril revegetada além do sítio de referência, com vegetação nativa.

A composição vegetal dos sítios antes da mineração era indistinguível e semelhante à vegetação encontrada nos campos ferruginosos do Quadrilátero Ferrífero, que abrigam comunidades distintas de plantas tolerantes a metais e hiperacumuladoras (Jacobi *et al.*, 2007). As famílias de angiospermas mais abundantes relatadas nessas áreas de acordo com Jacobi *et al.*, (2007) são Asteraceae, Orchidaceae, Poaceae, Melastomataceae, Cyperaceae, Myrtaceae, Fabaceae, Rubiaceae, Bromeliaceae, Solanaceae and Velloziaceae

As amostragens para as análises da comunidade fúngica foram realizadas em duas épocas do ano distintas: período seco (junho de 2015) e período chuvoso (fevereiro de 2016), em dois sítios 350 m distantes entre si: um sítio composto de pilha de estéril, em processo de revegetação (RV) (S 20°24'09,7" W43°52'02.9"), e um sítio de referência, com vegetação nativa, não perturbado por atividades mineradoras (NT) (S 20°24'17, 1" W43°54'15.8") (Fig 1, B. Capítulo 1). Em RV, as plantas mais abundantes encontradas foram *Andropogon bicornis* L., *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC e *Baccharis reticularia* DC. Durante o processo de revegetação, outras espécies como *Brachiaria* sp., *Crotalaria* sp., *Sthylosantes* sp., *Mimosa scabrella* (Benth) e uma espécie de gramínea exótica, *Melinis minutiflora* P. (Beauv.) foram introduzidas (Fig 1, C. Capítulo 1). As espécies de plantas mais abundantes em NT foram: *A. satureioides* (Lam.) DC, *B. reticularia* DC, *Paspalum guttatum* Trin. e *Echinolaena inflexa* (Poir.) Chase. (Fig 1, D. Capítulo 1).

Cada sítio totalizou uma área de 1.000 m<sup>2</sup> para amostragem, com 20 unidades experimentais, as quais continham um transecto de cinco subamostras distantes entre si 5 m, coletadas na profundidade de 0 a 20 cm e misturadas para compor quatro amostras em cada sítio (Fig 1, E e F, capítulo 1). As amostras foram nomeadas como: RV1, RV2, RV3, RV4 e NT1, NT2, NT3, NT4 e utilizadas para análises químicas, de quantificação da PSRG e análises moleculares da comunidade de fungos. Para as análises de física do solo, duas de cada cinco subamostras foram utilizadas. As amostras de solo para a extração do DNA microbiano foram armazenadas a -20 °C no laboratório de Associações Micorrízicas, da Universidade Federal de Viçosa até a realização das análises.

## **Extração de DNA e sequenciamento de amplicons do gene ITS rRNA a análises de bioinformática**

O DNA total foi extraído de 0,5 g de solo, usando o Kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel Laboratories, Bethlehem, PA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento de DNA foi realizado no sequenciador Illumina MiSeq (2 x 250 bp), utilizando os primers da região ITS: ITS1f (5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3') e ITS2 (5'- GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3'). As sequências foram analisadas utilizando o *Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME, version 1.17) (Caporaso *et al.*, 2010), os algoritmos USEARCH (Edgar, 2010) e UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) e UPARSE (version 7.1) ([version 7.1 http://drive5.com/uparse/](http://drive5.com/uparse/)) seguindo a *pipeline* implementada pelo Brazilian Microbiome Project (BMP) (Pylro *et al.*, 2014). Arquivos FASTQ foram demultiplexados e filtrados por qualidade para obter uma pontuação média de qualidade mínima de 20 utilizando USEARCH (Edgar, 2010). Sequências quiméricas foram identificadas e removidas utilizando UCHIME. Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram classificadas a 97 % de similaridade usando UPARSE (version 7.1) e para cada OTU a taxonomia foi atribuída utilizando o banco de dados UNITE versão 8.0. O QIIME foi utilizado para gerar os gráficos de rarefação com as OTUs observadas de cada amostra e os índices de diversidade (ACE, Shannon, Simpson, dominância e Chao 1).

## **Nested-PCR e análise de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) para Glomeromycota**

O DNA total foi utilizado para amplificação das regiões específicas do gene 18S rRNA por *Nested-PCR*. O primeiro par de *primers* usados para amplificação do gene foram AML1(5'-ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA-3') e AML2 (5'-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-3') (Lee *et al.*, 2008). A PCR consistiu em: 1 µL do DNA molde (20 ng), 0,2 µM de oligonucleotídeos, 0,2 mM dNTP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µg µL<sup>-1</sup> albumina de soro bovina (BSA), 10 µL de tampão Go Taq flex e 0,25µL de GO Taq DNA (equivalente a 1,25 unidades de GO Taq DNA polimerase) (Promega, Madison, USA) em um volume total de 50 µL. As condições de amplificação foram realizadas de acordo com Lee *et al.*, (2008). Um microlitro do produto da primeira etapa da PCR foi utilizado na segunda etapa com os seguintes *primers*: NS31-GC (5'CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGTTGGAGGGC AAGTCTGGTGCC-3'), o qual foi anexada uma sequência rica em CG (Kowalchuck *et*

*al.*, 2002) e Glo1 (5'- GCCTGCTTTAAACTCTA-3') (Cornejo *et al.*, 2004). A segunda etapa da PCR consistiu nas mesmas quantidades de reagentes da primeira, com mesmo volume final e as condições de amplificação foram realizadas de acordo com Cornejo *et al.*, (2004). Para a confirmação da presença dos fragmentos de DNA, 5 µL dos produtos da primeira e segunda PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1,5 % p/v) corados com brometo de etídio, e visualizados sob luz UV no fotodocumentador Molecular Imaging System (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi).

Os fragmentos de DNA obtidos por *Nested*-PCR foram analisados por DGGE (DCode System, Bio-Rad Inc., California). Amostras contendo 20 µL dos produtos de PCR foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 8 % (w/v) e tampão 1 X Tris-acetato-EDTA (TAE). O gradiente desnaturante variou de 35 a 55 % para amplicons de Glomeromycota (onde 100 % de desnaturação indica uma concentração de 7 mol L<sup>-1</sup> ureia e 40 % [v/v] formamida).

Os géis foram submetidos a eletroforese a temperatura constante (60 °C) e voltagem (100 V) por 12h, depois corados por 40 min com *Sybr Gold* (1x) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands); os géis foram posteriormente fotografados sob luz UV no fotodocumentador Molecular Imaging System (Loccus Biotecnologic L-Pix Chemi). Os perfis de DGGE foram analisados utilizando o programa BioNumerics (Version 5.1, Applied Maths NV). Os dendrogramas foram construídos pelo índice de correlação de Cosine e pelo método de agrupamento de par não ponderado usando médias aritméticas (*unweighted pair group method using arithmetic averages*, UPGMA).

### **Extração, quantificação e identificação de esporos de FMAs**

Para a extração e quantificação dos esporos de FMA (abundância) foram utilizados 100 cm<sup>3</sup> de solo para realizar o método do peneiramento úmido (Gerdemann & Nicholson, 1963), com peneiras de malha de 0,42 e 0,044 mm e posterior centrifugação em água e solução de sacarose a 50 %. A contagem dos esporos foi realizada em placas de Petri canaletadas, sob estereomicroscópio.

A identificação dos esporos foi realizada a partir da seleção de morfotipos semelhantes e fixados em lâminas para microscopia contendo, em cada extremidade PVLG (álcool polivinílico, ácido láctico e glicerol) e PVLG + reagente de Melzer (1:1) sob lamínulas. A caracterização das espécies foi baseada em critérios morfológicos (<https://invam.wvu.edu/>).

### **Extração e quantificação de proteína do solo relacionada à glomalina**

O processo de extração da PSRG foi baseado na complexação da substância por ácido orgânico (citrato de sódio) (Wright *et al.*, 1996), sendo extraída as frações PSRG facilmente extraível (PSRGFE) e PSRG total (PSRGT). Para cada amostra, 1 g de solo (previamente peneirado em peneira de 2 mm e seco ao ar) foi armazenado em tubos tipo Falcon de 50 mL previamente pesado. Para a extração de PSRGFE foram adicionados 8 mL de solução tampão de citrato de sódio 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), seguida de uma autoclavagem a temperatura de 121 °C por 30 min. Para extração da fração PSRGT, 8 mL da solução tampão de citrato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup>, (pH 8,0) foram adicionadas a 1 g de solo em tubos tipo Falcon de 50 mL previamente pesados e submetidos a quatro autoclavagens sucessivas a 121 °C por 60 min, até que o sobrenadante atingisse uma coloração amarelo claro. Para ambas as frações, uma vez finalizada cada autoclavagem, o conjunto [M(tubo+solo+sobrenadante)] foi pesado e posteriormente centrifugado a 1.677 g por 15 min. Para PSRGFE, após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante da extração de cada amostra foi armazenado em freezer até serem quantificadas. Para PSRGT, foram coletadas subamostras de 0,3 mL do sobrenadante, sucessivamente após cada etapa de centrifugação e autoclavagem obtendo-se um volume final total de 1,2 mL de amostra para quantificação. O volume final do sobrenadante (Vf) foi calculado subtraindo-se o conjunto [M(tubo+solo+sobrenadante)] por [M(tubo+solo)].

A quantificação da PSRGT foi realizada determinando a variação de cor em reagente Bradford por espectrofotometria, utilizando albumina bovina sérica como proteína padrão (Bradford, 1976). Alíquotas de 100 µL de amostras padrão foram adicionadas a 1 mL de reagente Bradford Em microtubos e a leitura realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. O cálculo dos teores nas amostras de 100 µL foi realizado a partir das fórmulas:

$$x = \frac{b - a}{y}$$

Onde:

$x = Ta$  = teor na amostra de 100 µL;

$y$  = valor observado na leitura.

O teor total de glomalina em mg g solo<sup>-1</sup> foi calculado pela seguinte equação:

$$Tf = \frac{Ta.Vf}{Va}$$

Onde:

$T_f$  = teor total de glomalina em um grama de solo ( $\text{mg g solo}^{-1}$ );

$T_a$  = teor de glomalina na amostra de 100  $\mu\text{L}$  ( $\text{mg g solo}^{-1}$ );

$V_f$  = volume final do sobrenadante ( $\mu\text{L}$ ) (volume coletado e medido +  $V_r$ , volume remanescente no solo após a centrifugação);

$V_a$  = volume da amostra utilizado na leitura ( $\mu\text{L}$ ).

### **Caracterização química e física do solo**

A caracterização química foi realizada no Laboratório de Análise do Solo, Tecidos Vegetais e Fertilizantes, na Universidade Federal de Viçosa. O pH do solo foi medido com a suspensão aquosa de proporção 1:2.5 (v:v) solo: água. Al, Ca e Mg trocáveis foram extraídos com  $1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl (Defelipo and Ribeiro, 1997). P, Na, K, Fe Zn, Mn, Cu, Cd, Pb, Ni, e Cr trocáveis foram extraídos com o extrator Mehlich-1 ( $0,025 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido sulfúrico e  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido hidrolórico), com a relação solo:extrator 1:10. O conteúdo de matéria orgânica foi determinado utilizando o método de Walkley and Black (1934), multiplicando-se o percentual de carbono orgânico do solo por um fator de 1,724, seguindo as proposições de que a matéria orgânica é composta de 58% de carbono.

As amostras foram secas ao ar e peneiradas em peneira com malhas de 2,0 mm para análises de física do solo como: granulometria, densidade de partículas, porosidade total, macroporosidade e microporosidade. A densidade do solo ( $D_s$ ) foi obtida pelo método do anel volumétrico (Blake and Hartge, 1986) e a densidade de partículas ( $D_p$ ) foi obtida pelo balão volumétrico, usando o álcool como líquido penetrante (Kiehl, 1979; Embrapa, 1997). A micro e a macroporosidade foram determinadas a partir do método de tabela de tensão, utilizando-se  $0,006 \text{ MPa}$  de coluna de água e a porosidade total foi obtida a partir da determinação de macro e microporosidade (Embrapa, 2017). Frações argila e silte foram determinadas pelo método de pipeta (Ruiz, 2005). A lei de Stokes foi calculada para atingir o tempo de sedimentação dessas frações do solo.

### **Análises estatísticas**

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para averiguar diferenças entre os dados paramétricos de físico-química do solo dos sítios RV e NT, seguida pelo teste de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os demais dados físico-químicos não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Para averiguar as diferenças e comparar as médias dos estimadores de diversidade (ACE, Chao, Shannon, Simpson e dominância), número de sequências, OTUs, bem como o número de esporos entre os fatores sítios, período e a interação entre sítios e período foi realizada a ANOVA com parcelas subdivididas no tempo, em delineamento inteiramente casualizado e o teste de Tukey com nível de significância a 5 %. Todas as análises foram efetuadas por meio do *software* R v.3.5.2 (R Development Core Team. 2015), com a utilização do pacote ExpDes.pt.

As análises de coordenadas principais (PCoA) e de distância baseada em redundância (db-RDA) foram calculadas a partir da matriz de distância Bray-Curtis por meio dos pacotes Vegan e Phyloseq no *software* R v.3.5.2 (R Development Core Team. 2015). A PCoA foi realizada para avaliar as diferenças na composição da comunidade de fungos em ambos os sítios, nos períodos de seca e de chuva. A db-RDA foi realizada para analisar quanto da variância na distribuição da comunidade fúngica foi influenciada por variáveis ambientais entre os sítios. O teste de Mantel foi realizado para verificar a correlação entre estas variáveis a partir dos pacotes Vegan e Phyloseq no programa R.

Os *heatmaps* da comunidade fúngica gerados foram calculados utilizando os pacotes: Gplot, Vegan, Heatplus e RColorbrewer v1.0.8 no R. As dez OTUs mais abundantes, com o menor nível taxonômico identificado em cada época do ano foram selecionadas. A matriz de similaridade Bray-Curtis foi calculada a partir da abundância relativa das OTUs para representar, no *heatmap*, uma análise hierárquica de agrupamento.

As OTUs em nível de gênero da comunidade fúngica, em cada sítio e em cada período foram utilizadas para gerar os diagramas de Venn, mediante a ferramenta *online* disponível em (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) e para análise de espécies indicadoras, que determina a força da associação entre sítios e OTUs, foi utilizado o pacote Indicspecies no *software* R (Cárceres *et al.*, 2010). O cálculo da correlação de Spearman entre as variáveis que representam a abundância das OTUs com o menor nível taxonômico identificado e as variáveis ambientais foi realizado por meio do programa R. As correlações com p-valor < 0,05 foram selecionadas e utilizadas para posterior análise de co-ocorrência no *software* Cytoscape.

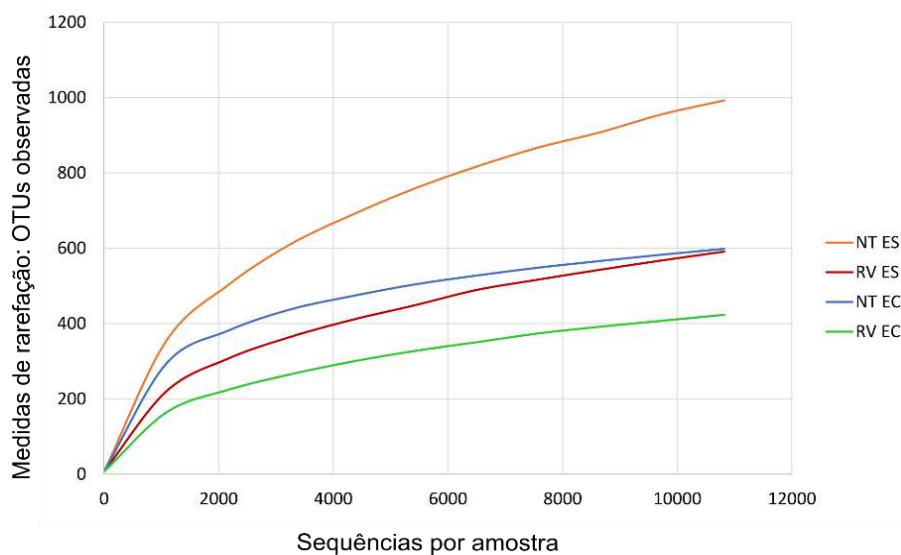
## **Resultados**

### **Comunidade de fungos nos sítios de mineração**

O sequenciamento Illumina produziu um total de 832.592 *reads* para o total de 16 amostras. Após a filtragem por qualidade, as sequências de quimeras e *singletons* foram

removidas, e obteve-se uma quantidade de 285.097 *reads*, das quais 4.945 foram agrupadas em OTUs. As sequências por amostras no período seco e chuvoso variaram de 10.826 a 24.671 e foram normalizadas para 10.826 sequências para todas as amostras, nas análises subsequentes. O número de sequências, OTUs e medidas dos estimadores de diversidade em cada sítio e em cada período foram sumarizadas (Tabela 1).

As curvas de rarefação de OTUs observadas revelaram, de forma geral a tendência assintótica das amostras. As amostras do sítio NT, no período chuvosa e de RV em ambos os períodos tenderam a uma maior estabilização da curva, e a amostra RV, na estação chuvosa, tornou-se ainda mais próxima ao platô de saturação. De forma oposta, NT na estação seca revelou uma tendência mais tardia à estabilização da curva (Fig. 2) resultando na maior média para as OTUs observadas (Tabela 1). Em relação ao número de sequências não houve diferença entre os sítios ( $p$ -valor = 0,203), mas houve diferença entre os períodos ( $p$ -valor = 0,025).



**Figura 2.** Curva de rarefação de OTUs agrupadas a 97 % de identidade das sequências, nas amostras dos sítios de: revegetação (RV) e não perturbado, com vegetação nativa (NT), em amostras coletadas na época seca (ES) e na época chuvosa (EC)

Os estimadores de diversidade mostraram diferenças estatísticas entre os sítios e apresentaram médias maiores para NT, exceto a dominância, a qual foi maior em RV (Tabela 1). Em relação ao período, os estimadores de riqueza: ACE e Chao1 e o estimador de diversidade Shannon apresentaram diferenças e evidenciaram maiores médias para o

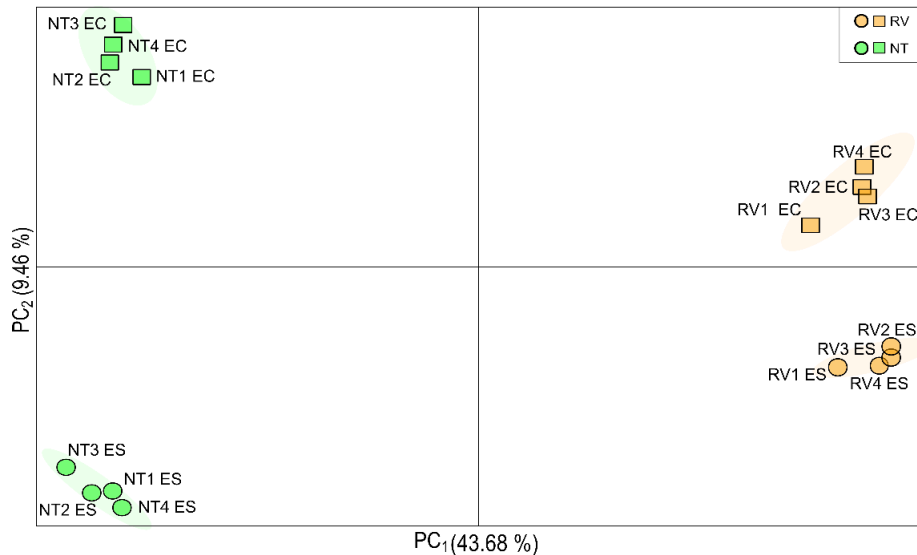
período seco, exceto para dominância e Simpson, que foram estatisticamente semelhantes em ambos os períodos (Tabela 1).

Não houve interação significativa entre os fatores sítio e período para: as sequências (p-valor = 0,486), OTUs observadas (p-valor = 0,083) e para os estimadores de diversidade: ACE (p-valor = 0,075), Chao1 (p-valor = 0,107), Shannon (p-valor = 0,249), Simpson (p-valor = 0,415), dominância (p-valor = 0,415)

**Tabela 1.** Resultados do sequenciamento Illumina MiSeq e índices de diversidade para cada sítio: revegetação (RV) e natural (NT), nas estações seca e chuvosa. Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) baseada no teste de Tukey

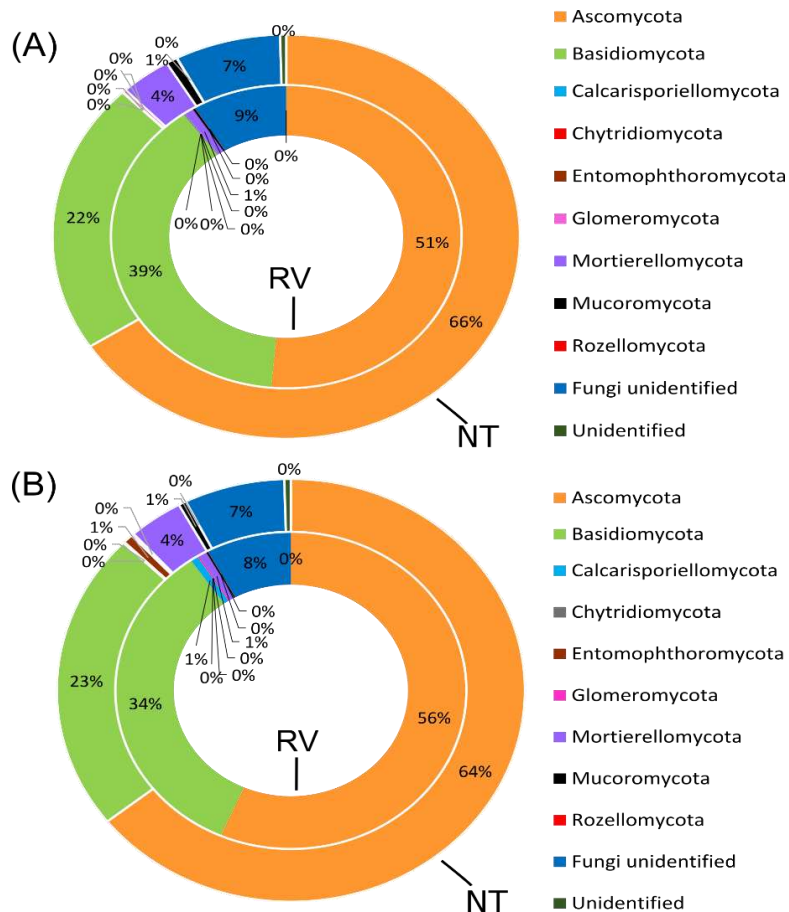
Fatores	Sítios				Estações			
	RV		NT		Seca		Chuvosa	
Resultados do sequenciamento								
Sequências	19.326,7a	± 4.248	16.465a	± 3.653,7	15.798,5b	± 3.577,8	19.993,2a	± 3635,9
Otus observadas	507,375b	± 106,5	795,5a	± 253,1	791,9a	± 215,9	511b	± 1,195
Estimativa de diversidade								
ACE	743,3b	± 173,3	1.064,2a	± 469,9	1.159,7a	± 303,7	647,8b	± 271,3
Chao1	730,2b	± 190,3	1.089,8a	± 411,5	1.143,2a	± 298,5	676,8b	± 256,9
Shannon	6,21b	± 0,559	7,791a	± 0,367	7,34a	± 0,826	6,657b	± 0,975
Simpson	0,954b	± 0,022	0,986a	± 0,008	0,978a	± 0,021	0,962a	± 0,024
Dominancia	0,045a	± 0,022	0,014b	± 0,008	0,022a	± 0,021	0,037a	± 0,024

A PCoA revelou quatro agrupamentos distintos para as comunidades de fungos em relação aos sítios de coleta (RV e NT) e os períodos (seco e chuvoso) (Fig. 3).



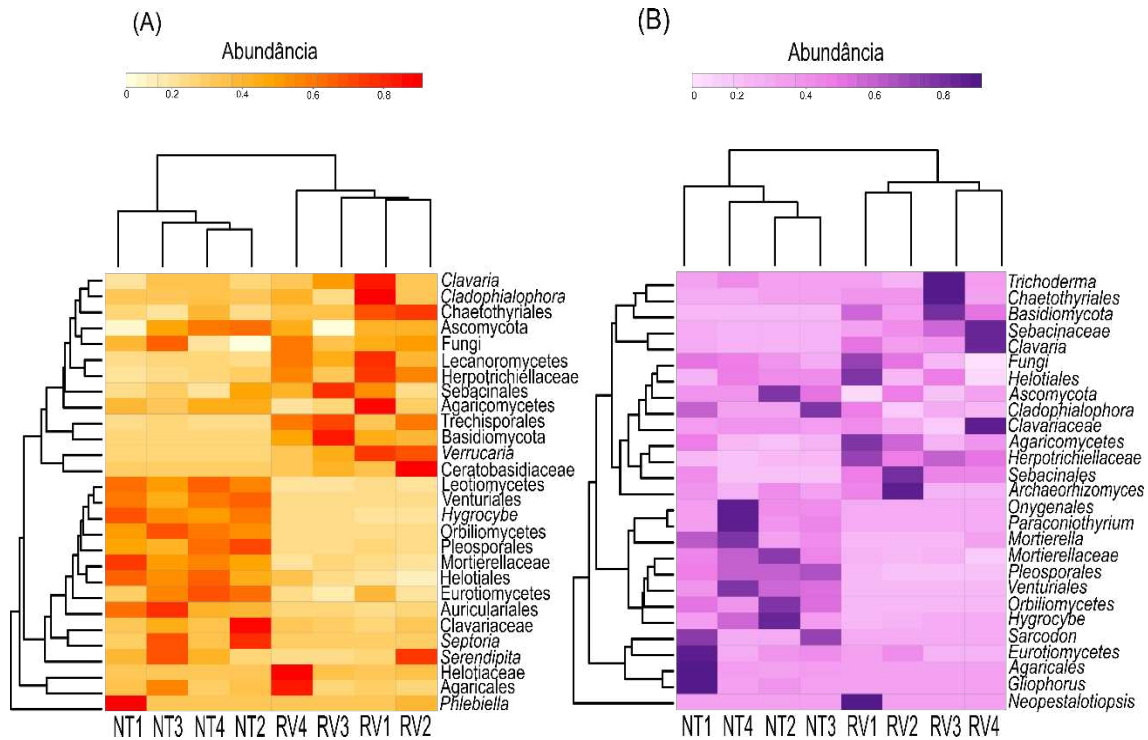
**Figura 3.** Análise de coordenadas principais (PCoA) baseadas no sequenciamento da região ITS no sítio de revegetação RV, com as amostras: RV1, RV2, RV3, RV4 e o sítio não perturbado, com vegetação nativa, NT com as amostras: NT1, NT2, NT3, NT4 durante duas épocas do ano: época seca: ES (esferas) e época chuvosa EC (quadrados)

As OTUs provenientes do sequenciamento, nas duas estações, foram atribuídas a 9 diferentes filos (Fig. 4 A e B), 31 classes, 77 ordens, 148 famílias e 532 gêneros identificados. Do total de seqüências de fungos para ambos os períodos, os filos Ascomycota seguido por Basidiomycota foram os mais abundantes em ambos os períodos e sítios. As médias de Ascomycota na estação seca foram de 51 % em RV e 66 % em NT e no período chuvoso 56 % em RV e 64 % em NT. Basidiomycota no período seco apresentou 39 % no sítio RV e 22 % no sítio NT. No período chuvoso, a média deste filo foi de 34 % em RV e 23 % em NT. A média dos fungos não identificados no período seco foi de 9 % em RV e 7 % em NT; enquanto no período chuvoso foi 8 % em RV e 7 % em NT.



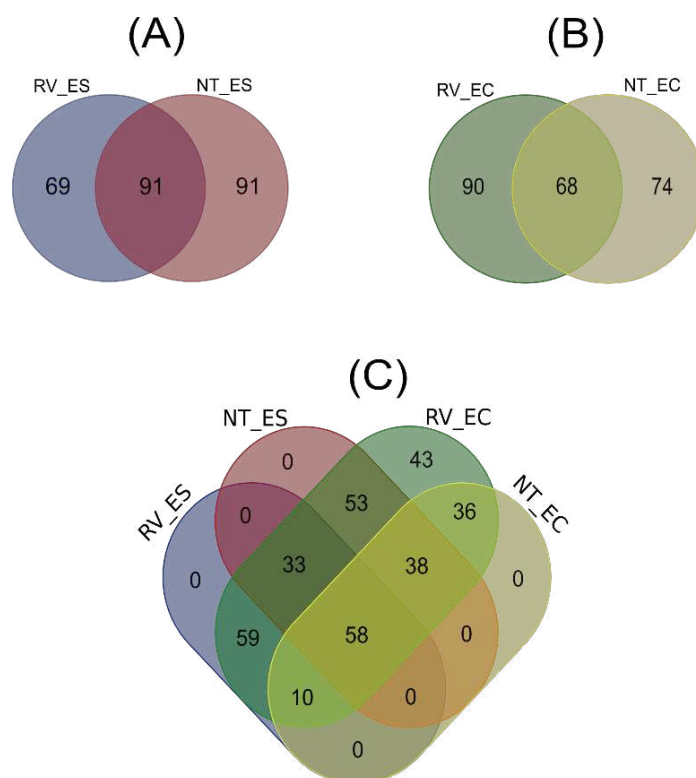
**Figura 4.** Abundância relativa em nível de filo dentro do reino Fungi nas épocas seca (A) e chuvosa (B), reveladas pelo sequenciamento da região ITS por meio da plataforma Illumina Miseq. As médias das amostras do sítio em revegetação, RV (circunferências internas) e do sítio de vegetação nativa, NT (circunferências externas)

Os táxons abundantes e compartilhados em ambos os períodos mostraram uma tendência similar na distribuição das abundâncias entre os sítios RV e NT, de forma independente do período, exceto o gênero *Cladophialophora* (Ascomycota), a família Clavariaceae (Basidiomycota) e a ordem Helotiales (Ascomycota) (Fig. 5 A e B).



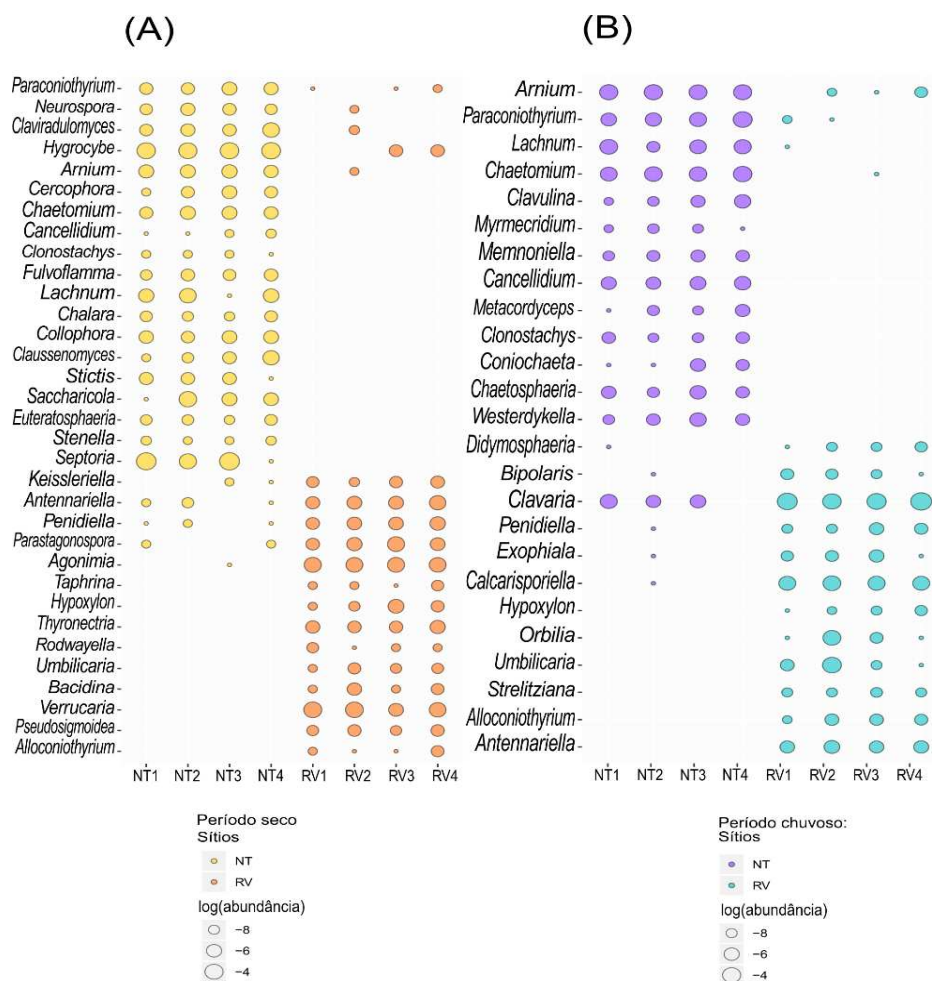
**Figura 5.** Composição fúngica revelada por sequenciamento em da região ITS, pela plataforma Illumina Miseq nas épocas seca (A) e chuvosa (B), no sítio de revegetação RV, com as amostras RV1, RV2, RV3, RV4 e o sítio não perturbado, com vegetação nativa, com as amostras NT1, NT2, NT3, NT4. As análises de agrupamento do heatmap da comunidade de fungos foram baseadas na matriz de distância Bray–Curtis calculadas a partir das OTUs mais abundantes e classificadas com o menor nível taxonômico possível. As cores mais intensas indicam elevada abundância de cada OTUs

A variação temporal também evidenciou oscilações na quantidade das OTUs em nível de gênero dentro e entre RV e NT na abundância destes (Fig. 6, A e B). Durante o período seco, os sítios RV e NT compartilharam mais gêneros de fungos identificados do que no período chuvoso (Fig. 6 A e B, Material suplementar, Tabela S1 e S2). Em RV, no período chuvoso o número de gêneros aumentou em relação ao período seco, enquanto no sítio NT, o número de gêneros diminuiu no período chuvoso em relação ao período seco. Juntos, os sítios RV e NT, nos períodos seco e chuvoso compartilharam 58 gêneros comum (Fig. 6, C).



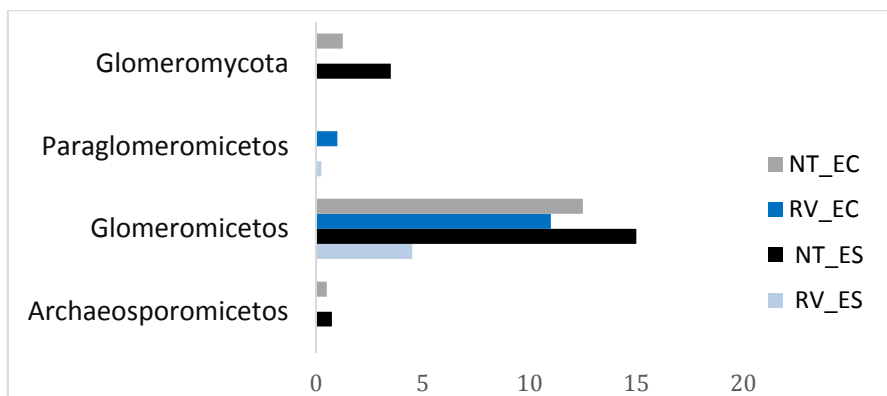
**Figura 6.** Diagrama de Venn evidenciando o número de gêneros de fungos identificados e encontrados nos sítios RV e NT nas épocas seca (A) e chuvosa (B) e em ambas as épocas (C)

Um total de 34 OTUs, identificadas como espécies indicadoras foram detectadas no período seco, onde 15 OTUs pertenceram a RV e 19 a NT. No período chuvoso, foram detectadas 25 OTUs, das quais 9 observadas em RV e 13 em NT. As OTUs definidas como espécies indicadoras em ambos os períodos para o sítio RV foram *Allocniothyrium*, *Hipoxylon*, *Antennariella*, *Umbilicaria* e *Penidiella*; enquanto no sítio NT *Cancellidium*, *Clonostachys*, *Chaetomium*, *Lachnum*, *Paraconiothyrum* e *Arnium* foram detectados em ambos os períodos (Fig. 7, A e B). *Hygrocybe* foi um dos gêneros mais abundantes em duas parcelas no sítio RV e NT no período seco (Fig. 7 A), enquanto *Clavaria* foi abundante em ambos os sítios no período chuvoso (Fig. 7 B). A maioria das OTUs reveladas como espécies indicadoras pertencem ao filo Ascomycota, porém membros do filo Basidiomycota (*Clavaria*, *Clavulina*, *Hygrocybe*) e do filo Calcarisporiellomycota (*Calcarisporiella*) foram detectados.



**Figura 7.** OTUs de fungos evidenciadas pela análise de espécies indicadoras com as respectivas abundâncias relativas nos sítios sob revegetação (RV) e nativo (NT), no período seco (A) e chuvoso (B)

Por meio do sequenciamento, verificou-se que entre os FMAs apenas o gênero *Ambispora*, pertencente à classe Archaeosporomycetos foi identificado como menor nível taxonômico, o qual foi encontrado apenas no sítio NT em ambos os períodos. O táxon Glomeromycota também foi encontrado somente no sítio NT, com médias de 3,5 % na estação seca e 1,25 % na estação chuvosa (Fig. 8). A classe dos Glomeromycetos foi observada em todos os sítios, sem restrições quanto ao período: no sítio RV as médias foram de 4,5 % na estação seca e 11% na estação chuvosa e, no sítio NT, as médias foram 15 % no período seco e 12,5 % no período chuvoso (Fig. 8). A classe dos Paraglomeromycetos foi relatada somente no sítio RV com médias de 0,25 % na estação seca, 1 % na estação chuvosa e a classe dos Archaeosporomycetos foi detectada somente em NT com médias de 0,75 % no período seco e 0,5 % no período chuvoso (Fig. 8).

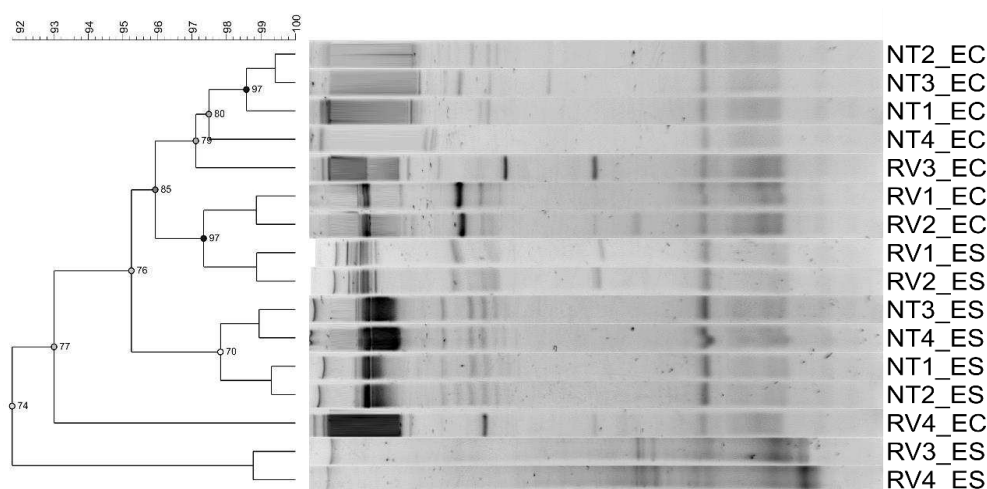


**Figura 8.** Filo e classes de Glomeromycota detectados pelo sequenciamento da região ITS na plataforma de Illumina Miseq nos sítios de revegetação (RV) e de vegetação nativa (NT) nas épocas seca (ES) e chuvosa (EC)

### Perfil da comunidade de Glomeromycota em NT e RV por DGGE

O perfil da comunidade de FMAs associadas a diferentes amostras de solo foi influenciado principalmente pelo período de amostragem, porém se observam diferenças entre os sítios (Fig. 9). No geral, o número de bandas, intensidade e composição mostraram algumas diferenças entre as estações seca e chuvosa.

Dois grupos principais com 95 % de similaridade foram formados (Fig. 9). O primeiro grupo foi composto por 87,5 % das amostras da estação chuvosa, que corresponderam aos sítios RV e NT, enquanto o segundo grupo foi constituído por 100 % das amostras da estação seca, todas do sítio NT. As amostras RV3 e RV4, da estação seca e RV4 da estação chuvosa dispersas em relação às demais.



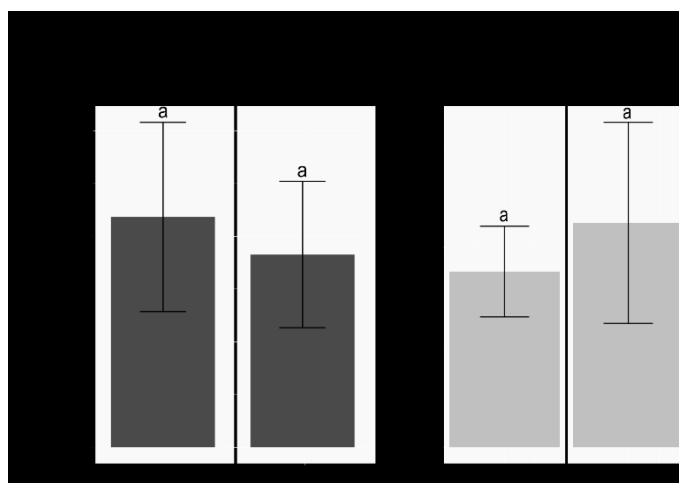
**Figura 9.** Dendrograma do perfil da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares gerados a partir da técnica de *Nested* PCR-DGGE, construídos pelo índice de correlação

de Cosine e análise de agrupamento pelo método do grupo de pares não ponderados usando médias aritméticas (UPGMA). RV = sítio de revegetação, com as amostras: RV1, RV2, RV3, RV4 e NT = sítio de vegetação nativa, não perturbado, com as amostras: NT1, NT2, NT3, NT4. A sazonalidade é expressa pelas siglas ES: época seca e EC: época chuvosa. Escala = similaridade (%)

### Contagem de esporos e espécies identificadas de FMAs

As médias do número de esporos não diferiram entre os sítios (p-valor = 0,456) e entre períodos de amostragem (p-valor = 0,216). Não houve interações entre os fatores sítio e tempo (p-valor = 0,522). As médias entre os sítios foram 218,4 em RV e 182,6 em NT e as médias entre períodos foram de 176,1 na época seca e na época chuvosa 224,8 (Fig. 10).

Foram identificadas um total de 29 espécies de FMAs pertencentes à 10 gêneros e as seguintes famílias: Paraglomeraceae, Archaeosporaceae, Glomeraceae, Acaulosporaceae e Gigasporaceae. Algumas espécies de FMAs como: *Glomus* sp1, *Acaulospora* cf. *mellea* e *Acaulospora* cf. *morrowiae* ocorreram em todos os sítios e nos dois períodos do ano (Tabela 2). Outras espécies foram detectadas em ambos os sítios no período seco, como *Paraglomus oculum* e *Archaeospora trappei*. Ambos os sítios apresentaram espécies exclusivas: 4 espécies no sítio NT, no período seco e 3 no período chuvoso, enquanto RV exibiu 1 espécie no período seco e 9 na estação chuvosa.



**Figura 10.** Médias do número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (A) nos sítios de revegetação (RV) e de vegetação nativa (NT) e nos períodos de amostragem seco e chuvoso (B). As médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes entre os sítios dentro do mesmo período pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares identificadas a partir das características morfológicas dos esporos, coletados no sítio de revegetação (RV) e vegetação nativa (NT), nos períodos seco e chuvoso

Família	Espécie	Período seco		Período chuvoso	
		RV	NT	RV	NT
Paraglomeraceae	<i>Paraglomus occultum</i>	+	+	-	-
Archaeosporaceae	<i>Archaeospora trappei</i>	+	+	-	-
Glomeraceae	<i>Dominikia cf. minuta</i>	-	+	-	-
	<i>Glomus glomerulatum</i>	+	-	+	-
	<i>Glomus spinuliferum</i>	+	-	-	-
	<i>Glomus</i> sp1	+	+	+	+
	<i>Glomus</i> sp2	+	+	-	-
	<i>Glomus</i> sp3	-	+	-	-
	<i>Glomus</i> sp4	-	-	-	+
	<i>Glomus</i> sp5	-	-	-	+
	<i>Glomus</i> sp6	-	-	+	-
	<i>Rhizophagus</i> sp1	-	-	+	-
	<i>Rhizophagus</i> sp2	-	-	+	-
Acaulosporaceae	<i>Acaulospora alpina</i>	-	-	+	-
	<i>Acaulospora cf. delicata</i>	-	-	+	-
	<i>Acaulospora cf. gedanensis</i>	-	-	+	-
	<i>Acaulospora cf. mellea</i>	+	+	+	+
	<i>Acaulospora cf. morrowiae</i>	+	+	+	+
	<i>Acaulospora cf. polonica</i>	-	-	+	-
	<i>Acaulospora cf. rehmi</i>	-	-	-	+
	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	-	+	+	+
	<i>Acaulospora sieverdingii</i>	-	+	-	-
	<i>Acaulospora</i> sp1	-	-	+	-
Gigasporaceae	<i>Cetraspora pellucida</i>	-	+	-	+
	<i>Dentiscutata biornata</i>	+	-	+	-
	<i>Gigaspora albida</i>	-	+	-	-
	<i>Scutellospora pernambucana</i>	-	-	+	-
	<i>Scutellospora</i> sp1	+	-	-	-

(+) presença, (-) ausência da espécie.

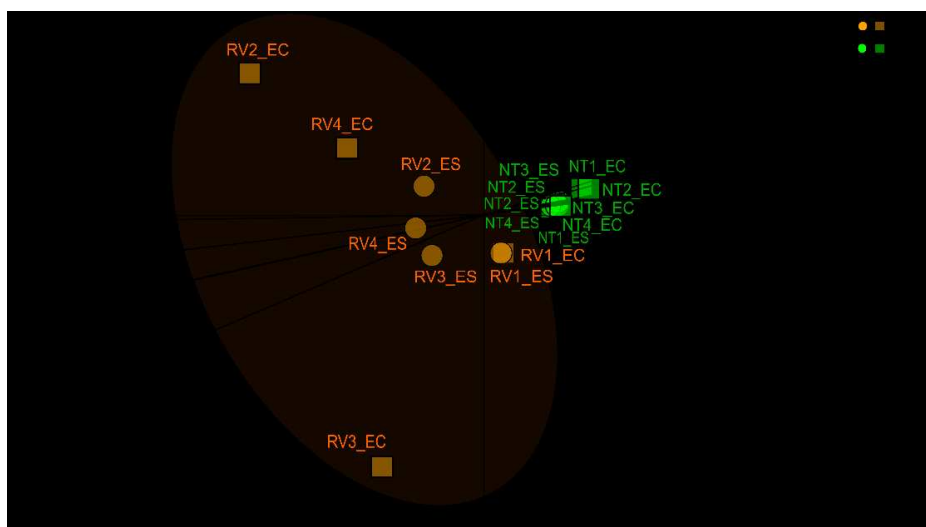
### Características físicas e químicas do solo e influências na comunidade de fungos

As características físico-químicas do solo exibiram diferenças entre os sítios RV e NT, exceto para o Zn ( $p = 0,281$ ), Cd ( $p = 0,115$ ) e macroporosidade ( $p = 0,100$ ) (Material suplementar tabela S2, capítulo 1). As comparações entre as medianas no teste não paramétrico de Mann Whitney resultaram em diferenças entre os dois sítios, com maiores valores para K, microporosidade, argila e proteína total do solo relacionada a glomalina

(PSRGT) para NT e os maiores valores para P e areia em RV (Material suplementar Tabela S3).

O teste de Mantel mostrou que os fungos, em ambas as estações coletadas, foram correlacionados com as características do solo ( $r = 0,6713$ ,  $p = 0,001$ ), considerando 999 permutações ( $p < 0,01$ ). A db-RDA evidenciou que as características do solo, relacionadas ao pH, densidade de partículas do solo (Dp), nutrientes como P e Mn, além do metal Cd influenciaram positivamente a maioria da comunidade fúngica do sítio RV, em ambos os períodos de amostragem, enquanto a comunidade fúngica do sítio NT de ambos os períodos foi influenciada positivamente pela maior parte dos componentes físico-químicas do solo, incluindo a PSRGT e matéria orgânica (Fig. 11, Material suplementar Tabela S4).

No sítio NT, a comunidade de fungos em ambos os períodos mostrou um padrão mais agregado, enquanto no sítio RV evidenciou maior dispersão, principalmente no período chuvoso. A amostra RV1 se aproximou das amostras NT tanto no período seco quanto no chuvoso.



**Figura 11.** Análise de distância baseada em redundância (db-RDA) realizada a partir da distribuição das abundâncias de fungos em relação às características físico-químicas do solo nos sítios revegetado (RV) e nativo (NT) e nas duas estações do ano ES (época seca) e EC (época chuvosa). Os valores de cada eixo mostram a porcentagem da variância total explicada por cada eixo. Foram realizadas permutações livres (999 permutações) para determinar a significância estatística entre as variáveis ambientais e variáveis resposta

A análise de co-ocorrência evidenciou que apesar das variáveis ambientais serem as mesmas para ambas as estações, as correlações positivas entre estas e a comunidade fúngica foram peculiares para cada período (Material suplementar, Fig. S2 e S3).

A maioria dos táxons de fungos no período seco tiveram forte correlação com os metais Cr e Cu incluindo os táxons Glomeromycota, Glomeraceae e *Ambispora* (Material suplementar, Fig. S2). Variáveis ambientais como matéria orgânica (MO), PSRGT, argila e densidade de partículas (Dp) sobressaíram no período seco. Apenas neste período, as correlações relativas à glomalina foram observadas com as OTUs: *Dirina*, *Aplosporella*, *Westerdykella*, *Geastrum*, *Peniophora*, *Rhodotorulla* e *Capnodiales*.

No período chuvoso, a maioria dos táxons fúngicos foram fortemente correlacionados com os macronutrientes S e K e os micronutrientes Ni e Zn. A ordem de FMAs Paraglomerales e o gênero *Ambispora* foram correlacionados com P e B (Material suplementar, Fig. S3). O P foi a única variável ambiental que sobressaiu somente no período chuvoso.

## **Discussão**

A estrutura da comunidade de fungos do sítio NT e o período seco evidenciaram os maiores valores para os estimadores ecológicos de diversidade e riqueza, corroborando nossa hipótese, indicando a complexidade deste sítio durante o período seco. No entanto, a composição da comunidade fúngica evidenciou que muitos táxons abundantes e compartilhados entre RV e NT não variaram com o período de amostragem. Os fatores que contribuíram individualmente para os estimadores ecológicos observados na comunidade fúngica em geral foram os sítios, que reflexo das características físico-químicas dos solos e o período da amostragem.

O esforço amostral revelado pela tendência assintótica, na curva de rarefação, revelou que em geral, o número de sequências foi satisfatório para todos os sítios em ambos os períodos. Para todas as métricas ecológicas, não foram observadas interações entre os sítios e períodos de amostragem, demonstrando que os sítios e os períodos influenciaram, individualmente na comunidade fúngica. De forma similar em alguns aspectos, em áreas de reabilitação de pós-mineração na China, os períodos de amostragem e os sítios de regeneração, formados por diferentes espécies de plantas influenciaram os índices de riqueza e Shannon para a comunidade de fungos, exceto para Simpson (Li *et al.*, 2013). Em contraste, elevados estimadores de Shannon e Chao 1 para Eucariotos

foram reportados um sítio de pós mineração, revegetado no Quadrilátero Ferrífero (Vieira *et al.*, 2018), o qual é similar à RV.

A estrutura das comunidades fúngicas diferiram dentro e entre os sítios como constatado na PCoA. Dentro do sítio NT, a maior dissimilaridade entre os períodos seco e chuvoso indica que neste sítio, a comunidade de fungos é mais complexa que em RV, que por sua vez foi mais similar entre si em ambos os períodos de amostragem. A estrutura da comunidade fúngica dissimilar entre RV e NT, independente do período seco e de chuva revela a distinção entre estes sítios, mesmo após 10 anos de encerramento das atividades de mineração e revegetação em RV. Em contraste, um sítio de pós mineração, revegetado de outra localidade pertencente à região do Quadrilátero Ferrífero revelou que os Eucariotos não diferiram entre os períodos de amostragem (Vieira *et al.*, 2018).

A predominância dos filos abundantes Ascomycota e Basidiomycota variou pouco entre os sítios e períodos. Contudo, em RV, Ascomycota predominou no período chuvoso, enquanto Basidiomycota predominou no período seco. Em contraste, um sítio similar a RV demonstrou a abundância de Ascomycota no período seco e Basidiomycota no período chuvoso (Vieira *et al.*, 2018). A abundância desses dois filos também foi relatada em pilhas de rejeitos pós-mineração de carvão (Harantová *et al.*, 2017), em área de mineração de carvão a céu aberto (Li *et al.*, 2016) e em áreas adjacentes e de mineração de cobre (Deng *et al.*, 2018) e em 40 amostras de solo de comunidades naturais em todo mundo (Tedersoo *et al.*, 2014), o que demonstra a ampla distribuição desses filos em ambientes influenciados ou não pela mineração.

Alguns táxons com níveis inferiores a filo e comuns em ambos os períodos exibiram uma dinâmica temporal própria como *Cladophialophora* (Ascomycota), Clavariaceae (Basidiomycota), Helotiales (Ascomycota) mostraram, de acordo como período, alterações na abundância entre os sítios RV e NT evidenciado no *heatmap*. O diagrama de Venn e OTUs indicadoras em nível de gênero, também reforçaram as diferenças na abundância composição e de fungos entre RV e NT nos dois períodos. Os Basidiomicetos da ordem Agaricales: *Hygrocybe*, na estação seca e *Clavaria*, na estação chuvosa foram abundantes tanto em RV como em NT. Os fungos ectomicorrízicos, simbiontes mutualistas, pertencem principalmente à esta ordem (Rudolph *et al.*, 2018). De fato, Basidiomicetos atuam efetivamente na catálise da decomposição da matéria orgânica do solo e a resistência deste grupo de fungos a toxicidade de certos metais pesados pode estar conectada com a quantidade de fenoloxidasas produzidas por estes fungos durante a decomposição dos polifenóis, componentes da matéria orgânica do solo: lignina, ácido

húmico, ácido fulvico e humina, os quais são ligados à metais pesados como Cu, Hg e Ni (Hoilland *et al.*, 1995). Isto explica a abundância de membros deste filo em NT e RV, mesmo sendo sítios distintos em cobertura vegetal e conteúdo de metais.

A distribuição das OTUs, nos nossos resultados pode ser atribuída não somente ao período de amostragem, mas principalmente às características ligadas ao solo e à dinâmica do uso de nutrientes por esses microrganismos nos habitats do sítio RV e NT. O tipo de vegetação e fertilidade do solo, geralmente são os principais fatores envolvidos nas diferenças diversidade em comunidades de fungos (Li *et al.*, 2016; Harantová *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2018). Em escala global, as variáveis climáticas explicaram as maiores proporções da riqueza e composição da comunidade de fungos, pois exibiram efeitos diretos e indiretos, que alteraram as variáveis florísticas e edáficas (Tedersoo *et al.*, 2014). Considerando ambos os sítios, nos períodos seco e chuvoso, as particularidades nas interações entre as comunidades fúngicas e as variáveis ambientais, demonstradas na análise de co-ocorrência reforçam a forte influência temporal destas interações.

Embora os efeitos temporais tenham a mesma abrangência nos dois sítios, os solos de RV e NT contribuem para a distinção na distribuição e abundância da comunidade fúngica. A mineração no sítio RV demonstrou efeitos significativos na fertilidade, textura e concentrações de metais no solo, mesmo após 10 anos de descomissionamento e posterior revegetação deste sítio. Isto se deve a deposição de estéreis de mineração provenientes das camadas mais profundas do solo e resíduos de rocha. Alguns estudos têm evidenciado uma maior resposta da comunidade fúngica à fertilidade do solo em áreas de pós-mineração (Li *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017), e efeitos proeminentes da sazonalidade (Li *et al.*, 2013). Outras respostas das comunidades fúngicas são relacionadas à metais pesados e metalóides (Narendrula-Kotha e Nkongolo, 2016; Deng *et al.*, 2018), textura do solo e a rizosfera (Deng *et al.*, 2018), pH (Rosenfeld *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2017).

Apesar dos baixos teores de matéria orgânica, de alguns nutrientes e uma faixa de pH um pouco mais elevada (5,7 a 5,9) do que o sítio NT, o sítio RV sustenta uma comunidade de fungos, que por meio da análise de db-RDA, mostra maior dispersão temporal-espacial. Esta distribuição em RV possivelmente é relacionada a revegetação deste sítio, que pode ter contribuído para a formação de novos nichos, assim como a dinâmica de nutrientes e metais no solo, que também pode variar com os períodos estudados. O sítio NT, no entanto, evidenciou pH mais baixo (com variações de pH de 5,0 a 5,2), apesar das elevadas quantidades de metais, nutrientes e matéria orgânica. Os

solos tropicais geralmente apresentam menor adsorção de metais pesados, pois são altamente intemperizados, apresentam minerais argilosos com cargas variáveis e dependentes do pH, o que contribui para uma menor afinidade e conseqüentemente, para o aumento da mobilidade de metais pesados tornando-os disponíveis para as plantas (Moreira *et al.*, 2015). Assim, a elevada concentração de metais encontrados no solo de NT, reflete esta dinâmica. Contudo, a elevada quantidade de matéria orgânica, estrutura do solo e a comunidade microbiana intrínseca, influencia diretamente na fertilidade deste sítio.

O efeito de metais tóxicos na abundância microbiana em habitats naturais varia com a natureza do metal, com os organismos presentes e fatores ambientais (Gadd, 1993). A diminuição da toxicidade dos metais é correlacionada com as fontes de carbono disponíveis no ambiente embora outros nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo, enxofre embora alguns metais também influenciem nas comunidades microbianas (Gadd, 2007, Fomina *et al.*, 2003; Rosenfeld *et al.*, 2018). É possível que o sítio NT também seja reflexo destas interações entre fertilidade do solo, metais, e a estrutura da comunidade fúngica. Desta forma, essas interações podem ser suportadas pela correlação positiva entre os metais analisados no solo, que exibiram as maiores concentrações em NT, e as comunidades fúngicas de ambos os períodos, como demonstrada pela db-RDA.

A PSRGT (proteína total do solo relacionada a glomalina), produzida nas hifas extraradiculares e parede do esporo dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode estabilizar metais potencialmente tóxicos como o Cu, Cd, Pb e Mn (Rilling, 2004). Além de contribuir para a formação de agregados do solo (Rilling, 2004) e ter correlação positiva com o carbono orgânico do solo em recuperação, em áreas de mineração (Kumar *et al.*, 2018). Em nossos resultados, embora a PSRGT esteja presente em ambos os sítios, a preponderância desta em NT, indica que este sítio apresenta uma maior estabilidade físico-química e principalmente microbiológica em relação ao sítio RV.

O perfil da comunidade de fungos do grupo Glomeromycota, assim como a quantidade média de esporos de FMAs entre os sítios não demonstraram influência do fator temporal. De forma oposta, em outras duas localidades do Quadrilátero Ferrífero os padrões de esporulação foram distintos dos nossos resultados. O número de esporos na estação chuvosa, no sítio de pós mineração revegetado, foi maior que no período seco para este sítio e para outros dois sítios adjacentes (Vieira *et al.*, 2017). Entre a pilha de estéril revegetada e os sítios adjacentes ao final do período seco, não houve diferença significativa na densidade de esporos (Teixeira *et al.*, 2017). Uma vez que a esporulação,

depende das condições ambientais e genótipo tanto do hospedeiro como do fungo, a abundância de esporos no solo pode não refletir precisamente a composição e a dinâmica da comunidade de FMA (Clapp *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 2008). Mesmo sendo ambientes de pós-mineração pertencentes à mesma região, estes fatores acima mencionados podem explicar o padrão equitativo de esporulação obtido, considerando as variações espaciais e temporais no nosso estudo.

A predominância de espécies de FMAs da família Glomeraceae seguida pela família Acaulosporaceae e Gigasporaceae, identificadas por morfologia de esporos mostrou uma tendência observada por outros pesquisadores, em ambientes de mineração (Krishnamoorthy *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Na região do Quadrilátero ferrífero, os estudos conduzidos em sítios de pós mineração de ferro e revegetado, semelhante à RV demonstraram que os gêneros mais representativos por identificação morfológica foram: *Acaulospora*, *Glomus* seguida de *Racocetra*, sendo nove espécies exclusivas desta área (Vieira *et al.*, 2017). Na pilha de estéril revegetada foram evidenciadas seis espécies exclusivas deste ambiente, das quais *Acaulospora alpina*, *Acaulospora scrobiculata* e *Acaulospora* sp1 também ocorreram no sítio RV do nosso estudo (Teixeira *et al.*, 2017).

Embora haja pouca compreensão sobre o que impulsiona a variação da diversidade de Glomeromycota, as espécies de FMAs apresentam tolerância diferencial a mudanças no seu ambiente, que refletem nas diferentes capacidades de sobrevivência dos mesmos (Chagnon *et al.*, 2013; van der Heyde *et al.*, 2017). Membros da família Acaulosporaceae apresentam tolerância ao estresse que inclui produção de menor biomassa, reduzindo a exposição ao estresse abiótico e ao rompimento micelial, além da frequentemente dormência baixas taxas de viabilidade de esporos (Chagnon *et al.*, 2013; van der Heyde *et al.*, 2017). Fungos da família Gigasporaceae exibem traços funcionais de competidor, voltados para exploração do solo, investindo mais em hifas extra radiculares e produção tardia de esporos durante a temporada de crescimento (Chagnon *et al.*, 2013; van der Heyde *et al.*, 2017; Hart *et al.*, 2002). As espécies de *Glomeraceae* se recuperam rapidamente da maioria dos eventos de perturbação ambiental devido às elevadas taxas de crescimento e ciclo de vida curtos, fusionam e renovam as hifas mais prontamente, além de investirem precocemente na formação de esporos (van der Heyde *et al.*, 2017).

O marcador utilizado para sequenciamento do DNA fúngico foi compatível com o propósito do nosso estudo da comunidade e diversidade de fungos, apesar da baixa detecção das sequências atribuídas a Glomeromycota. Vieira *et al.*, (2017) utilizaram o

LSU rRNA como marcador e a plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq e detectaram apenas quatro espécies e uma família de FMA, o que foi atribuído ao número relativamente pequeno de sequências deste grupo de fungos depositadas em banco de dados público. Em geral, para estudo de Glomeromycota, os marcadores utilizados visam combinações de primers que incluem as regiões ITS, SSU e LSU, que torna bem-sucedida a resolução taxonômica, principalmente entre espécies muito próximas (Lindahl *et al.*, 2013; Schlaeppi *et al.*, 2016).

Em conclusão, os maiores estimadores ecológicos foram observados no sítio de referência, NT e na estação seca, indicando a complexidade da estrutura da comunidade fúngica deste sítio e período de amostragem. As características espaciais, principalmente relacionadas à fertilidade do solo, influenciaram estreitamente a estrutura da comunidade fúngica sobretudo no sítio NT não perturbado pela mineração. A composição da comunidade também revelou a influência da dinâmica temporal-espacial para vários táxons, que evidenciaram padrões de abundância particulares, de acordo com os sítios e períodos. Embora a dinâmica temporal tenha abrangido a comunidade fúngica em geral, alguns táxons de fungos como Glomeromycota não mostraram distinção clara na entre período seco e chuvoso diante das análises direcionadas para este grupo.

## Referências

Badali, H., Gueidan, C., Najafzadeh, M. J., Bonifaz, A., van den Ende, A. H., & de Hoog, G. S. (2008) Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *Stud Mycol.* 61, 175-91. doi:10.3114/sim.2008.61.18.

Blake, G.R. and Hartge, K.H. Bulk density (1986) In: Klute, A. (Ed.). *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods.* 2nd edn. Agron. Madison, WI: American Society of Agronomy—Soil Science Society of America Monogr. 9. 363-375.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Bradshaw, A. (2000) The use of natural processes in reclamation - advantages and difficulties. *Landsc. Urban. Plan.* 51: 89-100. [https://doi.org/10.1016/S0169-2046\(00\)00099-2](https://doi.org/10.1016/S0169-2046(00)00099-2).

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK,

Fierer N, et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nat. Methods*. 7:335-336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.

Carvalho, F.; Souza, F.A.; Carrenho, R.; Moreira, F.M.S.; Jesus, E.C. & Fernandes, G.W. (2012) The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 52:9-19. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.001>.

Chagnon, P. L., Bradley, R. L., Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2013) A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. In *Trends in Plant Science*, 18: 484–491. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.001>.

Clapp, J.P; Young, J.P.W; J.W. Merryweather; Fitter, A.H. (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* 130: 259-265. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03047.x>.

Cornejo, P.; Azcon-Aguilar, C.; Barea. J. M.; Ferrol, N. (2004) Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 241: 265-270. [10.1016/j.femsle.2004.10.030](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.030).

Crognale, S.; D'Annibale, A.; Pesciaroli, L.; Stazi, S.R. and Petruccioli, M. (2017) Fungal Community Structure and As-Resistant Fungi in a Decommissioned Gold Mine Site. *Front. Microbiol.* 8:2202. doi: 10.3389/fmicb.2017.02202.

De Cáceres M, Legendre P, Moretti M (2010) Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119:1674–1684. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18334.x>.

Defelipo, BV & Ribeiro, AC (1997) Análise química do solo (metodologia), 2. ed. Viçosa, MG: UFV, Boletim de extensão 29.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa (2017) Manual de métodos de análise de solo. 3rd ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 573p.

Deng, S.; Ke, T.; Li, L.; Cai, S.; Zhou, Y.; Liu, Y.; Guo, *et al.* (2018) Impacts of environmental factors on the whole microbial communities in the rhizosphere of a metal-tolerant plant: *Elsholtzia haichowensis* Sun. *Env. Pollut.* 237: 1088-1097. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.037>.

Dentinger, B. and Mclaughlin, D. (2006) Reconstructing the Clavariaceae using nuclear large subunit rDNA sequences and a new genus segregated from Clavaria. *Mycologia*, 98: 746-762. DOI: 10.1080/15572536.2006.11832646.

Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight, R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.

Fernandes C.C., Kishi, L.T., Lopes, E. M., Omori, W. P., de Souza, J.A. M., Alves, L. M. C., Lemos, Lemos, E. G. M. (2018) Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. *Braz J Microbiol* 49: 489-502. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.006>.

Festin, E. S.; Tigabu, M.; Chileshe, M. N.; Syampungani, S.; Odén, P. C. Progresses in restoration of post-mining landscape in Africa (2018) *J. For. Res.* doi:10.1007/s11676-018-0621-x. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0621-x>.

Fomina, M.; Ritz, K.; Gadd, G.M. (2003) Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. *Mycological Research* 107: 861–871. <https://doi.org/10.1017/S095375620300786X>.

Gadd, G.M. (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124: 25–60.

Gadd, G.M. (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol. Res.* 111: 3-49. doi: 10.1016/j.mycres.2006.12.001.

Gerdeman, J.W. & Nicholson, T.H. (1963) Spores of mycorrhizal Endogene Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0).

Harantová, L; Mudrak, O.; Kohout, P.; Dana Elhottova, D.; Jan Frouz, J.; Baldrian, P. (2017) Development of microbial community during primary succession in areas degraded by mining activities. *Land Degrad Develop.* 28:2574–2584. DOI: 10.1002/ldr.2817.

Harris J (2009) Soil Microbial Communities and Restoration Ecology: Facilitators or followers? *Science* 325: 573-574. <https://doi.org/10.1126/science.1172975>.

He, J. H.; Tedersoo, L. H.; Hu, A., Han; C. H.; He, D.; Wei, H.; Jiao, M. et al. (2017) Greater diversity of soil fungal communities and distinguishable seasonal variation in temperate deciduous forests compared with subtropical evergreen forests of eastern China. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93:7. doi: 10.1093/femsec/fix069.

Hoiland K, (1995) Reaction of some decomposer basidiomycetes to toxic elements. Nord. J. Bot. 15: 305–318. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1995.tb00157.x>.

Jacobi CM, do Carmo FF, Vincent RC, Stehmann JR (2007) Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. Biodivers Conserv 16:2185–2200. DOI 10.1007/s10531-007-9156-8.

Kiehl, E.J. (1979) Manual de Edafologia: relações solo-planta. São Paulo: Ceres, pp.262.

Kolaříková, Z.; Kohout, P.; Krüger, C.; Janoušková, M.; Mrnka, L.; Rydlová, J. (2017) Root-associated fungal communities along a primary succession on a mine spoil: Distinct ecological guilds assemble differently. Soil. Biol. Biochem. 113: 143-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.06.004>.

Kowalchuck, G. A. de souza, F. A.; Van Veen, J. A. (2002) Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in dutch coastal sand dunes. Molecular Ecology. 11: 571-581.

Krishnamoorthy, R.; Kim, C.-G.; Subramanian, P.; Kim, K.-Y.; Selvakumar, G. & Sa, T.-M. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi community structure, abundance and species richness changes in soil by different levels of heavy metal and metalloid concentration. In PloS one 10: 0128784). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128784>.

Kumar, S.; Singh, A.K.; Ghosh, P. (2018) Distribution of soil organic carbon and glomalin related soil protein in reclaimed coal mine-land chronosequence under tropical condition. Sci. Total Environ. 625: 1341–1350.

Kuter, N. Reclamation of degraded landscapes due to opencast mining. In Advances in Landscape Architecture; Özyavuz, M., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2013; Available online:<https://www.intechopen.com/books/advances-in-landscape-architecture/reclamation-of-degraded-landscapes-due-to-opencast-mining> (accessed on 30 january 2019).

Lauber, c. L.; Strickland, M. S.; Bradford, M. A.; Fierer, N. (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. Soil Biol. Biochem.40: 2407–2415. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.05.021.

Lee, J., Lee, S., Young, P.W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of Arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol Ecol 65: 339–349. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x.

Leung, H.M.; Ye, Z.H.; Wong, M.H. (2007). Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere* 66: 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.06.037>.

Li, J.; Zheng, Y.; Yan, J.; Li, H.; Wang, X.; He, J.; Ding, G. (2013) Effects of Different Regeneration Scenarios and Fertilizer Treatments on Soil Microbial Ecology in Reclaimed Opencast Mining Areas on the Loess Plateau, China. *Plos one* 8: e63275. DOI: 10.1371/journal.pone.0063275.

Li, J.; Liu, F. and Chen, J. (2016) The Effects of Various Land Reclamation Scenarios on the Succession of Soil Bacteria, Archaea, and Fungi Over the Short and Long Term. *Front. Ecol. Evol.* 4:32. doi: 10.3389/fevo.2016.00032.

Liang, Z.; Drijber, R. A.; Lee, D. J.; Dwiekat, I. M.; Harris, S.D.; and Wedin, D.A. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil (2008) *Soil Biol Biochem.* Paper 95. <http://digitalcommons.unl.edu/plantpathpapers/95>. Accessed 23 jan 2019.

Lima, A.T.; Mitchell, K.; O’Connell, D.W.; Verhoeven, J.; Van Cappellen, P. (2016) The legacy of surface mining: Remediation, restoration, reclamation and rehabilitation. *Environ. Sci. Policy* 66: 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2016.07.011>.

Moreira, F.M.S; Ferreira, P.A.A.; Velela, L.A.F.; Carneiro, M.A.C (2015) Symbioses of Plants With Rhizobia and Mycorrhizal Fungi in Heavy Metal-Contaminated Tropical soils In: Sherameti, I; Varma, A. (eds) Heavy metal contamination of soils. *Soil Biology*, vol. 44, Springer, Cham.

Narendrula-Kotha, R. and Nkongolo, K. K. (2017) Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. *Ecol. Genet. Genomics* 2, 13–24. DOI: 10.1016/j.egg.2016.11.001.

Pyro VS, Roesh LFW, Ortega JM, Amaral AM, Tótola MR, Hirsch PR et al. (2014) *Microb Ecol* 67: 237. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0302-4>.

Roccoliello, E.; Marescotti, P.; Di Piazza, S.; Cecchi, G.; Mariotti, M.G.; Zotti, M. (2015) Biodiversity in metal contaminated sites – problem and perspective – a case study. In: Lo, Y.H., Blanco, J.A., Roy, S. (Eds.), *Biodiversity in Ecosystems - Linking Structure and Function*. InTech, pp. 581–600. DOI: 10.5772/59357.

Rosenfeld, C.E.; James, B.R.; Santelli, C.M. (2018) Persistent bacterial and fungal community shifts exhibited in selenium contaminated reclaimed mine soils. *Appl. Environ Microbiol* 84: e01394-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01394-18>.

Ruiz, H.A. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta da suspensão (silte + argila) (2005) *R. Bras. Ci. Solo*, 29: 297-300.

Lindahl, B. D.; Nilsson, R.H.; Tedersoo, L.; Abarenkov, K.; Carlsen, T.; Kjølter, R; Kõljalg, U. *et al.* (2013) Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide 199: 288–299. doi: 10.1111/nph.12243.

Maiti, S.K. (2013) Ecology and Ecosystem in Mine-Degraded Land. In: *Ecorestoration of the coalmine degraded lands*. Springer, India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-0851-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-0851-8_2).

Massaccesi G, Romero MC, Cazau MC, Bucsinszky AM, (2002) Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World J. Microb. and Biot.*18: 817–820.

Moreira, F.M.S; Ferreira, P.A.A.; Vilela, L.A.F.; Carneiro, M.A.C. Symbioses of Plants with Rhizobia and Mycorrhizal Fungi in Heavy Metal Contaminated Tropical Soils. In: Sherameti, I.; Varma, A. (2015) editores. *Heavy metal contamination of soil: Monitoring and remediation*. 2nd ed. New York: Springer, p.215-244. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14526-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14526-6_12).

Rillig, M.C. (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil quality. *Can. J. Soil. Sci.* 84: 355–363. <https://doi.org/10.4141/S04-003>.

Rosenfeld, C.E.; James, B.R.; Santelli, C.M. (2018) Persistent bacterial and fungal community shifts exhibited in seleniumcontaminated reclaimed mine soils. *Appl. Environ Microbiol* 84: e01394-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01394-18>.

Rudolph, S.; Maciá-Vicente, J.G; Lotz-Winter, H.; Schleuning, M.; Piepenbring, M. (2018) Temporal variation of fungal diversity in a mosaic landscape in Germany. *Stud. Mycol.* 89: 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.01.001>.

Schlaeppli, K.; Bender, S.F.; Mascher, F.; Russo, G.; Patrignani, A.; Camenzind, T.; Hempel, S.; Rillig, M.; van der Heijden, M.G.A. (2016) High-resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal Fungi. *New Phytol.* 3:780-791. doi: 10.1111/nph.14070.

Schmidt, P.A.; Balint, M.; Greshake, B.; Bandow, C.; Rombke, J; Schmitt, I. (2013) Illumina metabarcoding of a soil fungal community. *Soil Biol Biochem* 65: 128–132.

Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.L.; Levesque, C.A.; Chen, W. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 109: 6241–6246.

Sessitsch, A.; Weilharter, A.; Gerzabek, M.H.; Kirchmann, H.; Kandeler, E. (2001) Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Environ. Microb. Appl. Environ. Microb.* 67: 4215–4224.

Sheoran V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2010). Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water*, 3: 1–21. <https://doi.org/Available> at: <http://scholarworks.umass.edu/intljssw/vol3/iss2/13>.

Sheoran V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2010) Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water*, 3: 1–21. <https://doi.org/Available> at: <http://scholarworks.umass.edu/intljssw/vol3/iss2/13>.

Silva, A.O.; Costa, A. M.; Teixeira, A.F.S.; Guimarães, A.A.; Santos, J.V. Moreira, F.M.S. (2018) Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. *Ecol. Indic.* 93: 142-151.

Suija, A.; Ertz, D.; Lawrey, J.D.; Diederich, P. (2015) Multiple origin of the lichenicolous life habit in Helotiales, based on nuclear ribosomal sequences. *Fungal Diversity* 70: 55. <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0287-4>.

Tedersoo, L.; Bahram, M.; Põlme, S.; Kõljalg, U.; Yorou, N. S.; Wijesundera, R.; Ruiz, L.V. *et al.* (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:1078. doi:10.1126/science.1256688.

Tedersoo, L.; Sánchez-Ramírez, S.; Kõljalg, U.; Bahram, M.; Döring, M.; Schigel, D.; May, T. *et al.* (2018) High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Divers.* 90:135–159. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>.

Teixeira, A.F. S.; Kimmelmeier, K.; Marascalchi, M. N.; Stürmer, S.L.; Carneiro, M. A. C.; Moreira, F.M.S. (2017) Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings: Inoculum potential, density, and diversity of spores related to soil properties. *Ciência e Agrotecnologia*, 5:511-525. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-70542017415014617>.

Tian, Q., Taniguchi, T., Shi, W.-Y., Li, G., Yamanaka, N., & Sheng, D. U. (2017) Land-use types and soil chemical properties influence soil microbial communities in the semiarid loess plateau region in China. *Sci Rep*, 7: 45289. <https://doi.org/10.1038/srep45289>.

Usui, E.; Takashima, Y. and Narisawa, K. (2016). *Cladophialophora inabaensis* sp. nov., a New Species among the Dark Septate Endophytes from a Secondary Forest in Tottori, Japan. *Microbes Environ.* 31:357-60. DOI: 10.1264/jsme2.ME16016.

van der Heyde, M., Ohsowski, B., Abbott, L. K., & Hart, M. (2017) Arbuscular mycorrhizal fungus responses to disturbance are context-dependent. *Mycorrhiza*, 27: 431–440. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0759-3>.

Vargas-Gastélum, L.; Romero-Olivares, A.L.; Escalante, A.E.; Rocha-Olivares, A.; Brizuela, C.; Riquelme, M. *et al.* (2015) Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiol Ecol.* 91: fiv044. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv044>.

Vieira, C. K.; Marascalchi, M.N.; Rodrigues, A.V.; de Armas, R.D.; Stürmer, S.L. (2017) Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. *J. Environ. Sci.* 67: 330-343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2017.08.019>.

Vieira, C. K.; Borges, L.G.A.; Marconatto, L.; Giongo, A.; Stürmer, S.L. (2018). Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Appl Soil Ecol* 131:55-65. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.07.011>.

Walkley, A. and Black, I.A. (1934) An Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*, 37: 29-38. DOI: 10.1097/00010694-193401000-00003.

Wright, S.F.; Upadhyaya, A. (1996) Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 161: 575-586. DOI :10.1097/00010694-199609000-00003.

Yang, Y.; Song, Y.; Scheller, H.V.; Ghosh, A.; Ban, Y.; Chen, H. et al., Tang, M. (2015). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Robinia pseudoacacia* in uncontaminated and heavy metal contaminated soils, *Soil Biology & Biochemistry*, 86: 146-158 <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.018>.

Yang Y, He C, Huang L, Ban Y, Tang M (2017) The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on glomalin-related soil protein distribution, aggregate stability and their relationships with soil properties at different soil depths in lead-zinc contaminated area. *Plos one* 12: e0182264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182264>.

Yu, J.; Xue, Z.; He, X.; Liu, C.; Steinberger, Y. (2017) Shifts in composition and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin contents during revegetation of

desertified semiarid grassland. Appl. Soil Ecol.115:60-67.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.015>.

## Material suplementar

Tabela S1. Gêneros de fungos identificados por sequenciamento na estação seca dentro e entre os sítios RV e NT

RV estação seca	NT estação seca		RV e NT estação seca	
<i>Rhodoveronaea</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Melanospora</i>	<i>Sistotrema</i>	<i>Arnium</i>
<i>Hamigera</i>	<i>Leptodiscella</i>	<i>Davidiella</i>	<i>Cadophora</i>	<i>Nemania</i>
<i>Crocicreas</i>	<i>Shiraia</i>	<i>Ambispora</i>	<i>Didymosphaeria</i>	<i>Cladorrhinum</i>
<i>Umbilicaria</i>	<i>Stictis</i>	<i>Septoria</i>	<i>Stagonospora</i>	<i>Preussia</i>
<i>Noosia</i>	<i>Cancellidium</i>	<i>Fusicolla</i>	<i>Strelitziana</i>	<i>Talaromyces</i>
<i>Candida</i>	<i>Stenella</i>	<i>Passalora</i>	<i>Myxocephala</i>	<i>Parastagonospora</i>
<i>Teratosphaericola</i>	<i>Setomelanomma</i>	<i>Ganoderma</i>	<i>Peniophora</i>	<i>Pseudocercospora</i>
<i>Pseudocosmospora</i>	<i>Fulvoflamma</i>	<i>Lachnum</i>	<i>Antennariella</i>	<i>Penidiella</i>
<i>Thyronectria</i>	<i>Durella</i>	<i>Xylaria</i>	<i>Basidiobolus</i>	<i>Setophoma</i>
<i>Bacidia</i>	<i>Bryochiton</i>	<i>Chalara</i>	<i>Bipolaris</i>	<i>Capronia</i>
<i>Dictyosporium</i>	<i>Elasticomyces</i>	<i>Lambertella</i>	<i>Psilocybe</i>	<i>Phoma</i>
<i>Veronaea</i>	<i>Oidiodendron</i>	<i>Trapelia</i>	<i>Hygrocybe</i>	<i>Mortierella</i>
<i>Botrytis</i>	<i>Scleroderma</i>	<i>Antrodiella</i>	<i>Chaetosphaeria</i>	<i>Coniochaeta</i>
<i>Paecilomyces</i>	<i>Memnoniella</i>	<i>Pseudoacrodictys</i>	<i>Geastrum</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Dendryphiella</i>	<i>Chloridium</i>	<i>Helminthosporium</i>	<i>Symmetrospora</i>	<i>Metapochonia</i>
<i>Glomerobolus</i>	<i>Phaeoacremonium</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Trechispora</i>	<i>Keissleriella</i>
<i>Tolypocladium</i>	<i>Paramycosphaerella</i>	<i>Phacidiella</i>	<i>Phaeosphaeria</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Candelabrochaete</i>	<i>Gliophorus</i>	<i>Geoglossum</i>	<i>Lophiostoma</i>	<i>Periconia</i>
<i>Xenopenidiella</i>	<i>Laetisaria</i>	<i>Teratosphaeria</i>	<i>Wojnowicia</i>	<i>Pisolithus</i>
<i>Verrucaria</i>	<i>Basidioascus</i>	<i>Capnobotryella</i>	<i>Devriesia</i>	<i>Westerdykella</i>
<i>Auricularia</i>	<i>Hyaloscypha</i>	<i>Pseudoteratosphaeria</i>	<i>Austroafricana</i>	<i>Umbelopsis</i>
<i>Endocarpon</i>	<i>Galerina</i>	<i>Ramaria</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Hyphoderma</i>
<i>Rhizoctonia</i>	<i>Rasamsonia</i>		<i>Nigrospora</i>	
<i>Mycosphaerella</i>	<i>Clavulina</i>		<i>Dactylellina</i>	

<i>Cataractispora</i>	<i>Vertexicola</i>		<i>Ramichloridium</i>	
<i>Hymenoscyphus</i>	<i>Saccharicola</i>		<i>Recurvomyces</i>	
<i>Thelonectria</i>	<i>Acanthostigma</i>		<i>Agonimia</i>	
<i>Neofusicoccum</i>	<i>Alternariaster</i>		<i>Neodevriesia</i>	
<i>Leiosphaerella</i>	<i>Myrmecridium</i>		<i>Conlarium</i>	
<i>Favolus</i>	<i>Articulospora</i>		<i>Archaeorhizomyces</i>	
<i>Podonectria</i>	<i>Arrhenia</i>		<i>Metacordyceps</i>	
<i>Pectenia</i>	<i>Neomycosphaerella</i>		<i>Trichoderma</i>	
<i>Byssoloma</i>	<i>Cladosporium</i>		<i>Helicoma</i>	
<i>Buckleyzyma</i>	<i>Claussenomyces</i>		<i>Arthrobotrys</i>	
<i>Candelariella</i>	<i>Acidomelania</i>		<i>Claviradulomyces</i>	
<i>Junewangia</i>	<i>Viridispora</i>		<i>Cladophialophora</i>	
<i>Bacidina</i>	<i>Cochliobolus</i>		<i>Aplosporella</i>	
<i>Scoliciosporum</i>	<i>Phialocephala</i>		<i>Sphaeropsis</i>	
<i>Gamsylella</i>	<i>Tricholoma</i>		<i>Orbilina</i>	
<i>Phaeococcomyces</i>	<i>Alyxoria</i>		<i>Toxicocladosporium</i>	
<i>Gyrothrix</i>	<i>Cercophora</i>		<i>Serendipita</i>	
<i>Heterocephalacria</i>	<i>Collophora</i>		<i>Cheiromoniliophora</i>	
<i>Rodwayella</i>	<i>Geminibasidium</i>		<i>Cryptococcus</i>	
<i>Phanerochaete</i>	<i>Tomentella</i>		<i>Sclerostagonospora</i>	
<i>Limonomyces</i>	<i>Microdochium</i>		<i>Acremonium</i>	
<i>Ascochyta</i>	<i>Hodophilus</i>		<i>Wojnowiciella</i>	
<i>Zymoseptoria</i>	<i>Clonostachys</i>		<i>Paraconiothyrium</i>	
<i>Piloderma</i>	<i>Meliniomyces</i>		<i>Dirina</i>	
<i>Pseudophialophora</i>	<i>Neophysalospora</i>		<i>Coniothyrium</i>	
<i>Spegazzinia</i>	<i>Bjerkandera</i>		<i>Erythrobasidium</i>	
<i>Nectria</i>	<i>Junghuhnia</i>		<i>Mycena</i>	
<i>Pseudolophiostoma</i>	<i>Xenosonderhenia</i>		<i>Tiarosporella</i>	
<i>Gibberella</i>	<i>Geomyces</i>		<i>Xenoteratosphaeria</i>	
<i>Fonsecaea</i>	<i>Muriphaeosphaeria</i>		<i>Phlebiella</i>	

<i>Buellia</i>	<i>Euteratosphaeria</i>		<i>Phialophora</i>	
<i>Dictyocheirospora</i>	<i>Lecanicillium</i>		<i>Scytalidium</i>	
<i>Rachicladosporium</i>	<i>Chaetomium</i>		<i>Massarina</i>	
<i>Pseudosigmoidea</i>	<i>Melanogaster</i>		<i>Cyphellophora</i>	
<i>Marchandiomyces</i>	<i>Solicoccozyma</i>		<i>Exophiala</i>	
<i>Xenoconiothyrium</i>	<i>Pyrenochaetopsis</i>		<i>Tetraplophaeria</i>	
<i>Hypoxylon</i>	<i>Trimmatothelopsis</i>		<i>Pseudoramichloridium</i>	
<i>Alloconiothyrium</i>	<i>Pseudorobillarda</i>		<i>Paraphaeosphaeria</i>	
<i>Diaporthe</i>	<i>Neosulcatispora</i>		<i>Neurospora</i>	
<i>Spencerozyma</i>	<i>Dactylella</i>		<i>Rhodotorula</i>	
<i>Cercospora</i>	<i>Dactylaria</i>		<i>Clavaria</i>	
<i>Taphrina</i>	<i>Phaeoclavulina</i>		<i>Catenulostroma</i>	
<i>Xylopsora</i>	<i>Hazslinszkyomyces</i>		<i>Calcarisporiella</i>	
<i>Zasmidium</i>	<i>Stamnaria</i>		<i>Nectriopsis</i>	
<i>Pseudotetraploa</i>	<i>Dothistroma</i>		<i>Teichospora</i>	

Tabelas S2. Gêneros de fungos identificados por sequenciamento na estação chuvosa dentro e entre os sítios RV e NT

RV estação chuvosa		NT estação chuvosa	RV e NT estação chuvosa
<i>Scedosporium</i>	<i>Septoria</i>	<i>Dichotomopilus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Rhodoveronaea</i>	<i>Xenoconiothyrium</i>	<i>Leptodiscella</i>	<i>Cadophora</i>
<i>Strelitziana</i>	<i>Hypoxylon</i>	<i>Stagonospora</i>	<i>Didymosphaeria</i>
<i>Daldinia</i>	<i>Setophoma</i>	<i>Phaeocystroma</i>	<i>Myxocephala</i>
<i>Meruliopsis</i>	<i>Heterochaete</i>	<i>Shiraia</i>	<i>Candida</i>
<i>Umbilicaria</i>	<i>Lambertella</i>	<i>Sagenomella</i>	<i>Thyronectria</i>
<i>Peniophora</i>	<i>Alloconiothyrium</i>	<i>Phlebia</i>	<i>Dictyosporium</i>
<i>Teratosphaericola</i>	<i>Caryophylloseptoria</i>	<i>Cancellidium</i>	<i>Bipolaris</i>
<i>Antennariella</i>	<i>Micarea</i>	<i>Basidiobolus</i>	<i>Hygrocybe</i>
<i>Epulorhiza</i>	<i>Funalia</i>	<i>Fulvoflamma</i>	<i>Gastrum</i>
<i>Cytospora</i>	<i>Cosmospora</i>	<i>Durella</i>	<i>Trechispora</i>
<i>Roussoella</i>	<i>Clypeophysalospora</i>	<i>Psilocybe</i>	<i>Phaeosphaeria</i>
<i>Glomerobolus</i>	<i>Curvularia</i>	<i>Phialemoniopsis</i>	<i>Steccherinum</i>
<i>Purpureocillium</i>	<i>Leucosporidium</i>	<i>Chaetosphaeria</i>	<i>Phaeoacremonium</i>
<i>Scleroderma</i>	<i>Teratosphaeria</i>	<i>Poaceascoma</i>	<i>Lophiostoma</i>
<i>Candelabrochaete</i>	<i>Hyphoderma</i>	<i>Biatora</i>	<i>Xenomeris</i>
<i>Resinicium</i>		<i>Oidiodendron</i>	<i>Devriesia</i>
<i>Xenopenidiella</i>		<i>Memnoniella</i>	<i>Pestalotiopsis</i>
<i>Rutstroemia</i>		<i>Chloridium</i>	<i>Nigrospora</i>
<i>Verrucaria</i>		<i>Tolypocladium</i>	<i>Archaeorhizomyces</i>
<i>Arthrocladium</i>		<i>Pulvinula</i>	<i>Conlarium</i>
<i>Leptospora</i>		<i>Wojnowicia</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Rhytidhysterion</i>		<i>Gliophorus</i>	<i>Emericella</i>
<i>Dactylellina</i>		<i>Laetisaria</i>	<i>Helicoma</i>
<i>Polyporus</i>		<i>Hyphodermella</i>	<i>Acidomelania</i>
<i>Ramichloridium</i>		<i>Hyaloscypha</i>	<i>Cladophialophora</i>
<i>Agonimia</i>		<i>Pseudallescheria</i>	<i>Toxicocladosporium</i>
<i>Helicomycetes</i>		<i>Rasamsonia</i>	<i>Serendipita</i>
<i>Neodevriesia</i>		<i>Recurvomyces</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Fimetariella</i>		<i>Clavulina</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Hymenoscyphus</i>		<i>Vertexicola</i>	<i>Paraconiothyrium</i>
<i>Entoloma</i>		<i>Leiothecium</i>	<i>Erythrobasidium</i>

<i>Hydnopolyporus</i>		<i>Metacordyceps</i>	<i>Dirina</i>
<i>Articulospora</i>		<i>Myrmecridium</i>	<i>Coniothyrium</i>
<i>Ceratobasidium</i>		<i>Cladosporium</i>	<i>Phanerochaete</i>
<i>Arthrotrys</i>		<i>Claussenomyces</i>	<i>Exophiala</i>
<i>Stereum</i>		<i>Viridispora</i>	<i>Pseudophialophora</i>
<i>Aschersonia</i>		<i>Phialocephala</i>	<i>Pseudoramichloridium</i>
<i>Gliocladium</i>		<i>Rigidoporus</i>	<i>Paraphaeosphaeria</i>
<i>Buckleyzyma</i>		<i>Trichothecium</i>	<i>Neurospora</i>
<i>Aplosporella</i>		<i>Collophora</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Sarocladium</i>		<i>Geminibasidium</i>	<i>Pyrenochaeta</i>
<i>Sphaeropsis</i>		<i>Microdochium</i>	<i>Clavaria</i>
<i>Rhodosporidiobolus</i>		<i>Culicidospora</i>	<i>Calcarisporiella</i>
<i>Orbilina</i>		<i>Clonostachys</i>	<i>Neopestalotiopsis</i>
<i>Camarosporium</i>		<i>Xenosonderhenia</i>	<i>Arnium</i>
<i>Bacidina</i>		<i>Laxitextum</i>	<i>Preussia</i>
<i>Dinemasporium</i>		<i>Euteratosphaeria</i>	<i>Parastagonospora</i>
<i>Cryptococcus</i>		<i>Isaria</i>	<i>Lachnum</i>
<i>Sclerostagonospora</i>		<i>Acremoniopsis</i>	<i>Pseudocercospora</i>
<i>Neophaeosphaeria</i>		<i>Gymnopilus</i>	<i>Xylaria</i>
<i>Wojnowiciella</i>		<i>Deconica</i>	<i>Penidiella</i>
<i>Phaeococcomyces</i>		<i>Ascochyta</i>	<i>Capronia</i>
<i>Gyrothrix</i>		<i>Phialophora</i>	<i>Trapelia</i>
<i>Debaryomyces</i>		<i>Sarcinomyces</i>	<i>Mortierella</i>
<i>Mycena</i>		<i>Neosulcatispora</i>	<i>Phoma</i>
<i>Tiarosporella</i>		<i>Xenasma</i>	<i>Knufia</i>
<i>Rodwayella</i>		<i>Circinotrichum</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Sterigmatomyces</i>		<i>Sarcodon</i>	<i>Diaporthe</i>
<i>Phlebiella</i>		<i>Fonsecaea</i>	<i>Metapochonia</i>
<i>Piloderma</i>		<i>Cyrenella</i>	<i>Cercospora</i>
<i>Curvibasidium</i>		<i>Nemania</i>	<i>Keissleriella</i>
<i>Tetraplospora</i>		<i>Ambispora</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Aureobasidium</i>		<i>Petriellopsis</i>	<i>Periconia</i>
<i>Cephaliophora</i>		<i>Fusicolla</i>	<i>Geoglossum</i>
<i>Catenulostroma</i>		<i>Clavulinopsis</i>	<i>Rhizopus</i>

<i>Tetracladium</i>		<i>Humicola</i>	<i>Pisolithus</i>
<i>Teichospora</i>		<i>Talaromyces</i>	<i>Umbelopsis</i>
<i>Metarhizium</i>		<i>Coniochaeta</i>	
<i>Gibberella</i>		<i>Antrodiella</i>	
<i>Pseudosigmoidea</i>		<i>Rhizoscyphus</i>	
<i>Heterodermia</i>		<i>Pseudoacrodactys</i>	
<i>Artomyces</i>		<i>Neoheteroceras</i>	
<i>Leuconeurospora</i>		<i>Westerdykella</i>	

Tabela S3. Características físico-químicas do solo coletado de 0-20 cm de profundidade entre os sítios nativo (NT) e de pós-mineração, revegetado (RV). Teste de Mann-Whitney para medianas em cada sítio e seus respectivos valores de p são mostrados abaixo, considerando a significância  $p < 0,05$  como significativo

Características do solo	p-valor	Mediana	
		NT	RV
P (mg/dm <sup>3</sup> )	0,030*	1,89	11,25
K (mg/dm <sup>3</sup> )	0,029*	58,5	6,2
Microporosidade (m <sup>3</sup> / m <sup>3</sup> )	0,885 <sup>ns</sup>	0,218	0,170
Areia (kg/kg)	0,030*	0,382	0,456
Argila (kg/kg)	0,030*	0,396	0,095
PSRGT (mg. g solo seco <sup>-1</sup> )	0,030*	0,717	0,012

\* p < 0,05 <sup>ns</sup> não significativo

Tabela S4. Significância estatística entre variáveis ambientais e OTUs fúngicas obtidas por permutações livres (999 permutações) da análise de distância baseada em redundância (db- RDA) com valores de r e p ranqueados

Variáveis	r <sup>2</sup>	p-valor
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	0,7194	0,001 ***
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	0,6514	0,002 **
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	0,6746	0,002 **
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	0,4330	0,023 *
Cr (mg/dm <sup>3</sup> )	0,5588	0,004 **
Ni (mg/dm <sup>3</sup> )	0,5076	0,005 **
Cd (mg/dm <sup>3</sup> )	0,2432	0,137
S (mg/dm <sup>3</sup> )	0,7406	0,001 ***
B (mg/dm <sup>3</sup> )	0,5736	0,001 ***
Mg (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,7564	0,001 ***
Al (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,7031	0,001 ***
H+Al (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> ) (acidez potencial)	0,7260	0,001 ***
M (%) (saturação por Al)	0,6912	0,001 ***
MO (dag/kg)	0,7407	0,001 ***
pH. H <sub>2</sub> O	0,6261	0,001 ***
P (mg/dm <sup>3</sup> )	0,5239	0,003 **
K (mg/dm <sup>3</sup> )	0,7562	0,001 ***
Ca (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,8063	0,001 ***
Densidade de partículas (Dp) (m <sup>3</sup> / m <sup>3</sup> )	0,7132	0,001 ***
Argila (kg/kg)	0,7264	0,001 ***
PSRGT (mg. g solo seco <sup>-1</sup> )	0,7062	0,001 ***

Significância: 0 '\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.' 0,1 ''

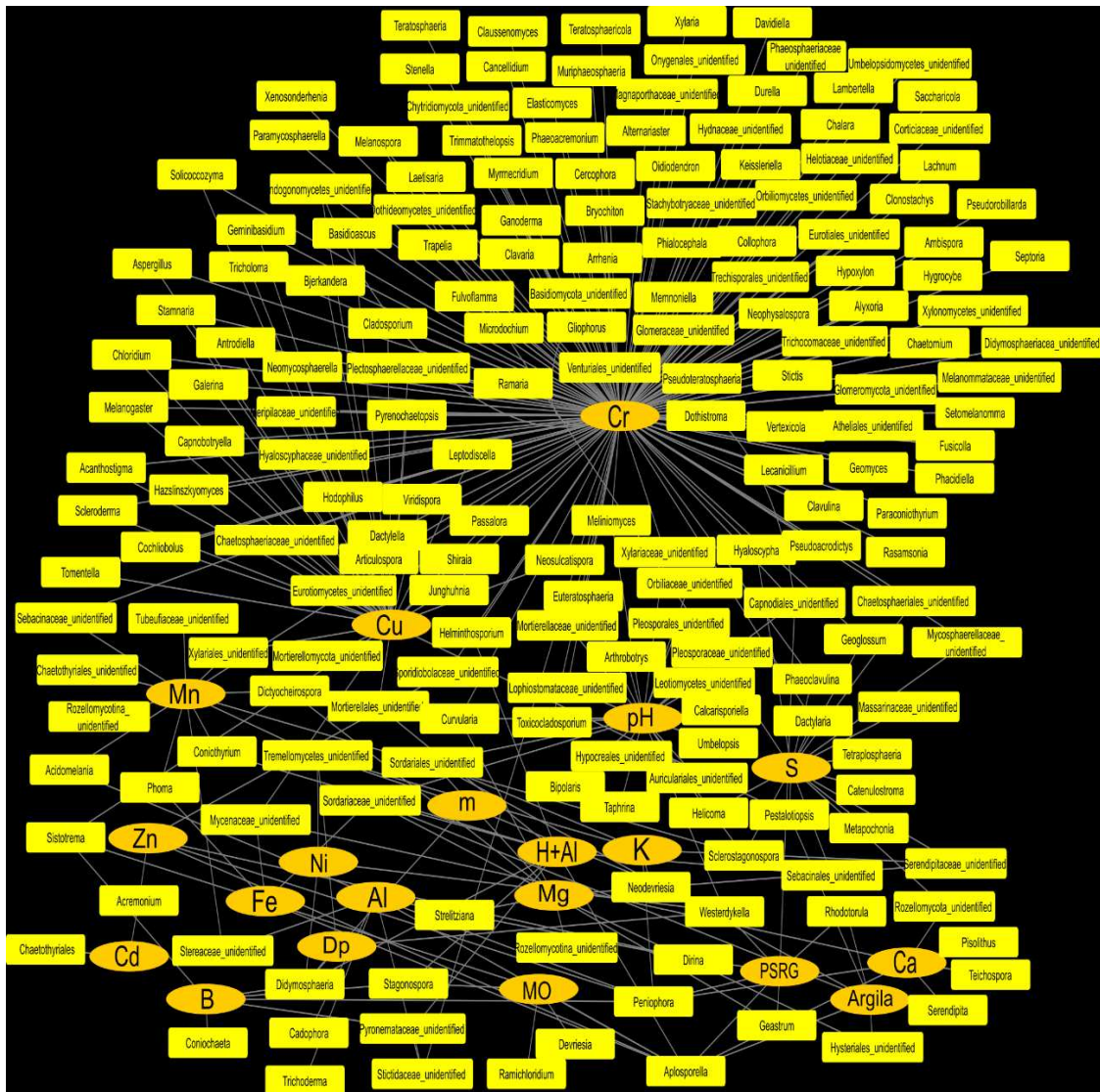


Figura S2. Redes de co-ocorrência nos sítios RV e NT na estação seca. Dp: Densidade de partículas, H+ Al: acidez potencial, PSRG: proteína total do solo relacionada a glomalina

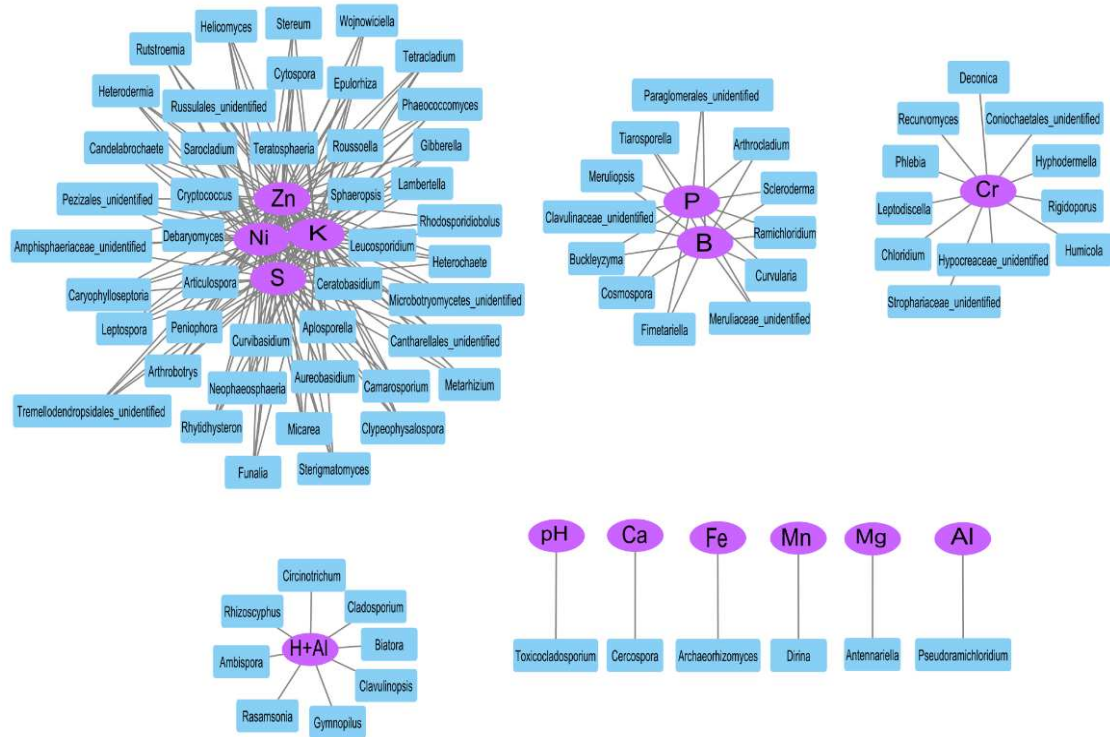


Figura S3. Redes de co-ocorrência nos sítios RV e NT na estação chuvosa. H+ Al: acidez potencial

### **CAPÍTULO 3: Comunidade fúngica do inoculante de FMA obtido por *on-farm* e seu efeito no crescimento de *Paspalum densum* cultivado em rejeito de mineração de ferro e pilha de estéril com adição de cama de frango**

#### **Resumo**

A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAS), aliada a introdução de componentes orgânicos, durante a inserção de plantas nativas tolerantes ao ferro em áreas de pós-mineração é uma das alternativas para mitigar os impactos ambientais, por potencializar o desenvolvimento da comunidade vegetal nestas áreas. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a comunidade de fungos dos inoculantes obtidos pela técnica *on-farm*, por meio do sequenciamento da região ITS rDNA, pela plataforma Illumina Miseq e evidenciar os seus efeitos com ou sem a adubação orgânica, na biomassa e na colonização micorrízica na gramínea ferrotolerante *Paspalum densum* (Poir.), em casa de vegetação e no campo. A técnica *on-farm* foi realizada em baldes de 18 L, que continham uma mistura de vermiculita, bagaço de cana e solo local nas proporções (1:1:1, v:v:v). O solo local foi proveniente de dois sítios: um nativo (NT) e outro de pós mineração, revegetado (RV), que foram mesclados ou não com esporos provenientes da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota. Assim, quatro tipos de inoculantes foram produzidos: 1) nativo do sítio de revegetação (RN), 2) nativo do sítio de vegetação nativa (NN), 3) nativo misto, instalado no sítio nativo (NM) e 4) revegetação misto, instalado no sítio de revegetação (RM), com quatro repetições para cada tratamento. O inoculante NN apresentou os maiores valores de diversidade, riqueza e equitabilidade em relação à RM e 4 OTUs exclusivas. Ascomycota foi o filo mais abundante em todos os inoculantes. Em casa de vegetação foram utilizados uma média 350 esporos destes inoculantes por vaso contendo 1,5 kg de rejeito de mineração de ferro, adubados ou não com 15g de cama de frango. Após cinco meses, observou-se interação entre estes fatores na biomassa seca da parte aérea e da raiz de *P. densum*, com os maiores valores para os tratamentos que receberam o inoculante NN com cama de frango. No experimento realizado em campo foram aplicados cerca de  $8.10^6 \text{ ha}^{-1}$  de esporos de FMA, com ou sem aplicação de  $40 \text{ t ha}^{-1}$  de cama de frango. Após seis meses apenas foi observado o efeito positivo da adubação na biomassa da parte aérea. Em ambos os experimentos, apenas a adubação com cama de

frango teve efeito sobre a colonização micorrízica. Conclui-se que o tipo de inoculante e tipo do subproduto da mineração de ferro tem efeito distinto sobre o crescimento de *P. densum*, e a adição de cama de frango, como matéria orgânica e fonte de nutrientes, favorece a produção de biomassa e a colonização micorrízica dessa gramínea.

**Palavras-chave:** adubação orgânica, micorriza arbuscular, subproduto de mineração

### **Introdução**

O processo de mineração de superfície, que inclui a mineração de ferro, envolve a remoção da vegetação e das camadas de solo em extensões variáveis e locais de armazenamento de grandes quantidades de estéril retiradas para acessar o minério, que possuem propriedades físicas e químicas heterogêneas (Dudka & Adriano, 1997; Bradshaw, 2000; Festin *et al.*, 2018). O rejeito ou tecnosolo é produzido por meio do beneficiamento do minério, que é purificado para separar o minério de valor econômico e abrange locais de armazenamento de subprodutos de refino aquoso (rejeitos) ou de alta temperatura (escórias) e águas residuárias desses processos (Dudka & Adriano, 1997; Santini & Gagen, 2018). O tecnosolo gerado após o beneficiamento do minério é constituído de rochas grossas e partículas granuladas, geralmente tratadas quimicamente (Festin *et al.*, 2018; Kumaresan *et al.*, 2017).

Além da desestruturação física, da baixa capacidade de retenção de água, baixo teor nutricional e de matéria orgânica, os subprodutos tanto da extração quanto do beneficiamento do ferro são precariamente colonizados por microrganismos e plantas e têm reduzida atividade microbiana (Sheoran *et al.*, 2010; Kumaresan *et al.*, 2017; Festin *et al.*, 2018; Carrenho *et al.*, 2018). A introdução de materiais orgânicos como esterco, lodo de esgoto e demais resíduos orgânicos é uma abordagem eficaz na restauração dos solos impactados pela mineração, uma vez que contribui para a imobilização de metais pesados, melhora as propriedades físico-químicas, e conseqüentemente da biodiversidade, que inclui o estabelecimento de comunidades microbiana e de vegetais (Mendez *et al.*, 2008; Ohsowski *et al.*, 2017; Festin *et al.*, 2018; Hamid *et al.*, 2019).

As plantas metalofitas ou tolerantes apresentam mecanismos biológicos para resistir, tolerar, ou desenvolver-se em solos metalíferos (Mendez *et al.*, 2008; Whiting *et al.*,

2004). Algumas dessas plantas evitam a absorção de metal na rizosfera ou translocação de metais nos tecidos da parte aérea, enquanto as hiperacumuladoras são especializadas em tolerar níveis extremamente altos de metais em tecidos da parte aérea e raízes, sem a produção de efeitos tóxicos (Mendez *et al.*, 2008; Santana *et al.*, 2014). A elevada diversidade e endemismo destes vegetais são encontrados em afloramentos naturais e também minas, fundições e outros resíduos industriais ricos em metais (Whiting *et al.*, 2004). A espécie *Paspalum densum* (Poir), é uma gramínea nativa da América do Sul e Central (Gomes, 1995) que exhibe características favoráveis de resistência ao ferro, com capacidade para revegetar ambientes impactados pela deposição de rejeito e estéréis de mineração de ferro (Rios *et al.*, 2017; Siqueira-Silva *et al.*, 2019). Entretanto, seu uso para revegetação em rejeito e pilha de estéril, combinado com adubação orgânica e inóculos microbianos nativos e não nativos ainda não foram explorados.

A inoculação com microrganismos é considerada benéfica e necessária para a restauração ecológica de ecossistemas terrestres perturbados e para conduzir o desenvolvimento da comunidade de plantas (Wang *et al.*, 2017). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) podem ser particularmente importantes para o estabelecimento bem-sucedido das comunidades de plantas nativas em locais de pós mineração, uma vez que a formação de micorrizas são detectadas em mais de 90 % das plantas superiores no ecossistema terrestre (Yan *et al.*, 2013; Eman, 2016; Wang *et al.*, 2017). A relação simbiótica entre FMAs e as raízes de plantas implica fortemente na aquisição de nutrientes para as mesmas a partir do solo, tolerância a estresse biótico e abiótico, interações com outros organismos, favorecendo principalmente a competitividade entre plantas (Jansa *et al.*, 2014; Asmelash *et al.*, 2016).

A técnica *on farm* consiste na multiplicação de FMAs e microrganismos associados, que visa a produção de inoculante micorrízico para aplicações no campo (Schlemper e Stürmer, 2014). Propágulos de FMAs como esporos, hifas, fragmentos de raízes de plantas colonizadas são adicionados diretamente ao substrato (Ijdo *et al.*, 2011; Schlemper e Stürmer, 2014). O método *on-farm* para a obtenção de propágulos de FMA pode ser conduzido em condições naturais ou mesmo controladas, com uma única espécie ou um consórcio de espécies de FMAs selecionados, e com uma grande variedade de

substratos (Gaur *et al.*, 2000; Douds *et al.*, 2005; Ijdo *et al.*, 2011). Devido ao baixo custo, o inoculante obtido pelo método *on-farm* pode ser realizado em potes ou vasos de mudas de tamanhos variados ou ainda, em caixas elevadas (Millner e Kitt, 1992; Douds *et al.*, 2005).

Neste contexto, a hipótese deste trabalho é de que os inóculos de FMAs e microrganismos associados obtidos pela técnica *on-farm* na Mina Retiro das Almas, em Minas Gerais, Brasil, aplicados em conjunto com a adubação orgânica aumentam a biomassa da gramínea *P. densum* em rejeito de mineração e em pilha de estéril. Desta forma, este estudo visa testar os efeitos dos inóculos obtidos pela técnica *on-farm* e da cama de frango na biomassa da gramínea ferrotolerante *P. densum*, bem como caracterizar a comunidade fúngica associada aos inoculantes.

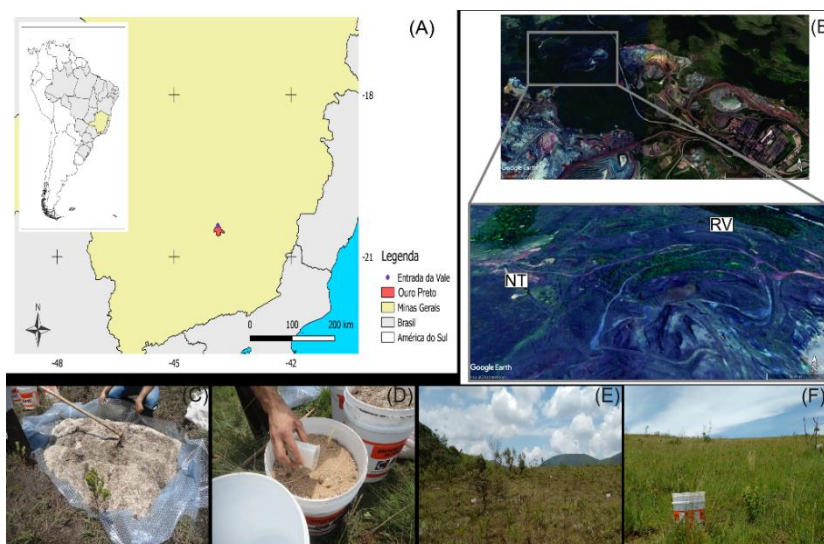
## **Metodologia**

### **Sítios de estudo e obtenção do inóculo**

Os inóculos de FMAs obtidos pela metodologia *on-farm* foram provenientes da mina Retiro das Almas, pertencente à Companhia Vale S. A., descomissionada há cerca de dez anos e que incluem sítios de mineração a céu aberto, pilha de estéril revegetada além do sítio de referência, com vegetação natural. Essa mina está situada ao sul da região do Quadrilátero Ferrífero, no município de Ouro Preto, estado de Minas Gerais, Brasil (Fig. 1, A). O clima da região é subtropical úmido de acordo com a classificação de Köpper (Alvares *et al.*, 2013). A média anual de chuvas é de 1.386 mm, com a estação chuvosa de outubro a março e a estação seca de abril a setembro. A média anual de temperatura é de 20,1 °C.

Dois sítios dentro da mina, distantes entre si 350 m foram utilizados para obtenção de inoculantes de FMA *in situ*, por meio da técnica *on-farm*: um sítio de pilha de estéril, onde ocorreu a extração de ferro e posteriormente foi revegetado (RV) (S 20°24'09,7" W 43°52'02,9"), e um sítio de referência, com vegetação nativa, não perturbado por mineração (NT) (S 20°24'17,1" W 43°54'15,8") (Fig. 1, B). Em RV, as plantas relatadas como abundantes foram *Andropogon bicornis* L., *A. chyrocline satureioides* (Lam.) DC e *Baccharis. reticularia* DC. Durante o processo de revegetação espécies como

*Brachiaria* sp., *Crotalaria* sp., *Stylosantes* sp., *Mimosa scabrella* Benth. e a gramínea exótica, não nativa *Melinis minutiflora* P. (Beauv.) foram introduzidas em RV. Em NT, as espécies de plantas mais abundantes relatadas foram: *A. satuireioides* (Lam.) DC, *B. reticularia* DC, *Paspalum guttatum* Trin. e *Echinolaena inflexa* (Poir.) Chase.



**Fig. 1.** Localização da Mina Retiro das Almas. A) Município de Ouro Preto, onde está situada a mina, (B) Sítios RV e NT, de onde foram originados os inóculos (C) Preparação da mistura para a obtenção do inoculantes a partir da técnica *on-farm* (D) Baldes contendo o inoculante misto no sítio. Baldes com inoculantes *on-farm* no sítio de pós-mineração em revegetação (E) e no sítio nativo (F)

### Obtenção dos inóculos

O preparo da técnica *on-farm* foi realizada nos sítios em junho de 2015, que corresponde à estação seca e os inoculantes foram coletados em dezembro de 2016. Para a produção do substrato, com a finalidade de obter os inoculantes de FMAs pela metodologia *on-farm* foram utilizados baldes de 18 L com orifícios, para permitir o fluxo de água e contato com o solo. Cada balde continha uma mistura de vermiculita, bagaço de cana e solo da área, nas proporções (1:1:1, v:v:v) (Fig. 1, C).

Dois tipos de inóculos *on-farm* para cada um dos dois sítios foram produzidos, totalizando quatro tratamentos: 1) nativo do sítio de revegetação (RN), 2) nativo do sítio

de vegetação nativa (NN), 3) nativo misto, instalado no sítio nativo (NM) e 4) revegetação misto, instalado no sítio de revegetação (RM), com quatro repetições para cada tratamento, totalizando 16 baldes. Os inóculos mistos foram constituídos de esporos das espécies: *Rhizophagus clarum* (10.250 esporos), *Glomus etunicatum* (13.000 esporos) e *Gigaspora albida* (300 esporos) obtidos da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG) (Fig.1, D), Universidade Regional de Blumenau, Departamento de Ciências Naturais, Blumenau - Santa Catarina, Brasil. Cada balde recebeu 20 sementes de sorgo (Fig 1, E e F), e após 11 meses foram retirados do campo. A contagem de esporos foi realizada para cada tratamento, permitindo estimar as quantidades de esporos utilizadas no experimento em casa de vegetação e campo.

### **Extração de DNA, sequenciamento de amplicons do gene ITS rRNA e análises de bioinformática da comunidade fúngica dos inoculantes obtidos pelo método *on-farm***

Após a coleta dos inoculantes obtidos pela técnica *on-farm*, dentro baldes, o DNA total foi extraído a partir de 0,5 g do substrato, com a utilização do Kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel Laboratories, Bethlehem, PA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

O sequenciamento de DNA total foi realizado no sequenciador Illumina MiSeq (2 x 250 bp), utilizando os primers da região ITS: ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3') e ITS2 (5'- GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3'). As sequências foram analisadas utilizando o *Quantitative Insights into Microbial Ecology* (QIIME, version 1.17) (Caporaso *et al.*, 2010), os algoritmos USEARCH (Edgar, 2010) e UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) e UPARSE (version 7.1) (<http://drive5.com/uparse/>) de acordo com a *pipeline* implementada pelo Brazilian Microbiome Project (BMP) (Pylro *et al.*, 2014). Arquivos FASTQ foram demultiplexados e filtrados por qualidade para obter uma pontuação média de qualidade mínima de 20 utilizando USEARCH (Edgar, 2010). Sequências quiméricas foram identificadas e retiradas utilizando UCHIME. Unidades taxonômicas operationais (OTUs) foram classificadas a 97 % de similaridade usando UPARSE (version 7.1) e para cada OTU, a taxonomia foi atribuída utilizando o banco de dados UNITE versão 8.0. O QIIME foi

utilizado para elaborar os gráficos de rarefação com as OTUs observadas de cada amostra, bem como os índices de diversidade (ACE, Shannon, Simpson, dominância e Chao 1).

### **Extração e quantificação de esporos de FMAs dos inóculos obtidos pela técnica *on-farm***

Após a obtenção do inoculante de FMA pelo método *on-farm* foram realizadas extrações de esporos a partir de 100 cm<sup>3</sup> do inoculante *on-farm*, de cada amostra, pela técnica de peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963). Posteriormente as amostras foram centrifugadas em água e, em seguida, em solução de sacarose 50 %. A quantificação dos esporos de FMA (abundância) foi realizada em placas de Petri canaletadas, sob estereomicroscópio.

### **Experimento 1: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de *P. densum* cultivada em rejeito de mineração**

Os inóculos obtidos pela técnica *on-farm* foram utilizados para conduzir um experimento fatorial (5x2) iniciado durante a estação chuvosa (janeiro de 2018) em casa de vegetação do Laboratório de Associações Micorrízicas, Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

O experimento consistiu de 4 tipos de inóculo (NN, NM, RN e RM) e o controle SI (sem inoculação), que foram adubados ou não com cama de frango, com 10 repetições em delineamento inteiramente casualizado. Cada vaso recebeu 1,5 Kg rejeito de mineração e os tratamentos com adição de adubo orgânico receberam 15 g de cama de frango. À esta mistura foram aplicados em cada vaso, uma média de 350 esporos dos inóculos: natural nativo (NN), natural misto (NM), revegetação nativo (RV), revegetação misto (RM) e o grupo controle, sem inoculante (SI). Cerca de 15 sementes de *P. densum* foram semeadas por vaso, as quais foram desbastadas para manter 5 plantas por vaso até a avaliação final do experimento. Os vasos foram irrigados diariamente e randomizados semanalmente. O experimento foi mantido por 5 meses em casa de vegetação com aplicações de 100 mL de solução nutritiva de Clarck, (1982), sem fósforo a cada dez dias.

Em cada tratamento, 5 repetições foram utilizadas para a quantificação da colonização micorrízica e 5 foram utilizadas para determinação das massas da: matéria fresca (MFPA) e seca (MSPA) da parte aérea e matéria fresca (MFR) e seca (MSR) da raiz. A MSPA e MSRA das plantas foram determinadas após secagem até massa constante a 70 °C em estufa com ventilação forçada por 72 h. Para a determinação da MSR, as raízes foram tratadas pela técnica DCB (ditionito-citrato-bicarbonato) (Taylor & Crowder, 1983), a fim de extrair óxidos de ferro na superfície do apoplasto radicular.

## **Experimento 2: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de *P. densum* cultivada em pilha de estéril, no campo**

O experimento foi conduzido no sítio de pós-mineração de ferro, sob pilha de estéril revegetada (20°24'15.70"S e 43°54'14.6"W), nas proximidades onde foram obtidos os inóculos do sítio RV. A vegetação superficial foi removida, com auxílio de enxadões para montagem do experimento, o qual foi iniciado durante a estação chuvosa (dezembro de 2017).

O delineamento foi realizado em 4 blocos casualizados, que totalizaram 40 m<sup>2</sup>. Cada bloco continha 10 parcelas de 1 m<sup>2</sup> (0,5 m x 0,5 m de parcela útil com bordas de 0,25 m de cada lado) e 10 linhas de plantio, distantes 0,10 m entre si. Os tratamentos consistiram no fatorial (5x2), com 10 repetições, nos quais foram utilizados quatro tipos de inóculo (NN, NM, RN e RM) e o controle sem inóculo, com 40 t ha<sup>-1</sup> ou sem aplicação da cama de frango. Os tratamentos foram sorteados dentro de cada bloco e para a aplicação da cama de frango, o substrato de cada parcela foi revolvido em aproximadamente 20 cm de profundidade. Em seguida, em cada parcela foram distribuídos uma média de 8.10<sup>6</sup> há<sup>-1</sup> esporos de FMA por parcela para cada um dos 4 tratamentos com inóculo obtidos pela técnica *on-farm*, exceto pelo tratamento controle, sem inóculo.

Sementes de *P. densum* na densidade de 40 kg ha<sup>-1</sup> foram semeadas nas 10 linhas de plantio em cada parcela. As parcelas deste experimento não foram irrigadas e dependeram somente da precipitação natural. Após 6 meses, considerando as 4 linhas de plantio central, as plantas foram coletadas com auxílio de um gabarito de madeira com dimensões

0,50 m x 0,50 m (0,25 m<sup>2</sup>), armazenadas em sacos plásticos e conduzidas para o laboratório, para determinação da MFPA e MSPA e avaliação da colonização micorrízica.

### **Quantificação da colonização micorrízica em *P. densum***

Para avaliar a colonização micorrízica, as raízes de *P. densum*, em ambos os experimentos foram lavadas em água corrente e armazenadas em FAA (formol: álcool: ácido acético 0,5:9:0,5). Para avaliação da colonização por FMA, as raízes foram diafanizadas com KOH (10 %), acidificadas com HCl (1 %) e coradas com azul de Tripiano em lactoglicerol (0,05 %) (Phillips & Hayman, 1970). Após a coloração, as raízes foram armazenadas em lactoglicerol (Brundrett *et al.*, 1996). Para estimar a porcentagem de colonização radicular por FMAs foi utilizado o método de intersecção dos quadrantes (Giovannetti & Mosse, 1980).

### **Características químicas do rejeito de mineração de ferro utilizado no experimento 1 e da pilha de estéril utilizada no experimento 2**

As propriedades químicas dos substratos de mineração (rejeito e pilha de estéril) foram analisadas no Laboratório de análise do solo, tecidos vegetais e fertilizantes, na Universidade Federal de Viçosa. Após a coleta de *P. densum* foram analisadas 5 amostras, que equivaleram aos 5 tratamentos provenientes da casa de vegetação e o total de 40 amostras, obtidas de todos os blocos oriundas do campo. O pH do solo foi medido com a suspensão aquosa de proporção 1:2,5 (v:v) solo: água. Al, Ca e Mg trocáveis foram extraídos com 1 mol L<sup>-1</sup> KCl (Defelipo & Ribeiro, 1997).

A capacidade de troca catiônica (T) foi realizada em pH 7,0. O extrator Mehlich-1 (0,025 mol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico e 0,05 mol L<sup>-1</sup> de ácido hidrolórico), com a relação solo:extrator 1:10 foi utilizado para extrair o P, Na, K, Fe Zn, Mn, Cu, Cd, Pb, Ni, e Cr trocáveis. O conteúdo de matéria orgânica foi determinado utilizando o método de Walkley and Black (1934), multiplicando-se o percentual de carbono orgânico do solo por um fator de 1,724, seguindo as proposições de que a matéria orgânica é composta de 58% de carbono. A determinação do nitrogênio foi realizada pelo método Kjeldhal (Yasuhara & Nokihara, 2001).

O fósforo remanescente foi determinado de acordo com Alvarez *et al.*, (2000). A porcentagem de matéria orgânica foi efetuada por multiplicação da porcentagem do carbono orgânico pelo fator 1,724, sob o princípio de que a matéria orgânica é composta de 58 % de carbono (Walkley & Black, 1934).

### **Análises estatísticas**

Para a contagem de esporos de FMAs obtidos pelo método *on-farm* e índices de diversidade foram realizadas análises de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A análise de coordenadas principais (PCoA) foi gerada para visualizar as diferenças entre as comunidades fúngicas dos inoculantes, com base nos dados obtidos pelo sequenciamento e calculadas a partir da matriz Bray-Curtis usando os pacotes: Vegan, phyloseq and ggplot2 no software R v.3.1.3 project (R Development Core Team., 2015). A análise de espécies indicadoras foi obtida para cada OTU fúngica identificada em nível de gênero em cada inóculo e foi realizada por meio do pacote Indicspecies do R (Cárceles *et al.*, 2010).

Os dados da biomassa de *P. densum* dos experimentos 1 e 2 e a colonização micorrízica para o experimento 1 foram transformados pelo cálculo da raiz quadrada. Para as análises das características químicas do experimento em campo e para os dados de biomassa de *P. densum* nos experimentos 1 e 2, a ANOVA foi utilizada a fim de testar os efeitos individuais de cada fator e a interação entre os fatores. Em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As médias do número de esporos, medidas de biomassa e colonização micorrízica foram calculados pelo pacote ExpDes.pt e Ggplot2 do R v.3.1.3 project (R Development Core Team. 2015).

## **Resultados**

### **Caracterização da comunidade fúngica dos inóculos**

Foram obtidas um total de 666.454 *reads* da região ITS no sequenciamento pela plataforma Illumina Miseq para as 16 amostras de inóculos de FMA, provenientes dos

substratos obtidos pela metodologia *on-farm*. Após a filtragem por qualidade, as sequências de quimeras e *singletons* foram removidas e resultaram em 245.453 *reads*, das quais 4.945 foram agrupadas em OTUs. As sequências variaram de 8.450 a 23.856, as quais foram normalizadas para 8.450 sequências para as análises subsequentes. O número de OTUs e medidas dos estimadores de diversidade em cada inóculo foram sumarizadas (Tabela.1).

A curva de rarefação dos inóculos evidenciou uma tendência ao platô de saturação para o número de sequências em todas as amostras (Material suplementar, Fig 1). As médias das OTUs observadas foram iguais para todos os inóculos ( $p = 0,067$ ). Dentre os estimadores de diversidade, ACE foi igual em todas as amostras ( $p = 0,043$ ). Dominância foi maior em RM e os índices de Chao1, Shannon e Simpson foram maiores em NN.

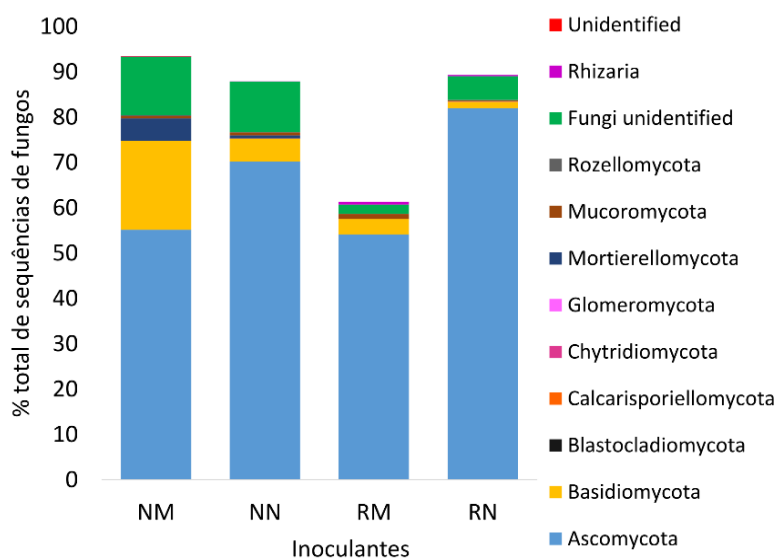
**Tabela 1.** Número de OTUs presentes em cada tipo de inoculante de FMA obtido pela técnica *on-farm*, a partir do sequenciamento Illumina MiSeq, e índices de diversidade para a comunidade fúngica associada. Médias apresentados na mesma linha, pela mesma letra não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey

<b>Amostras</b>	<b>NM</b>		<b>NN</b>		<b>RM</b>		<b>RN</b>	
OTUs observadas	309a	± 116,4	346a	± 95,4	192,75a	± 61,2	220,5 a	±22,9
Índices de diversidade	<b>NM</b>		<b>NN</b>		<b>RM</b>		<b>RN</b>	
ACE	490,6a	± 160,3	521,01a	± 92,9	304,8a	± 103,7	352,4a	± 48,5
Chao1	470,5ab	± 162	522,4a	± 84,57	299,5b	± 95,4	334,7ab	± 42,6
Dominância	0,132ab	± 0,132	0,123b	± 0,123	0,314 a	± 0,314	0,201ab	± 0,201
Shannon	4,446ab	± 0,891	4,853a	± 0,625	3,926ab	± 0,914	3,161b	± 0,327
Simpson	0,867ab	± 0,052	0,876a	± 0,055	0,685b	± 0,156	0,798ab	± 0,042

Inóculos: natural nativo (NN), natural misto (NT), revegetação nativo (RN) e revegetação misto (RM)

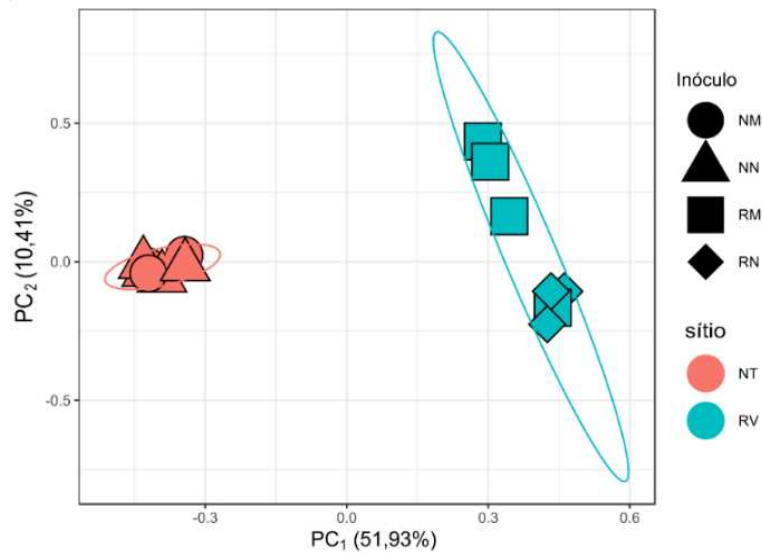
Do total de sequências, os filos mais representativos em todos os inoculantes de FMA obtidos pelo método *on-farm* foram Ascomycota com: 82,01 % em RN, 54,13 % em RM, 70,21 % em NN, 51,15 % em NM. Basidiomycota foi o segundo filo mais abundante em todos os inóculos com 19,65 % em NM, 5,09 % em NN, 3,37 % em RM e 1, 39 % em RN. Os fungos do filo Glomeromycota, o qual pertencem os FMAs foram detectados

somente em NM e representaram 0,003 %. Filos pertencentes ao reino Fungi, totalizaram 80,40 % em NM; 76,71 % em NN; 58,72 % em RM e 83,81 % em RN (Fig. 2). O filo Rhizaria, grupo de protistas também foi detectado em todos os inóculos, totalizando 0,93 %.



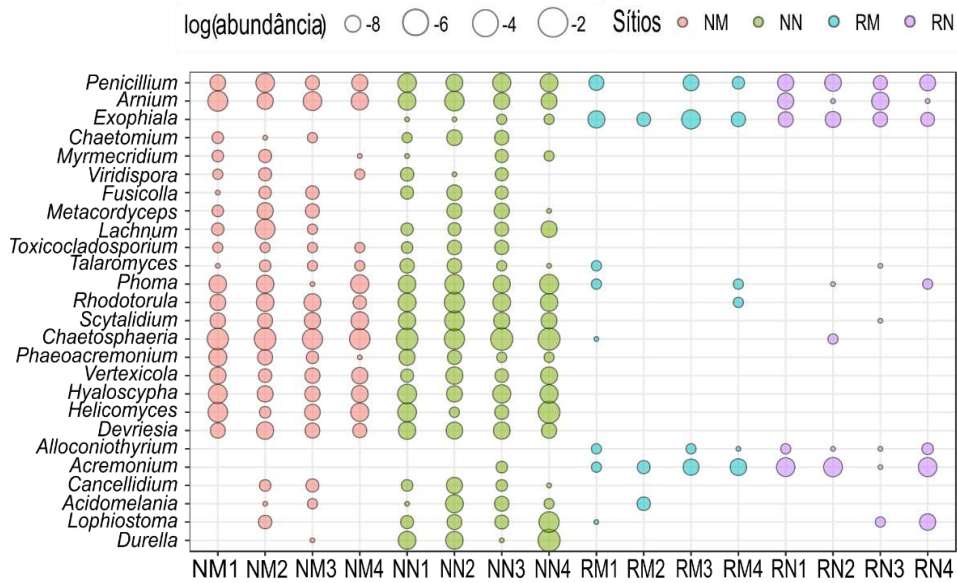
**Figura 2.** Abundância relativa em nível de filo nos inóculos obtidos pela técnica *on-farm* por meio do sequenciamento da região ITS na plataforma Illumina Miseq. Inóculos: NM = natural misto, NN = natural nativo, RM = revegetação misto e RN = revegetação nativo

A PCoA distinguiu a comunidade fúngica entre os sítios de origem (RV e NT), dos inoculantes de FMA obtidos pelo método *on-farm*. A estrutura da comunidade fúngica dos inóculos obtidos do sítio NT (NM e NN) concentraram-se em um só eixo e foram menos dissimilares entre si do que os inóculos do sítio RV (RN e RM), os inóculos NN e NM compartilharam mais OTUs entre si (Fig. 3).



**Figura 3.** Análise de coordenadas principais (PCoA) baseadas no sequenciamento da região ITS para a comunidade fúngica associada aos inóculos de FMA obtidos pela técnica *on-farm*: NM = natural misto; NN = natural nativo; RM = revegetação misto e RN = revegetação nativo

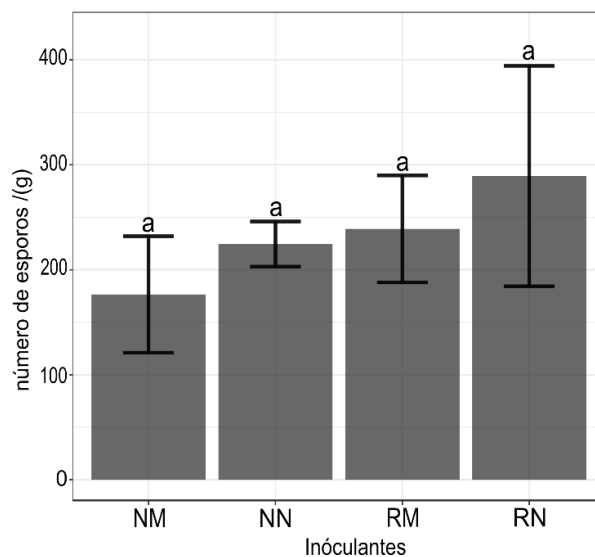
Um total de 26 OTUs em nível de gênero foram detectadas como OTUs indicadoras para os inóculos NM, NN, RM e RN (Fig. 4). Quatro OTUs foram associadas exclusivamente ao inoculante NN, como *Durella*, *Lophiostoma*, *Acidomelania* e *Cancellidium*. Os inoculantes RM e RN compartilharam duas OTUs indicadoras, *Acremonium* e *Alloconiothyrium*, enquanto NM e NN compartilharam a um total de 17 OTUs. *Exophiala* foi associada aos inoculantes NN, RM e RN, enquanto *Arnium* e *Penicillium* foram associados aos inóculos NM, NN e RN.



**Figura 4.** OTUs de fungos evidenciadas pela análise de espécies indicadoras com as respectivas abundâncias relativas nos inóculos de FMAs, obtidos pelo método *on-farm*. NM = inóculo natural misto, NN = inóculo natural nativo; RM = revegetação misto e RN = revegetação nativo

#### Quantidade de esporos de FMAs dos inoculantes

As médias de esporos de FMAs nos inoculantes não diferiram ( $p$ -valor = 0,166), e as médias variaram de 176 a 289 (Fig. 5).



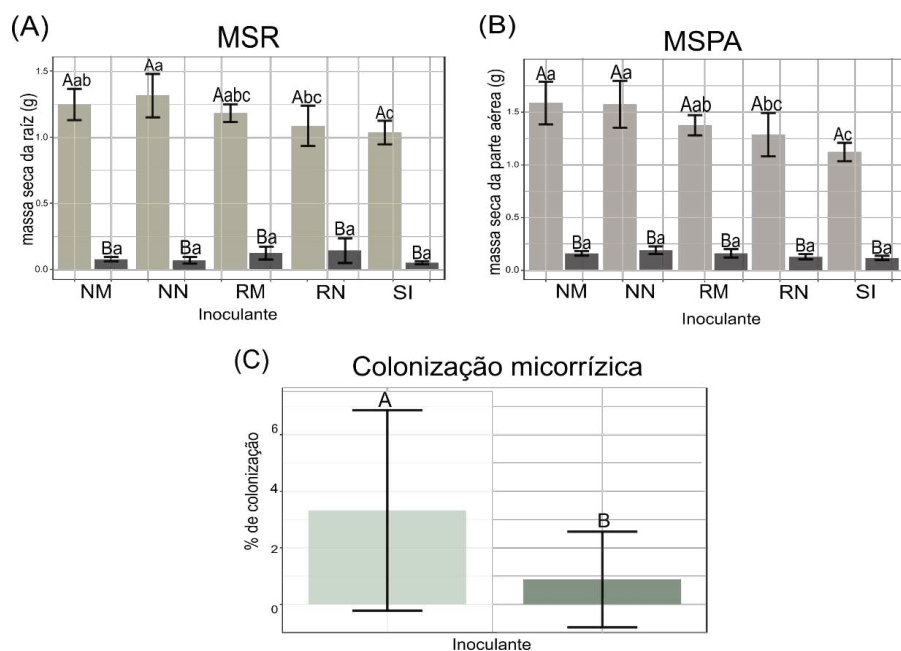
**Figura 5.** Média de esporos de FMA dos inóculos: NM = natural misto; NN = natural nativo; RM = revegetação misto e RN = revegetação nativo obtidos pela técnica *on-farm*. Os gráficos representados pela mesma letra não diferem significativamente a 5 % pelo teste de Tukey. Barra = desvio padrão da média

### **Experimento 1: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de *P. densum* cultivada em rejeito de mineração**

Houve interações entre inoculante e adubação orgânica para MSPA (p-valor = 0,003) e para MSR (p-valor = 0,004). Para a porcentagem de colonização micorrízica houve somente o efeito da cama de frango (p-valor = 0,001).

A adubação com cama de frango aumentou a MSPA e MSR (Fig. 6A e B). A maior MSR foi observada quando aplicado o inoculante NN (média = 1,318 g) (Fig. 6A), enquanto a maior MSPA foi observada quando aplicados os inoculantes NN (média = 1,586 g) NM (média = 1,569 g) (Fig. 6B).

Não houve interação entre os fatores inoculante e adubação com cama de frango sobre a colonização micorrízica. O aumento da colonização foi evidenciado nos tratamentos com adubação com cama de frango (média = 1,47 %). Desta forma, qualquer dos inoculantes combinado com cama de frango resultou em uma maior colonização por FMAs na raiz de *P. densum* (Fig. 6C).



**Figura 6.** Biomassa e colonização micorrízica no experimento com *P. densum* na casa de vegetação, com inoculantes micorrízicos obtidos pela técnica *on-farm*: natural nativo (NN), natural mix (NM), revegetação nativo (RN) e revegetação mix (RM). Massa seca da parte aérea MSPA (A), massa seca da raiz, MSR (B) e colonização micorrízica (C). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas referem-se às médias entre adubação com e sem cama de frango e as letras minúsculas referem-se às médias entre os inoculantes. As barras claras correspondem aos tratamentos com cama de frango e as barras escuras indicam os tratamentos sem cama de frango

A aplicação da cama de frango no rejeito, em casa de vegetação demonstrou aumento principalmente nos teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (Tabela 2).

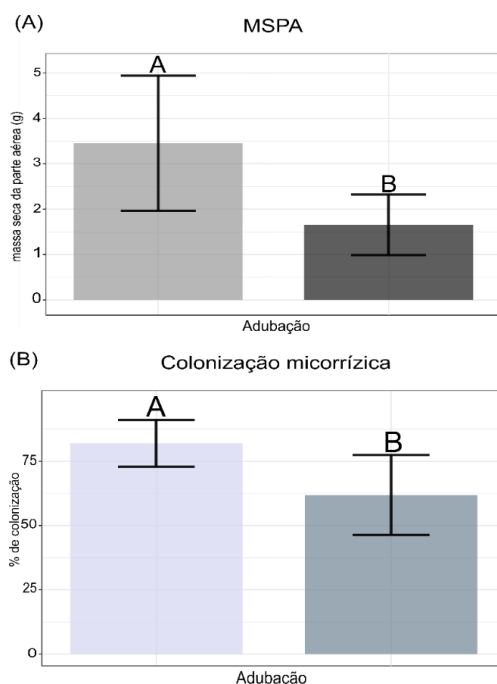
**Tabela 2.** Características químicas do rejeito de mineração de ferro utilizado em casa de vegetação, no experimento 1

Inóculo	NM	NM	NN	NN	RM	RM	RN	RN	SI	SI
	com CF	sem CF	com CF	sem CF	com CF	sem CF	com CF	sem CF	com CF	sem CF
pH	7,46	7,7	7,6	7,45	7,69	7,66	7,58	7,6	7,57	7,73
P (mg/dm <sup>3</sup> )	74	12,4	88,4	13,9	89,1	12,6	83,8	15,3	90,7	13,2
P-Rem (mg/L)	27,3	23,6	28,8	23,4	28,6	23,8	30,2	24,5	23,3	23,2
K (mg/dm <sup>3</sup> )	62	80	74	81	94	85	77	74	71	36
N (dag/kg)	0,024	0,018	0,021	0,012	0,018	0,006	0,018	0,007	0,023	0,005
MO (dag/kg)	0,39	0,13	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,13	0,13	0,13
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	175,9	112,6	147,9	178,6	126	204,1	207,7	160,2	114,9	159,1
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	35,8	39	35	59,3	29,6	71,7	35,6	50,5	38	50,8
SB (cmolc/dm <sup>3</sup> )	2,98	3,07	3,39	2,81	3,61	2,45	3,26	2,53	2,45	2,04
T (cmolc/dm <sup>3</sup> )	4,58	3,07	3,39	2,81	3,61	2,45	3,26	2,53	2,45	2,04
Pb (mg/dm <sup>3</sup> )	0,68	0,82	0,91	0,71	0,82	0,29	0,95	0,62	0,84	0,59
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	5,42	2,65	6,85	1,64	5,72	1,17	6,18	2,05	6,04	1,62
Cd (mg/dm <sup>3</sup> )	0,08	0,11	0,12	0,08	0,08	0,09	0,13	0,04	0,08	0,09
Cr (mg/dm <sup>3</sup> )	0	0,23	0	0	0,08	0,02	0,07	0	0	0
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	0,73	0,68	0,63	0,88	0,58	0,46	0,71	0,44	0,42	0,41
Ni (mg/dm <sup>3</sup> )	0,43	0,76	0,63	0,47	0,58	0,43	0,44	0,51	0,47	0,4

Inóculos: NM = natural mix, NN = natural nativo, RM = revegetação mix e RN = revegetação nativo. SI = sem inóculo, CF= cama de frango

### **Experimento 2: Efeito da inoculação e da adubação orgânica na biomassa e colonização micorrízica de *P. densum* cultivada em pilha de estéril, no campo**

A MSPA não mostrou interação entre os fatores inoculante e adubação (p-valor = 0,225), também não foram observados efeito do inoculante (p-valor = 0,624) e do bloco (p-valor = 0,670). Contudo, houve apenas influência da adubação com cama de frango na MSPA (p-valor = 0,000) (Fig. 7A). A porcentagem de colonização micorrízica também demonstrou exclusivamente efeito da adubação com cama de frango (p-valor = 0,000), com média de 82 % (Fig. 7B).



**Figura 7.** Biomassa e colonização micorrízica de *Paspalum densum* crescendo sobre pilha de estéril, no campo. (A) Massa seca da parte aérea (MSPA) e (B) colonização micorrízica. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Letras maiúsculas referem-se as médias entre adubação com e sem cama de frango. As barras claras correspondem aos tratamentos com cama de frango e as barras escuras indicam os tratamentos sem cama de frango

As análises químicas dos tratamentos na pilha de estéril em campo evidenciaram que a maioria das características químicas como fósforo remanescente (P-rem), K, N, matéria orgânica (MO), pH, soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica total (T), zinco (Zn) e cromo (Cr) sofreram efeitos da adubação com cama de frango, o que resultou em maiores médias (Tabela 4). Contudo, apesar do efeito da adubação com cama de frango no ferro (Fe), o tratamento sem cama de frango exibiu maior média. O manganês (Mn), o cádmio (Cd), cobre (Cu) e níquel (Ni) não sofreram efeito nem do inóculo, nem da cama de frango.

**Tabela 3.** P-valores das características químicas da pilha de estéril de mineração de ferro no experimento 2 calculados a partir da ANOVA

Características químicas	Interação Inóculo adubação		
	Inóculo	Adubação	
	p-valor	p-valor	p-valor
pH	0,90449	0,0000*	0,9107
P (mg/dm <sup>3</sup> )	0,54384	0,00001*	0,7815
P-rem (mg/L)	0,55568	0,0045*	0,8421
K (mg/dm <sup>3</sup> )	0,070043	0,0000*	0,1012
N (dag/kg)	0,16099	0,0000*	0,7090
MO (dag/kg)	0,69909	0,0076*	0,8106
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	0,70619	0,5986*	0,3419
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	0,0679*	0,0000*	0,2095
SB (cmolc/dm <sup>3</sup> )	0,1693	0,0000*	0,3949
T (cmolc/dm <sup>3</sup> )	0,22738	0,0000*	0,3515
Pb (mg/dm <sup>3</sup> )	0,16178	0,52075	0,4402
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	0,57041	0,0000*	0,3531
Cd (mg/dm <sup>3</sup> )	0,81516	0,3269	0,9085
Cr (mg/dm <sup>3</sup> )	0,46616	0,0199*	0,5884
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	0,87246	0,6092	0,8616
Ni (mg/dm <sup>3</sup> )	0,6519	0,3684	0,9215

\* Significativo a  $p < 0,05$

**Tabela 4.** Médias das características químicas da pilha de estéril adubada ou não com cama de frango do experimento 2. Médias apresentadas na mesma linha, pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Características químicas	Adubação	
	com CF	sem CF
pH	6,9895a	6,123b
P (mg/dm <sup>3</sup> )	337,29a	14,01b
P-rem (mg/L)	54,745a	5 0,45 b
K (mg/dm <sup>3</sup> )	18,75a	11,5a
N (dag/kg)	0,054a	0,221b
MO (dag/kg)	0,933a	0,399b
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	10,287b	14,2667a
SB (cmolc/dm <sup>3</sup> )	2,786a	0,961b
T (cmolc/dm <sup>3</sup> )	3,511b	2,061b
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	13,551a	1, 8275b
Cr (mg/dm <sup>3</sup> )	0,378a	0,321b

CF=cama de frango

## Discussão

Os maiores estimadores ecológicos no inoculante NN confirmaram os mesmos padrões de diversidade, riqueza sobretudo em termos de OTUs raras para a comunidade de fungos, observados no solo do sítio de vegetação nativa, que originou este inoculante (Tabela 1, capítulo 2), o que é esperado, já que este solo foi utilizado na composição de NN. Em contraste com NN, a elevada dominância no inoculante misto RM, no qual foram introduzidas espécies de FMAs reflete um padrão de dominância semelhante ao solo do sítio de pós mineração, revegetado, o qual compôs este inoculante (Tabela 1, capítulo 2). Uma vez que o solo é um ambiente estruturalmente heterogêneo, com sítios que oferecem diferentes condições de crescimento, a diversidade de espécies pode ser mantida se um local for apto para sustentar números semelhantes de indivíduos para cada uma das espécies presentes na comunidade, se houver impossibilidade, então o tipo melhor adaptado ao nicho mais produtivo se tornará dominante (Dejonghe *et al.*, 2001), como observado no inóculo RM.

O filo Ascomycota revelado pelo sequenciamento dos inoculantes foi predominante em relação aos demais filos, assim como observado por outros autores (Tedersoo *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2018; Rosenfeld *et al.*, 2018). Embora o método *on-farm* vise a multiplicação de propágulos de FMAs, a presença de outros grupos de fungos foi previsível, devido a própria composição dos substratos no *on-farm* e a condição *in situ*, na qual o método é empregado. Assim, o sequenciamento da região ITS evidenciou a abundância e diversidade da comunidade fúngica nos inoculantes, apesar da baixa detecção do filo Glomeromycota, o qual pertence os FMAs. De fato, os *primers* da região ITS são utilizados para o estudo da estrutura da comunidade fúngica e para a resolução de muitas espécies conhecidas de FMAs, porém apresentam algumas limitações para o grupo Glomeromycota como hiper-variabilidade dentro de sequências, contribuindo para a baixa resolução de espécies próximas, além da baixa recuperação de sequências de Glomeromycota nos bancos de dados (Van Geel *et al.*, 2014; Hart *et al.*, 2015; Schlaeppli *et al.*, 2016). No entanto, para estudo deste filo, o operon ribossômico, que inclui as regiões ITS, SSU e LSU oferece maior resolução quando utilizado como um todo (Lindahl *et al.*, 2013; Hart *et al.*, 2015; Schlaeppli *et al.*, 2016). Como a caracterização

dos inoculantes de FMAs obtidos pela metodologia *on-farm* por meio do sequenciamento não são restritos aos FMAs, grupos de fungos associados a estes inoculantes são relevantes e promissores para o crescimento e estabelecimento vegetal, e podem ser selecionados para potencializar os seus benefícios máximos nas plantas na revegetação de áreas pós-mineração junto aos FMAs.

De forma geral, inoculantes provenientes do sítio NT (NN e NM) foram dissimilares dos inoculantes originários do sítio RV (RN e RM) (Fig. 3). No entanto, foi observada maior similaridade entre NM e NN, a qual foi reforçada pela análise de OTUs indicadoras, que evidenciou o maior número de OTUs compartilhadas, mesmo com a introdução de espécies de FMAs em NM. Adicionalmente, as OTUs encontradas nos inoculantes NN e NM, foram mais diversas em composição fúngica que os inoculantes RM e RN. A maioria das OTUs compartilhadas entre os inoculantes e também os componentes de NN como *Lophiostoma*, *Acidomelania*, *Cancellidium* são caracterizadas como saprofíticas (Walsh *et al.*, 2014; Hirayama & Tanaka, 2011), outras OTUS como *Acremonium* são relatadas como endófitos de gramíneas (Breen, 1994), *Phaeoacremonium* tem sido relatado como patógenos de uma ampla gama de plantas lenhosas (Gramaje *et al.*, 2015), o que revela um estilo de vida amplo para as OTUs observadas nos inoculantes.

O gênero *Acidomelania* encontrado unicamente em NN é relacionado com espécies de endófitos escuros septados – *dark septate species* (DSE), um grupo de ascomicetos colonizadores de raízes, de hifas melanizadas e septadas (Walsh *et al.*, 2014), que formam associações mutualísticas funcionalmente similares às micorrizas (Jumpponen, 2001). A espécie *Acidomelania panicicola* foi reportada em associação com raízes da gramínea *Panicum virgatum* em ambientes ácidos e oligotróficos, localizados em uma área florestal denominada barragem de Pinho em Nova Jersey, EUA (Walsh *et al.*, 2014). Embora este registro tenha sido realizado em um ambiente distinto do sítio NT, de onde foi obtido o inoculante NN, a acidez e baixa disponibilidade de nutrientes do solo foram fatores ambientais em comum para o relato de *Acidomelania* neste estudo.

Os inoculantes provenientes da técnica *on-farm*, no sítio RV apresentaram esporos em quantidades comparáveis aos inoculantes provenientes do sítio de referência NT, até mesmo nos inoculantes mistos, onde espécies de FMAs foram adicionadas (Fig. 5). Essa

distribuição equitativa de esporos pode estar relacionada tanto a multiplicação de esporos, intrínseca a própria técnica *on-farm*, quanto ao estágio de recuperação do sítio RV e época do ano em que o *on-farm* foi recolhido. As áreas severamente erodidas ou perturbadas, principalmente pela mineração podem ter fonte insuficientes de propágulos de FMAs (Asmelash *et al.*, 2016; Eman, 2016; Janoušková *et al.*, 2017) e a inoculação introduz genótipos de FMAs alóctones, ocasionalmente, provenientes de diferentes ecossistemas ou regiões geográficas (Janoušková *et al.*, 2017). Assim a fonte, a diversidade e o táxon específico do inóculo, além das condições ambientais provavelmente afeta os resultados da inoculação na restauração (Eman, 2016; Hoeksema *et al.*, 2010). A compatibilidade ecológica entre FMAs, plantas e condições ambientais em áreas de mineração têm mostrado o aumento da biomassa e melhor desenvolvimento de plantas em áreas degradadas pela mineração (Guo *et al.*, 2013), principalmente quando se trata de inóculos nativos, mais adaptados às condições edafoclimáticas (Schwartz *et al.*, 2006; Eman, 2016; Torres-Arias *et al.*, 2017).

A resposta à inoculação e cama de frango, analisados no aumento da biomassa de *P. densum* mostrou diferenças nos experimentos 1 e 2 e evidenciou que a introdução do composto orgânico tanto no rejeito de mineração, em casa de vegetação, quanto na pilha de estéril, no campo é indicada para o crescimento e estabelecimento desta planta. A introdução de compostos orgânicos como biochar associado com FMAs (Ohsowski *et al.*, 2018; Zago *et al.*, 2019), turfas e inóculos de FMAs (Rapai *et al.*, 2016), composto e FMAs (Wu *et al.*, 2010) em rejeitos de mineração têm alcançado resultados positivos para o crescimento e restabelecimento da comunidade vegetal.

As características químicas dos experimentos 1 e 2 demonstraram que a adubação orgânica proporcionou condições nutricionais mais adequadas para o crescimento de *P. densum*, incluindo maior disponibilidade dos macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), comparado aos tratamentos sem adubo orgânico ou adubado e sem inoculante. Dentre os fertilizantes orgânicos, a cama de frango fornece quantidades consideráveis de todos os nutrientes importantes para a planta, com aumento significativos do N, P, K, cálcio (Ca) e magnésio (Mg), conduz um aumento de bases trocáveis no solo, que resulta no aumento do pH e a absorção de nutrientes nas plantas

em solos degradados (Abbasi *et al.*, 2010), capacidade de retenção de água e modificação da biodisponibilidade de metais pesados (Alvarenga *et al.*, 2009, Zago *et al.*, 2019). Adicionalmente, a aplicação de fertilizantes orgânicos melhora também as propriedades biológicas do solo estimulando a atividade microbiana (Kneller *et al.*, 2018), facilita e aumenta a revegetação em solos pobres e contaminados com metais/metaloídes (Zago *et al.*, 2019).

As características químicas do rejeito sem inoculante e sem adubação orgânica refletem a limitação de nutrientes, além de ser sugerido que este substrato seja pobre em propágulos micorrízicos. A sinergia entre a cama de frango, fonte de nutrientes, e os inoculantes, fonte de propágulos micorrízicos, contribuíram para a biomassa seca da parte aérea e da raiz de *P. densum*, além de exibirem os maiores valores para o tratamento contendo inoculante NN com adição da cama de frango. Até mesmo o tratamento SI com cama de frango exibiu elevado conteúdo de nutrientes, principalmente de P, o que demonstra o efeito considerável da adubação orgânica. No experimento 2, a MSPA de *P. densum* dependeu apenas o efeito da adubação orgânica, que evidenciou maior disponibilidade de nutrientes nos tratamentos com a adição da cama de frango. Resultados similares ao experimento 1 foram obtidos na biomassa da parte aérea da gramínea *Chrysopogon zizanioides* L. Nash, cultivada em rejeito de mineração de Pb/Zn não esterilizado com adição de substrato de compostagem e inóculo de FMA (Wu *et al.*, 2010). A introdução de FMAs na mistura de rejeito de mineração de ferro e 2 Kg de composto orgânico, proveniente da compostagem de alimentos, também contribuiu para o aumento da biomassa seca da parte aérea e raiz de gramíneas deste mesmo gênero, embora não tenha sido evidenciada a interação entre doses de composto e a aplicação de micorrizas (Zago *et al.*, 2019).

O efeito apenas da cama de frango sobre a biomassa de *P. densum* no experimento 2, em campo, contrastou com um experimento similar. Na pilha de estéril, em uma área de mineração de ouro, a turfa, utilizada como fonte de matéria orgânica não mostrou efeito significativo na biomassa de plantas de sub-bosque quando aplicada sozinha ou em combinação com os tipos de inóculos de FMAs (Rapai *et al.*, 2016). Este resultado demonstra o papel central da cama de frango e da pilha de estéril como substrato sobre a

biomassa de *P. densum*, além de sugerir que os inoculantes aplicados podem não ter sido suficientes e viáveis para o crescimento da parte aérea desta planta.

Curiosamente, o efeito sobre a colonização micorrízica apenas com a aplicação da cama de frango, em casa de vegetação e no campo pode ser atribuído às características químicas de ambos os substratos provenientes da mineração. Assim, os tratamentos sem inoculante e, principalmente, sem cama de frango evidenciaram menores quantidades de nutrientes nas análises químicas em ambos os experimentos apesar dos substratos serem diferentes. Em contrapartida, uma vez que nutrientes como P e N estejam facilmente acessíveis, as plantas não investem em carbono para os fungos micorrízicos arbusculares, o que pode reduzir a colonização por estes fungos (Jansa *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2011; Kokkoris *et al.*, 2019). Esta pode ser a razão para os resultados relativos a baixa porcentagem de colonização micorrízica no sobretudo no experimento 1, mesmo com adição da cama de frango como fonte de nutrientes essenciais para a planta, no substrato contendo rejeito de mineração.

Na pilha de estéril, no experimento 2 a porcentagem de colonização superior ao experimento 1, sugere que as condições de campo foram influentes na colonização micorrízica, assim como o tempo de cultivo (6 meses no campo e 5 meses em casa de vegetação), que podem ter favorecido a colonização micorrízica. Outros efeitos também relacionados à colonização micorrízica que não foram alvo do nosso estudo e podem ter influenciado neste resultado são a taxonomia e abundância inicial das espécies de FMAs no campo (Eman, 2016; Hoeksema *et al.*, 2010; Köhl *et al.*, 2016), além da compatibilidade dos inóculos introduzidos com o solo e com a planta (Eman, 2016).

É necessário considerar que ambos os substratos não foram esterilizados e que, na pilha de estéril, em campo, pode haver mais propágulos viáveis que o rejeito, utilizado em casa de vegetação. A elevada colonização observada pode ser proveniente da comunidade de FMAs nativa e estabelecida no campo, uma vez que não foi evidenciado efeito dos inoculantes. Para um inoculante fúngico se estabelecer, é necessário além da compatibilidade com o solo em particular, superar a comunidade nativa, já bem estabelecida no campo e que pode ser competitivamente superior, o que caracteriza o efeito prioritário (Köhl *et al.*, 2016; Verbruggen *et al.*, 2012; Dickie *et al.*, 2012).

Adicionalmente, a capacidade de suporte das populações que o habitat pode sustentar também deve ser levada em conta (Verbruggen *et al.*, 2012; Köhl *et al.*, 2016).

Embora a inoculação de FMAs seja relevante em ambientes de mineração, a introdução da cama de frango potencializou os resultados para a biomassa de *P. densum* cultivada em rejeito de mineração, principalmente junto a NN, que consistiu no melhor inoculante, enquanto no campo, a adubação com cama de frango elevou a biomassa de *P. densum* cultivada na pilha de estéril. Adicionalmente a adubação orgânica foi pertinente para a colonização micorrízica nas duas condições experimentais. Diante desses resultados, é necessário considerar principalmente a contribuição nutricional presente na cama de frango introduzida na casa de vegetação e no campo, que pode ter amplificado a atuação da microbiota presente nos inóculos, principalmente no inoculante NN, que exibiu a melhor resposta para o crescimento de *P. densum* no rejeito, em casa de vegetação. Tendo em vista os efeitos positivos da introdução da cama de frango em ambos os experimentos, o seu uso é indicado para fins de revegetação em ambientes de pós-mineração. Quanto à inoculação com FMA, o seu efeito em função do tempo, principalmente em condições de campo requer mais estudos.

## Referências

Abbasi, M. K.; Khaliq, A.; Kazmi, M.S.M.; Ali, I. (2010) Comparative effectiveness of urea n, poultry manure and their combination in changing soil properties and maize productivity under rainfed conditions in northeast Pakistan. *Expl Agric.* 46: 211–230.

Alvarenga, P.; Gonçalves, A.P.; Fernandes, R.M.; de Varennes, A.; Vallini, G.; Duarte, E.; Cunha-Queda, A.C. (2009) Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (I) Effects on soil chemical characteristics. *Chemosphere* 74: 1292–1300.

Alvares CA, Stape J.L.; Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.L.M.; Sparovek, G. (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 22: 711–728.

Alvarez V., V.H., Novais, R.F., Dias, L.E. and Oliveira, J.A. (2000) Determinação e uso do fósforo remanescente. *B. Inf. SBCS*, 25:27-32.

Asmelash, F., Bekele, T., & Birhane, E. (2016) The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in the restoration of degraded lands. In *Front. Microbiol.* 7: pp. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01095>.

Bradshaw, A. (2000) The use of natural processes in reclamation: advantages and difficulties. *Landsc. Urban. Plan.* 51: 89-100.

Breen, J.P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects (1994) *Annu. Rev. Entomol.* 1994. 39:401-23.

Brundrett, M.; Bougher, N.; Dell, B.; Grove, T.; Malajczuk, N. (1996) Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *ACIAR Monograph*, 374p.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, et al. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 7:335-336.

Carrenho, R.; Alves, L. de J.; Santos, I de S. (2018) Arbuscular mycorrhizal fungi, interactions with heavy metals and rehabilitation of abandoned mine lands. In: In: Prasad, M.N.V.; Favas, P.J.C.; Maiti, S.K. (eds) *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. Elsevier. pp. 271-272.

Clark, R.B. (1982) Nutrient Solution Growth of Sorghum and Corn in Mineral Nutrition Studies. *J Plant Nutr.* 5: 1039-1057. <https://doi.org/10.1080/01904168209363037>.

De Cáceres M, Legendre P, Moretti M (2010) Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos* 119:1674–1684.

Defelipo, BV & Ribeiro, AC (1997) *Análise química do solo (metodologia)*, 2. ed. Viçosa, MG: UFV, Boletim de extensão 29.

Dejonghe, W.; Bonn, N.; Seghers, D.; Top, E.M.; Verstraete, W. (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ. Microbiol.* 3: 649-657.

Defelipo, B. V. & Ribeiro, A. C. (1997) *Análise química do solo (metodologia)*, 2. ed. Viçosa, MG: UFV, Boletim de extensão 29.

Direito I.C.N. & Teixeira, K.R.S. (2002) Simulação e comportamento de migração de produtos da amplificação parcial do gene *nifH* quando submetidos ao DGGE. Revista Universidade Rural, Série Ciências da vida 22: 123–129.

Dickie, I.A.; Fukami, T.; Wilkie, J.P.; Allen, R.B.; Buchanan, P.K. (2012) Do assembly history effects attenuate from species to ecosystem properties? A field test with wood-inhabiting fungi. Ecol. Lett. 15: 133–141.

dos Santos Pinheiro, G.M. (2018) Ferruginous Geosystems and the Current Situation of Iron in Brazil: Economic Growth or Environmental Regression? In: Acevedo, R.; Frías, J. (eds) Geoethics In Latin America. The Latin American Studies Book Series. Springer, Cham.

Douds, D. D.; Nagashi, G.; Pfeffer, P.E.; Kayser, W.M.; Reider, C. On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum (2005) Can. J. Plant. Sci. 85: 15-21.

Dudka, S. and Adriano, D.C (1997) Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review. J. Environ. Qual. 26:590—602.

Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26: 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.

Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight, R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27: 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.

Eman, T. Local soil, but not commercial AMF inoculum, increases native and non-native grass growth at a mine restoration site (2016) Restor. Ecol. 24:35–44.

Festin, E. S.; Tigabu, M.; Chileshe, M. N.; Syampungani, S.; Odén, P. C. (2018) Progresses in restoration of post-mining landscape in Africa J. For. Res. doi:10.1007/s11676-018-0621-x.

Gaur, A.; A. Adholeya and K.G. Mukerji. (2000) On-farm production of VAM inoculum and vegetable crops in marginal soil amended with organic matter. Trop. Agric. 77:21-26.

Gerdeman, J.W. & Nicolson, T.H. Spores of mycorrhizal Endogene Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting (1963) Transactions of the British Mycological Society. 46: 235-244.

Giovannetti, M., Mosse, B. (1980) An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. New Phytol. 84:489-500.

Gomes, M. J. I. R. (1995) Estudos taxonômicos no gênero *Paspalum L.*, grupos “Virgata” e “Quadrifaria” no Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP.

Gramaje, D.; Mostert, L.; Groenewald, J. Z. Crous, P.W. (2015) *Phaeoacremonium*: from esca disease to phaeohyphomycosis. Fungal Biol. 119: 759-783.

Guo, W.; Zhao, R.; Yang, H.; Zhao, Ji.; Zhang, J. (2013) Using native plants to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on revegetation of iron tailings in grasslands. Biol. Fert. Soils. 49:617–626. DOI 10.1007/s00374-012-0751-9.

Hamid, Y.; Tang, L.; Sohail, M.I.; Cao, X.; Hussain, B.; Aziz, M. Z.; Usman, M.; He, Z-L.; Yang, X. (2019) An explanation of soil amendments to reduce cadmium phytoavailability and transfer to food chain, Science of The Total Environment, 660: 80-96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.419>.

Hart, M. M.; Aleklett, K.; Chagnon, P-L.; Egan, C.; Ghignone, S.; Helgason, T.; Lekberg, Y.L. *et al.* (2005) Navigating the labyrinth: a guide to sequence-based, community ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 207: 235–247.

Hirayama, K. & Tanaka, K. (2011) Taxonomic revision of *Lophiostoma* and *Lophiotrema* based on reevaluation of morphological characters and molecular analyses, Mycoscience, 52: 401-412.

Hoeksema, J. Chaudhary, V.B.; Gehring, C.A.; Johnson, N.C.; Karst, J.; Koide, R.T.; Pringle, A. *et al.* (2010) A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. Ecol. Lett. 13: 394–407.

Ijdo, M.; Cranenbrouck, S.; Declerck, S. (2011) Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. Mycorrhiza 21:1–16.

Jansa, J.; Oberholzer, H.-R.; Egli, S. (2009) Environmental determinants of the arbuscular mycorrhizal fungal infectivity of Swiss agricultural soils. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.07.004>.

Jansa, J., Erb, A., Oberholzer, H.R.; Šmilauer, P., Egli, S. (2014) Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Mol. Ecol.* 23, 2118–2135.

Janoušková, M., Krak, K., Wagg, C., Štorchová, H., Caklová, P., & Vosátka, M. (2013) Effects of inoculum additions in the presence of a preestablished arbuscular mycorrhizal fungal community. *J. Appl Environ Microbiol.* 79: 6507–6515. <https://doi.org/10.1128/AEM.02135-13>.

Janoušková, M.; Krak, K.; Vosátka, M.; Püschel, D.; Štorchová, H. (2017) Inoculation effects on root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities spread beyond directly inoculated plants. *PLoS ONE* 12 (7): e0181525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181525>.

Jumpponen, A. Mycorrhiza (2001) Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? *Mycorrhiza*, 11: 207. <https://doi.org/10.1007/s005720100112>.

Köhl, L.; Lukaszewicz, C. E.; van der Heijden, M. G. A. (2016) Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. *Plant Cell Environ.*, 39: 136-146.

Kokkoris, V.; Li, Y.; Hamel, C.; Hanson, K.; Hart, M. (2019) Site specificity in establishment of a commercial arbuscular mycorrhizal fungal inoculant. *Sci. Total Environ.* 660: 1135-1143.

Kneller, T.; Harris, R.J.; Bateman, A.; Muñoz-Rojas, M. (2018) Native-plant amendments and topsoil addition enhance soil function in post-mining arid grassland, *Sci. Total Environ.* 621: 744-752.

Kumar, S.; Singh, A.K.; Ghosh, P. (2018) Distribution of soil organic carbon and glomalin related soil protein in reclaimed coal mine-land chronosequence under tropical condition. *Sci. Total Environ.* 625: 1341–1350.

Kumaresan D, Cross TM, Grez, MB, Kariman K, Nevill P, Stevens J. *et al.* (2017) Microbial Functional Capacity Is Preserved Within Engineered Soil Formulations Used

in Mine Site Restoration. *Sci. Rep.*7: 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00650-6>.

Lindahl, B. D.; Nilsson, R.H.; Tedersoo, L.; Abarenkov, K.; Carlsen, T.; Kjølter, R.; Kõljalg, U. *et al.* (2013) Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide 199: 288–299. doi: 10.1111/nph.12243.

Mendez, M. O. and Maier, R.M. (2008) Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7:47–59. DOI 10.1007/s11157-007-9125-4.

Millner, PD; Kitt, DG. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (1992) *Mycorrhiza*, 2:9-15.

Ohsowski, B.M.; Dunfield, K.; Klironomos, J. N.; Hart, M.M. (2018). Plant response to biochar, compost, and mycorrhizal fungal amendments in post-mine sandpits. *Restor. Ecol.* 26: 63–72. doi: 10.1111/rec.12528.

Phillips, J.M. & Hayman, D.S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*55: 158-161.

Pylro, V.S.; Roesh, L.F.W.; Ortega, J.M.; Amaral, A.M.; Tótola, M.R.; Hirsch, P.R. *et al.* (2014) *Microb. Ecol.* 67: 237. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0302-4>.

Renker, C., Zobel, M., Opik, M., Allen, M.F., Allen, E.B., Vosatka, M. *et al.* (2004) Structure, dynamics, and restoration of plant communities: do arbuscular mycorrhizae matter. In: *Assembly Rules and Restoration Ecology: Bridging the Gap Between Theory and Practice* (eds V.K. Temperton, R.J. Hobbs, T. Nuttle & S. Halle). Island Press, Washington, DC, USA, pp. 189– 229.

Rosenfeld, C.E.; James, B.R.; Santelli, C.M. (2018) Persistent bacterial and fungal community shifts exhibited in seleniumcontaminated reclaimed mine soils. *Appl. Environ Microbiol* 84: e01394-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01394-18>.

Santana, B.V. N.; de Araújo, T.O.; Andrade, G.C.; Freitas-Silva, L.; Kuki, K.N.; Pereira, E.G.; Azevedo, A.A.; daSilva, L. C. (2014) Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. *Environ Sci Pollut Res* 21:2550–2562. DOI 10.1007/s11356-013-2160-5.

Santini, T. C. and Gagen, E. J. (2018) The geomicrobiology of mining environments. *Microbiol. Aust.* 39:37–41.

Schlaeppli, K.; Bender, S.F.; Mascher, F.; Russo, G.; Patrignani, A.; Camenzind, T.; Hempel, S.; Rillig, M.; van der Heijden, M.G.A. (2016) High-resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal Fungi. *New Phytol.* 3:780-791. doi: 10.1111/nph.14070.

Schlemper, T.R. and Stürmer, S.L. (2014) On farm production of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum using lignocellulosic agrowastes. *Mycorrhiza* 24:571–580. DOI 10.1007/s00572-014-0576-5.

Schwartz, M.W.; Hoeksema, J.D.; Gehring, C.A.; Klironomos, J.N.; Johnson, N.C.; Klironomos, J.N.; Abbot, L.K *et al.* (2006) The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculum. *Ecol. Lett.* 9: 501–515.

Sheoran V, Sheoran, AS., & Poonia, P (2010) Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water*, 3:1–21. [https://doi.org/Available at: http://scholarworks.umass.edu/intljssw/vol3/iss2/13](https://doi.org/Available%20at%3A%20http://scholarworks.umass.edu/intljssw/vol3/iss2/13).

Siqueira-Silva, A.I.; Rios, C.O.; Pereira, E.G. (2019) Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: the role of apoplastic radicular barriers. *J. Environ. Sci.* 78: 257-266.

Smith, S.E.; Jakobsen, I.; Grønlund, M.; F. Smith, A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol.* 156: 1050–1057.

Taylor, G.J & Crowder, A.A. (1983) Use of the dcb technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants. *Amer. J. Bot.* 70: 1254-1257.

Tedersoo, L.; Bahram, M.; Põlme, S.; Kõljalg, U.; Yorou, N. S.; Wijesundera, R.; Ruiz, L.V. *et al.* (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346:1078. doi:10.1126/science.1256688.

Torres-Arias, Y, Fors, R.O.; Nobre, C.; Gómez, E. F., Berbara, R.L.L. (2016) Production of native arbuscular mycorrhizal fungi inoculum under different environmental conditions. *Braz. J. Microbiol.* 48: 87-94.

Van Geel, M.; Busschaert, P.; Honnay, O.; Lievens, B. (2014) Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *J. Microbiol. Methods.* 106: 93-100.

Verbruggen, E.; van der Heijden, M.G.A.; Rillig, M.C.; Kiers, E.T. (2012) Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytol.* 197: 1104–1109.

Vieira, C. K.; Borges, L.G.A.; Marconatto, L.; Giongo, A.; Stürmer, S.L. (2018) Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Appl Soil Ecol* 131:55-65. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.07.011>.

Walkley, A. & Black, I.A. (1934) An Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Sci*, 37: 29-38.

Walsh, E.; Luo, J.; Zhang, N. *Acidomelania* panicicola gen. et sp. nov. from switchgrass roots in acidic New Jersey pine barrens (2014) *Mycologia* 4:856–864. DOI: 10.3852/13-377.

Wang, F. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in mining-impacted sites and their contribution to ecological restoration: Mechanisms and applications (2017) *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 47: 1901–1957. <https://doi.org/10.1080/10643389.2017.1400853>.

Whiting, S.N.; Reeves, R.D.; Richards, D.; Johnson, M.S.; Cooke, J.A.; Malaisse, F.; Paton, A. *et al* (2004) Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restor. Ecol.* 12:106–116.

Wu, S.C.; Wong, C.C.; Shu, W. S.; Khan, A.G.; Wong, M.H. (2010) Mycorrhizal Remediation of Lead/Zinc Mine Tailings Using Vetiver: A Field Study. *Int. J. Phytoremediation.* 13:61–74, 2011.

Rapai, S.B. Hunt, S.; Bainard; L. D.; Turgeon, M-H e Newmaster, S.G. (2016) Soil Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi Promotes the Growth of Boreal Plant Communities in Gold Mine Overburden. *Restor Ecol.* 34: 216-224.

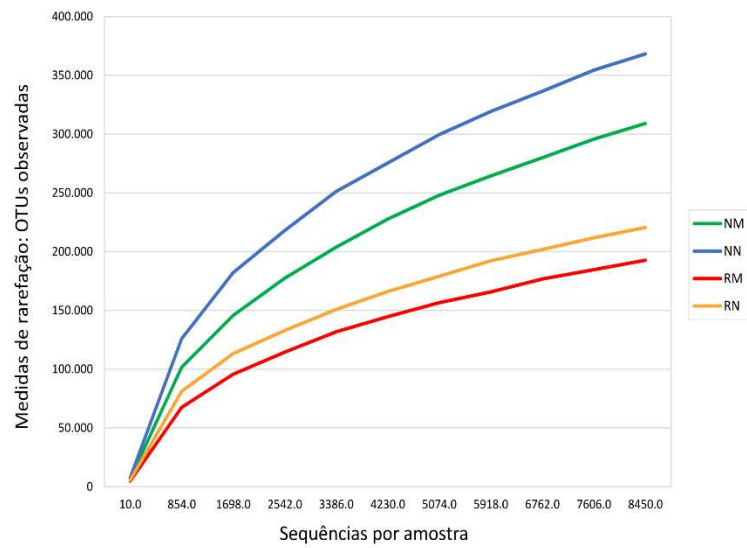
Rios, C.O., Souza, B.C., Siqueira-Silva, A.I., Pereira, E.G., (2017) Assessment of iron toxicity in tropical grasses with potential for revegetation of mined areas. *Pol. J. Environ. Stud.* 26:2167–2173.

Yan, D.; Zhao, F.; Sun, O.J. Assessment of Vegetation Establishment on Tailings Dam at an Iron Ore Mining Site of Suburban Beijing, China, 7 Years After Reclamation with Contrasting Site Treatment Methods (2013) *Environmental Management.* 52: 748. <https://doi.org/10.1007/s00267-013-0092-y>.

Yasuhara T., Nokihara K. (2001) High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *Journal of agricultural and food chemistry,* 49:4581-4583.

Zago, V.C.P.; Dores, N.C.; Watts, B.A. (2019) Strategy for phytomanagement in an area affected by iron ore dam rupture: a study case in Minas Gerais State, Brazil. *Environ. Pollut.*249: 1029-1037.

## Material suplementar



**Figura 1.** Curva de rarefação de OTUs agrupadas a 97 % de identidade das sequências, nas amostras dos inóculos obtidos pela técnica *on-farm*: NM = natural misto, NN = natural nativo, RM = revegetação misto e RN = revegetação nativo

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência e distribuição da comunidade de procariotos revelou similaridades no aspecto taxonômico, no metabolismo preditivo de carbono e nitrogênio, bem como no perfil de grupos de fixadores de nitrogênio e Actinobactérias. Assim, o estudo pontual após 10 anos de encerramento das atividades mineradoras demonstrou a resiliência do sítio RV, que abrange a capacidade do ambiente se recuperar após um distúrbio.

As características físico-químicas do solo permaneceram distintas entre ambos os sítios após 10 anos, a estrutura da comunidade de procariotos e fungos, como revelado pelas análises, foram estreitamente influenciadas pelas mesmas, o que revela que ambos os sítios são habitats de comunidades microbianas diversas, que impulsionadas pelas condições ambientais tanto de RV quanto de NT exibiram padrões de distribuição particulares, os quais refletem adaptações distintas.

A resposta espacial-temporal da comunidade fúngica demonstrou as maiores métricas de diversidade e abundância no sítio NT e no período seco, evidenciando a complexidade na estrutura das comunidades fúngicas, principalmente neste sítio e período de amostragem. Este estudo também exibiu as dinâmicas distintas de táxons dentro e entre os sítios RV e NT e dentro e entre os períodos de amostragem, sobretudo do filo Glomeromycota, nas diferentes abordagens utilizadas. Assim, a variação da dinâmica da comunidade de fungos pode auxiliar o entendimento de respostas adaptativas inerentes ao tempo e espaço, delimitados neste estudo e servir como comparativo para ambientes similares.

O estudo das comunidades de procariotos e fungos pode ser utilizado como critério para avaliar o progresso do sítio de pós-mineração em função do sítio nativo, utilizado neste estudo como meta de recuperação.

O sucesso de inoculante nativo, obtido pela metodologia *on-farm*, em conjunto com a cama de frango, na biomassa de *P. densum* mostrou o potencial destes componentes na revegetação em sítios com rejeito de mineração de ferro. A adubação orgânica com cama de frango, evidenciou efeitos positivos na biomassa e na colonização micorrízica em campo, e também na colonização micorrízica em casa de vegetação, dessa forma, o seu uso é recomendado em qualquer um destes subprodutos de mineração de ferro para

fins de revegetação. No entanto, o uso de maior quantidade inicial do inoculante, bem como o tempo de permanência dos mesmos, as interações entre a comunidade de FMAs dos inoculantes e FMAs instríscecos ao rejeito e a pilha de estéril requerem mais investigações, pois possivelmente influenciam a biomassa e colonização micorrízica de *P. densum*.