

JOÃO PAULO CAMPOS MOURA CAVALCANTE

**DIVERSIDADE BACTERIANA E INDICADORES BIOLÓGICOS EM ÁREAS  
IMPACTADAS COM REJEITOS DE MINERAÇÃO, EM MARIANA-MG**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

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

T

C376d  
2017  
Cavalcante, João Paulo Campos Moura, 1992-  
Diversidade bacteriana e indicadores biológicos em áreas impactadas com rejeitos de mineração, em Mariana-MG / João Paulo Campos Moura Cavalcante. – Viçosa, MG, 2017.  
ix, 79f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Micro-organismos do solo. 2. Indicadores biológicos.  
3. Impacto ambiental - Avaliação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22 ed. 631.46

JOÃO PAULO CAMPOS MOURA CAVALCANTE


**DIVERSIDADE BACTERIANA E INDICADORES BIOLÓGICOS EM ÁREAS  
IMPACTADAS COM REJEITOS DE MINERAÇÃO, EM MARIANA-MG**

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

---

APROVADA: 25 de julho de 2017.

  
Juraci Alves de Oliveira

  
Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Coorientadora)

  
Cynthia Canêdo da Silva  
(Orientadora)

*A Deus,  
À minha avó Maria Frazão Campos,  
À minha família e as famílias afetadas pelo desastre,*

***Dedico.***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, à vida e pela sua generosidade, que me permitiram chegar neste momento. A Universidade Federal de Viçosa e ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMBA-UFV), pela oportunidade e por todo o conhecimento e a experiência adquiridas.

A população brasileira que através dos seus impostos, permitiu a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) me oferecer a bolsa de estudos para desenvolvimento das atividades realizadas neste mestrado, além do CNPq com aporte de recursos ao programa de pós-graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro à parte dos experimentos realizados, através do projeto “Diversidade microbiana e seleção de micro-organismos para favorecer o repovoamento vegetal”.

A minha avó, Maria Frazão de Medeiros Campos que, durante a realização deste mestrado, nos deixou e a quem sempre vou dever o melhor do meu caráter, generosidade e o exemplo da mulher que antes de tudo era “*uma forte*” e que deixou grande saudade por onde esteve neste mundo.

Aos meus pais, Fernanda e Pedro, por sempre fazerem o melhor que conseguiram na formação de seus filhos e pela liberdade de escolha de seguir pelos mais diferentes caminhos, sem nunca deixar de ter o apoio esperado.

A minha irmã Camilla, pelo exemplo de perseverança em busca do que se realmente quer na vida independente das mudanças de contexto. Ao meu tio Fernando, sua esposa Suzy, primos Laryssa e Ramon e a Ozita, meu obrigado, pelo suporte que tanto contribuiu nestes anos distantes.

Aos professores do programa de pós-graduação, em especial, a minha orientadora, professora Cynthia Canêdo da Silva, cuja generosidade e confiança foram fundamentais para o desenvolvimento das atividades na UFV.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, meu agradecimento pela MBI 664, a disponibilização da parceria, parte da infraestrutura e *Know-how* na área de indicadores biológicos do solo. Assim como a Gustavo Sampaio Martins pelo

empenho e parceria nas análises experimentais de indicadores biológicos do solo.

A professora Maria Catarina Kasuya, Marliane Soares Silva e a equipe do Laboratório de Associações Micorrízicas, cuja parceria permitiu o desenvolvimento de diferentes etapas desse projeto, com auxílios que incluíram a infraestrutura para a coleta de amostras e a relação de trabalho desenvolvida ao longo da pós-graduação na UFV.

A Lívia Fidelis, cuja amizade e o auxílio ao longo de todo o período em Viçosa e até mesmo após foram de fundamental importância no sucesso desse trabalho, sem dúvidas a ela toda a minha gratidão. Além de ser para mim exemplo de competência, amizade e de pessoa que serão sempre levados por mim para onde for e cuja minha amizade sempre terá.

A Helena Santiago, cuja a amizade, companhia e toques e as conversas foram parte de bons momentos vividos, além da contribuição em vários “*brainstorms*” que geraram ideias essenciais nesse trabalho e cuja amizade e parceria devem estender-se além das quatro pilastras.

A Josenilda Santos, cuja amizade e as “levantadas de bola” fizeram os dias mais engraçados e leves. Assim como aos membros do Laboratório de Imunovirologia Molecular (DBG), Mariana, Ítalo, Roberto, Jonh, pela companhia.

Ao professor Juraci Alves de Oliveira (DBG/UFV), por gentilmente se dispor a fazer parte desta banca avaliadora.

Aos colegas de pós-graduação, de UFV e/ou de Viçosa, em especial, Beatriz, Emanuelle, Jonathan, Guilherme, Vinícius e Felipe. Meu agradecimento também, a Jaqueline e a secretária do programa Letícia.

Aos amigos que a vida me deu e me acompanharam em mais essa aventura mesmo distante, Rafael Gallinari, Tiago Sampaio, Thiago Pajeú, Gabriela Fernandes, Amanda Thamires, Nathália Ximenez e Laila Paiva. Aos amigos que a UFRPE me deu, Amanda Souza, Cecília, Elton, Isabela, Ingrid, Camila Celestino, Rafael, André Arruda, Pedro, Tomás, Fabiane, Luciana e aos professores Vera Ramalho, José Vitor, Mario Lira Junior e Adeneide Galdino.

A todos, que de alguma forma, se sentem mercedores do meu obrigado pela execução das atividades deste projeto.

## BIOGRAFIA

JOÃO PAULO CAMPOS MOURA CAVALCANTE, filho de Fernanda Frazão Campos e Pedro Moura Cavalcante, nasceu em Recife, Pernambuco, no dia 07 de fevereiro de 1992. Concluiu o ensino médio no ano de 2009 no Colégio São Luiz em Recife-PE.

Em 2010, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), campus Recife, nesta participou como voluntário de diversas atividades de extensão. De 2010 a 2012, foi integrante do programa de Educação Tutorial (PET/MEC/FNDE), no qual foi o representante discente no mandato 2011/2012, no mesmo período também desenvolveu iniciação científica voluntária no Laboratório de Processos Fermentativos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Bolsista do programa Ciência sem Fronteiras (CNPq), realizou graduação sanduíche na *Universidad de Córdoba* (UCO/Espanha) e estágio de verão no laboratório de controle de qualidade e microbiologia da indústria alimentícia COVAP, de 2012 a 2013. Nessa última Universidade recebeu a "*Matricula de honor*" pelo desempenho na disciplina de "*Sistemas de Gestión y Auditorias medioambientales*".

Bolsista do programa institucional de bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) por 18 meses, desenvolveu iniciação científica e trabalho de conclusão de curso na área de microbiologia ambiental, defendendo trabalho de conclusão de curso intitulado "Crescimento rizobiano *in vitro* sob estresses ambientais". Em julho de 2015, graduou-se em Ciências Biológicas e em agosto do mesmo ano, ingressou no mestrado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação no dia 25 de julho de 2017.

## ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>3</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
1. BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO DOCE	4
2. DESASTRE AMBIENTAL NA BACIA DO RIO DOCE	4
3. MEDIDAS PARA A BACIA DO RIO DOCE APÓS DESASTRE	6
4. INDICADORES BIOLÓGICOS DO SOLO	8
5. RESPIRAÇÃO BASAL E QUOCIENTE METABÓLICO	9
6. CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA	11
7. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS MICROBIANAS NO SOLO	11
8. DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADOR BIOLÓGICO	12
9. DIVERSIDADE MICROBIANA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	14
10. ÍNDICES DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA APLICADOS AS COMUNIDADES MICROBIANAS	16
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>22</b>
<b>RESPOSTA DA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO AO DESASTRE AMBIENTAL DE REJEITOS DE MINERAÇÃO E À REVEGETAÇÃO EM MARIANA-MG, BRASIL</b>	<b>23</b>
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÕES	41
CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES	41
AGRADECIMENTOS	41
CONFLITO DE INTERESSES	42

REFERÊNCIAS	42
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>48</b>
<b>ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM SOLOS CONTAMINADOS COM REJEITO DE MINERAÇÃO ORIUNDO DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO, MARIANA-MG.</b>	<b>49</b>
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	64
CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES	64
AGRADECIMENTOS	64
CONFLITO DE INTERESSES	65
REFERÊNCIAS	65
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>71</b>

## RESUMO

CAVALCANTE, João Paulo Campos Moura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Diversidade bacteriana e indicadores biológicos em áreas impactadas por rejeitos de mineração, em Mariana-MG.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadores: Maria Catarina Megumi Kasuya e Marcos Rogério Tótola.

O rompimento da barragem de Fundão, localizada em Mariana-MG, lançou a Bacia Hidrográfica do Rio Doce aproximadamente 33 milhões de m<sup>3</sup> de rejeitos de mineração dispersos por 663 Km no continente e mais milhares de quilômetros no oceano atlântico ocasionando diversos impactos. Após o ocorrido, foi iniciado um programa de revegetação e bioengenharia nos primeiros 100 Km afetados. Análises do impacto causado pouco tem se referido a resposta da comunidade microbiana as modificações. Micro-organismos são indicadores ambientais eficientes, além de desempenharem papéis chaves no funcionamento dos ecossistemas. Assim, os objetivos desse trabalho foram avaliar indicadores biológicos do solo e alterações na comunidade bacteriana em regiões afetadas e afetadas sob processo de revegetação no distrito de Paracatu de Baixo, município de Mariana-MG. Duas coletas foram realizadas para avaliar características químicas e a comunidade microbiana por sequenciamento do gene rRNA 16 S, na segunda coleta também foram avaliados indicadores biológicos como enzimas do solo, biomassa microbiana e respiração basal. Os solos afetados pelo desastre apresentaram pH alcalino, concentração elevada de ferro além de baixo teor de matéria orgânica, carbono da biomassa microbiana e respiração basal, além de redução das atividades enzimáticas. A estrutura da comunidade microbiana foi fortemente modificada com predomínio dos filos Proteobacteria e Actinobacteria. Os índices de diversidade e riqueza estudados apresentaram valores superiores nas áreas afetadas que no controle estudado. Conclui-se que as características químicas, a comunidade microbiana do solo e o seu funcionamento foram fortemente modificados. A revegetação, mesmo em curto prazo, influenciou alterações na comunidade bacteriana. Os indicadores estudados podem ser utilizados para monitoramento das áreas afetadas pelo rejeito de mineração de ferro e dos programas de recuperação implantados.

## ABSTRACT

CAVALCANTE, João Paulo Campos Moura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Bacterial diversity and soil biological indicators in impacted areas with mining tailings in Mariana-MG.** Adviser: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisers: Maria Catarina Megumi Kasuya and Marcos Rogério Tótola.

The rupture of the *Fundão* dam, located in Mariana-MG, launched the Rio Doce Hydrographic Basin approximately 33 million m<sup>3</sup> of iron ore tailings that were spread over 663 km on the continent and thousands of kilometers in the Atlantic Ocean causing impacts of various types. After 2 months of the disaster, a revegetation program associated with bioengineering techniques was started in the first 100 km affected by the tailings. Analyzes of the environmental impact caused have focused almost exclusively on chemical parameters, flora and fauna, little has been studied about how the microbial community reacted to environmental modifications. Microorganisms are efficient environmental indicators, and play key roles in the functioning of ecosystems. Thus, the objectives of this work were to evaluate soil biological indicators and changes in the bacterial community in affected and affected regions under revegetation process in the district of Paracatu de Baixo, Mariana-MG. Two collections were carried out to evaluate chemical characteristics and the microbial community by sequencing of the 16S rRNA gene; in the second collection, biological indicators such as soil enzymes, microbial biomass and basal respiration were also evaluated. Soils affected by the disaster presented alkaline pH, high iron concentration in addition to low organic matter, microbial biomass carbon and basal respiration, as well as reduction of enzymatic activities. The microbial community structure was strongly modified with predominance of the Proteobacteria and Actinobacteria phyla. The diversity and richness indexes studied presented higher values in the affected areas than in the control studied. It is concluded that the chemical characteristics, the microbial community of the soil and its functioning were strongly modified. Revegetation, even in the short term, has influenced changes in the bacterial community. The indicators studied can be used to monitor the areas affected by the iron ore tailings and the recovery programs implemented.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Em novembro de 2015, o rompimento da barragem de rejeitos de mineração de ferro denominada Fundão, pertencente à mineradora Samarco, causou o maior desastre ambiental relacionado com a mineração conhecido (Bowker and Chambers, 2015). Estima-se que mais de 33 milhões de metros cúbicos de rejeito de mineração de ferro foram lançados a Bacia do Rio Doce, destacando-se perdas ao meio ambiente, a infraestrutura, além de perdas econômicas, sociais e humanas (Brasil, 2015).

O dano ambiental, ainda não totalmente mensurado, pode ser ampliado já que, após percorrer cerca de 663 Km na Bacia hidrográfica, a onda de rejeitos de mineração espalhou-se por outros aproximadamente 7 mil Km<sup>2</sup> no Oceano Atlântico (Marta-Almeida *et al.*, 2016; Miranda & Marques, 2016). Os rios da Bacia além de contaminados com um rejeito inerte rico em ferro e manganês, tiveram a sua turbidez aumentada e seus leitos destruídos ou assoreados, o solo da região também foi bastante afetado (Pires *et al.*, 2003; Brasil, 2015; ANA, 2016).

Quase 80% do rejeito liberado ficou depositado no solo e no leito do Rio Gualaxo do Norte e Rio do Carmo, nos primeiros 100 Km a jusante da Barragem de Fundão. Nessa região, quase 2.000 ha de mata natural foram removidos pela onda de rejeitos, além do fato que nessas regiões foram destruídos três distritos urbanos, Paracatu de Baixo, Bento Rodrigues e Gesteira (Brasil, 2015; Samarco, 2016).

Frente a essa situação e para evitar que mais rejeito de mineração depositado sobre o solo fosse carregado para o leito dos rios, a Fundação Renova e a Samarco, sob recomendação dos órgãos ambientais brasileiros, iniciou a remoção de parte do rejeito sobre o solo e um programa de revegetação às margens do Rio Gualaxo do Norte. Esses programas foram combinados com técnicas de bioengenharia e estão em execução desde dezembro de 2015.

Entretanto, muito pouco se avaliou sobre como a comunidade microbiana e como sua diversidade foram afetadas, bem como as implicações das modificações químicas sob a saúde do ecossistema solo. Sabe-se que os organismos desempenham papéis-chave para a ciclagem de nutrientes e para a

recuperação de áreas degradadas. Sabe-se também que a diversidade microbiana está intimamente relacionada à capacidade de os ambientes desempenharem suas funções e serem capazes de suportar e promover a vida.

Além disso, pela alta dependência microbiana aos fatores físicos, químicos e características bioquímicas relacionadas a sua presença e atividade, estes podem ser utilizados como indicadores do funcionamento dos ecossistemas (Mendes *et al.*, 2009). Adicionalmente, mudanças nesses indicadores podem prever mudanças ambientais mais rapidamente que indicadores físicos ou químicos, sendo de vital importância quando se deseja avaliar o impacto ocorrido ou propor estratégias de manejo do solo em áreas afetadas.

Assim, este estudo teve como objetivos: i) avaliar indicadores biológicos do solo afetado e não afetado pelo rejeito de mineração e o efeito da revegetação sobre os solos afetados; ii) avaliar a diversidade da comunidade bacteriana nos solos afetados e não afetado pelo rejeito, submetido ou não à processos de revegetação e verificar relação da diversidade com as mudanças nas características químicas do solo.

# Capítulo 1

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO DOCE

A bacia hidrográfica do Rio Doce, situada na região sudeste do Brasil nos estados de Minas Gerais (86% da área total) e no Espírito Santo (14% da área total) ocupa uma área de aproximadamente 83.500 km<sup>2</sup>. Das suas nascentes, na região da Serra da Mantiqueira e do Espinhaço (MG) até a sua foz no povoado de Regência, município de Linhares (ES), os rios dessa bacia percorrem 853 km (Bastos *et al.*, 2015) .

As águas provenientes dessa bacia possuem diversos usos, segundo dados da Agência Nacional de Águas/ANA (Brasil, 2015). Somente no Rio Doce, o principal da bacia, existiam antes do desastre, 169 outorgas oficiais para o uso da água em diversas atividades como agropecuária, atividades industriais, mineração, além do abastecimento público numa região onde vivem mais de 3,5 milhões de habitantes distribuídos em 230 municípios. Outros usos incluem o uso recreativo (Guedes *et al.*, 2015; Fragoso-Moura *et al.*, 2016) e a obtenção de recursos naturais, como a pesca artesanal.

Como outras bacias hidrográficas no Brasil, a Bacia do Rio Doce sofre com diversos problemas ambientais, como erosão, assoreamento, desmatamento, poluição e lançamento de rejeitos urbanos. Outro problema é o lançamento de rejeitos da mineração, o que faz com que alguns dos rios da bacia tenham concentrações de determinados elementos químicos superiores ao limite recomendado (ANA, 2016).

Esse conjunto de problemas faz com que a Bacia do Rio Doce seja considerada a mais degradada do estado de Minas Gerais, tornando até mesmo a percepção da população que utiliza desse recursos hídricos negativa sobre a qualidade da água e o risco de sua utilização para a saúde humana (Guedes *et al.*, 2015).

### 2. DESASTRE AMBIENTAL NA BACIA DO RIO DOCE

No dia 05 de novembro de 2015, a Bacia Hidrográfica do Rio Doce sofreu um dos maiores desastres ambientais já registrados no Brasil. No histórico município de Mariana, zona da Mata e parte da região conhecida como *quadrilátero ferrífero* de Minas Gerais, houve o rompimento de uma das barragem de rejeitos de mineração de ferro, pertencente

ao complexo de Germano e propriedade da mineradora Samarco Mineração (Brasil, 2015).

A mineradora Samarco, uma *joint-venture* entre a anglo-australiana BHP Billiton Brasil e a companhia mineradora brasileira Vale, dona do complexo de Barragens denominado Germano, que possuía três barragens principais, denominadas Germano, Santarém e Fundão. O rompimento dessa última, com capacidade de 50 milhões de metros cúbicos, atingiu e causou o galgamento da barragem adjacente de Santarém, que armazenava água, inserindo todo esse material no Rio Gualaxo do Norte, bacia do Rio Doce. Essa liberação de rejeitos, cujas estimativas de valores totais são divergentes, variando entre 32,6 e 70 milhões de metros cúbicos, causou a destruição completa de dois distritos de Mariana (MG), Bento Rodrigues e Paracatu de Baixo, além da destruição parcial do distrito de Gesteira localizado no município de Barra Longa (MG). Dezenove mortos foram contabilizados, entre trabalhadores da mineradora e moradores de Bento Rodrigues e mais de 1.200 pessoas ficaram desabrigadas. Trinta e três municípios de Minas Gerais, quatro do Espírito Santos e mais de 1,2 milhão de pessoas foram afetadas direta e indiretamente pelo desastre (Fernandes *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2016; Porto, 2016; Segura *et al.*, 2016).

A onda de rejeitos percorreu cerca de 663 Km até o Oceano Atlântico, sendo os primeiros 110 Km os mais impactados segundo o IBAMA. Estes, compreendem desde o local do rompimento até a Usina Hidroelétrica Risoleta Neves (conhecida na região como candonga) e na qual ficaram retidos quase 80% do total do rejeito liberado e até a data atual (maio de 2017), ainda estão sendo contidos em Candonga, inviabilizando o funcionamento da mesma. Nessa área, a onda de rejeitos atingiu primeiramente o Rio Gualaxo do Norte, por 55 Km, até sua desembocadura no Rio do Carmo e, após 22 Km, a onda de rejeitos chega ao Rio Doce, de onde segue até a sua foz, no povoado de regência (ES) e de lá se espalha por mais 200 Km<sup>2</sup> no oceano atlântico (Brasil, 2015; Samarco, 2016).

Entre os principais impactos e alterações ocorridas ao longo da área afetada, se destacam a remoção de mais de 2.000 ha de vegetação nos primeiros 77 Km, a turbidez e interrupção do abastecimento de água, problemas de abastecimento de energia, interrupção das atividades pesqueiras e de diversos outros setores da economia. São também contabilizados prejuízos ao turismo, remoção de áreas de reserva legal, prejuízo a atividades agropecuárias, com inundação de áreas de pastagens e morte de animais.

Além disso, estudos apontam danos à fauna marinha, a geomorfologia da região, também a áreas protegidas por lei em ambientes terrestres e aquáticos, como também a relação observada com a saúde das populações na região (Porto, 2016).

Parte desses impactos ainda está em verificação e continuam a aparecer novas consequências e problemas, mediante o contínuo monitoramento pelos órgãos ambientais, a própria Samarco e instituições, como universidades e organizações não governamentais (ONG's). A quantidade de informação gerada vem causando discussão, já que muitas vezes os dados obtidos apresentam resultados divergentes, como a composição química e as características físicas do rejeito, a presença ou não de elementos traço no solo e na água, a contaminação dos lençóis freáticos e possíveis danos ao ecossistema marinho. Essa divergência de informações tem sido um complicador na tomada de decisão sobre quais ações emergenciais que devem ser tomadas pelos órgãos competentes e no cálculo das multas e recursos a serem destinados para a compensação dos danos causados (Fernandes *et al.*, 2016; Miranda & Marques, 2016).

Formalmente, a Samarco e vários de seus diretores estão sendo responsabilizados pelo desastre, danos ambientais e mortes humanas causadas. Suas atividades até o momento (maio de 2017), estão suspensas na região até que os acordos junto aos órgãos federais e estaduais relacionados com gestão de águas, meio ambiente e recursos minerais sejam finalizados. Enquanto isso, agravam-se as situações sociais e da economia na região de Mariana, fortemente dependente dos recursos provenientes da atividade mineradora da Samarco (Kirchherr & Charles, 2016; Filho *et al.*, 2017).

### **3. MEDIDAS PARA A BACIA DO RIO DOCE APÓS DESASTRE**

Desde o desastre, diversas ações tomadas pela empresa tiveram caráter emergencial, com ênfase no atendimento as famílias afetadas e a recuperação da “normalidade” do funcionamento dos mais de 37 municípios atingidos em toda a bacia. Com relação às ações para o meio ambiente, elas se concentraram na remoção dos rejeitos de mineração, medidas de contenção do rejeito, recuperação do patrimônio histórico perdido nos distritos destruídos e resgate de fauna e flora (Samarco, 2016).

A partir de março de 2016, com a assinatura do Termo de Transação de Ajustamento de Conduta (TTAC) entre a Samarco, suas sócias BHP Billiton Brasil e Vale, o governo federal, de Minas Gerais, do Espírito Santo e outros onze órgãos públicos, diversas ações foram planejadas e assumidas pela empresa. Para gerir e coordenar a recuperação da Bacia Hidrográfica do Rio Doce, como previsto pelo TTAC, foi criada a Fundação Renova, que a partir de sua constituição é o órgão que será responsável pelos programas socioambientais e socioeconômicos para reparar e compensar os danos causados pelo desastre de Mariana (Samarco, 2016).

Utilizando um modelo inédito na gestão de desastres ambientais e dotada de orçamento próprio estimado em 4,4 bilhões de reais até 2019, a Fundação Renova assumiu diversos programas anteriormente coordenados pela Samarco e lançou novos programas de recuperação, totalizando 41 projetos e conjuntos de ações em execução na região. Ações essas que vão desde o atendimento às famílias afetadas, até a recuperação da fauna e flora, passando pela implementação de infraestrutura urbana, resgate e preservação do patrimônio natural e cultural até a recuperação das áreas degradadas (FUNDAÇÃO RENOVA, 2017).

Uma das ações iniciadas pela Samarco como emergencial e assumida pela Fundação Renova, foi a revegetação iniciada nos primeiros 77 Km e as margens do Rio Gualaxo do Norte, combinada com técnicas de bioengenharia que visam conter o carregamento de rejeitos depositados sobre o solo para o leito dos rios. Essa medida somada à remoção do rejeito depositado, visa a recuperação das áreas degradadas minimizando danos ambientais. Foram utilizadas espécies de leguminosas e gramíneas conhecidas por auxiliar o processo de recuperação do solo e terem resistência a condições ambientais adversas, sendo muitas vezes plantas pioneiras em determinadas regiões auxiliando o aumento da matéria orgânica (Li *et al.*, 2014).

O depósito de rejeitos em barragens é solução recorrente no setor da mineração em todo o mundo. Recorrentes, também, são rupturas nesses reservatórios, causando diversos impactos ambientais. Como esperado nesses casos, os impactos sociais são o destaque e o complexo processo de atribuição de responsabilidades acaba deixando estudos ambientais em segundo plano (Kirchherr & Charles, 2016; Labonne, 2016).

O cenário pós desastre na Bacia do Rio Doce torna-se mais complexo diante da ausência de dados sobre desastres anteriores, além das características únicas da área, da

extensão e do material lançado na bacia, sendo considerado por alguns este o maior desastre do tipo pelo volume lançado ao ambiente.

#### **4. INDICADORES BIOLÓGICOS DO SOLO**

A busca por quantificações e qualificações na utilização de recursos naturais é prática recorrente e, para tanto, são necessários padrões que possam ser comparados e validados com o objetivo de contribuir na tomada de decisão. A qualidade do solo, por exemplo, está diretamente relacionada à sua utilização, enquanto a sua saúde se relaciona com a capacidade dele promover o funcionamento das atividades biológicas e dos ecossistemas neles estabelecidos (Nielsen & Winding, 2002).

Embora na literatura haja uma série de divergências no uso desses termos e no seu significado, inferir o grau de conservação e degradação de determinado solo é tarefa contínua, já que se trata de um ambiente complexo. Essa inferência ganha especial importância no momento em que a demanda mundial por alimentos e as fronteiras agropecuárias se expandem. A indicação de qualidade pode agregar valor à terra comercializada, além disso a relação da qualidade do solos com a qualidade do ar e da água e até mesmo com a saúde humana tem sido destacada, tornando-se especialmente importante os serviços ambientais desenvolvidos por solos conservados (Mendes *et al.*, 2009).

Usualmente, parâmetros relacionados à química, física e fertilidade do solo são os principais instrumentos na avaliação do estado de conservação e degradação de determinado solo, já que seus parâmetros e classificações estão consolidados. A utilização de componentes biológicos na avaliação é feita, ainda nos dias atuais, sobre a forma de bioindicadores e, de maneira empírica, principalmente pela presença de determinados grupos de invertebrados (Mendes *et al.*, 2009).

Entretanto, esses parâmetros biológicos não estão perfeitamente definidos e nem mesmo um único parâmetro poderia descrever a quantidade distinta de processos biológicos que influem na qualidade e saúde do solo, o que torna o seu uso menos recorrente. A busca por indicadores biológicos na qualidade dos solos tem se acentuado nos últimos anos em face da preocupação com práticas sustentáveis na agricultura e na quantificação dos chamados serviços ecossistêmicos (Pôrto *et al.*, 2009). Adicionalmente,

já é consenso que o componente biológico acaba influenciando as características físicas e químicas e é mais sensível as mudanças ambientais, ou seja, pode prever alterações no ambiente antes dos parâmetros já consolidados (Mukherjee & Lal, 2014; Paz-Ferreiro & Fu, 2016).

Para uma avaliação mais completa, sugere-se avaliar os componentes físicos, químicos e biológicos em conjunto, e alguns estudos buscaram gerar indicadores que aglutinem essas informações (Chaer *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2009; Mukherjee & Lal, 2014). Embora acurados, esses indicadores, não tiveram grande utilização até o momento, frente a isso, diversos países propõem um número mínimo de indicadores que devem ser avaliados no estudo do solo para cada um dos três componentes (Araújo and Monteiro, 2007; Bastida *et al.*, 2008).

A busca por um número mínimo de indicadores biológicos, é assunto controverso, já que há regulações distintas entre os países que possuem um monitoramento contínuo da qualidade dos solos. São recomendados de poucos a até 8 a depender do país, com diferenças na amostragem e no que está sendo avaliado, e com os adventos das técnicas moleculares novas opções de indicadores, como a metagenômica, estão surgindo (Dickinson *et al.*, 2005; Araújo & Monteiro, 2007; Cardoso *et al.*, 2013).

Os principais indicadores utilizados tentam verificar as mudanças no ambiente a partir do estudo das variações temporais e em relação a uma área controle, e baseiam-se na ciclagem de nutrientes, presença de espécies chaves, biomassa e diversidade principalmente a de micro-organismos e invertebrados. O uso em conjunto de vários desses indicadores com atuação em distintos processos biológicos fornece uma análise mais robusta das alterações no ambiente e permite identificar pontos mais afetados (Bastida *et al.*, 2008).

A seguir uma breve descrição de alguns indicadores, seus usos e limitações:

## **5. RESPIRAÇÃO BASAL E QUOCIENTE METABÓLICO**

A respiração do solo, ou respiração basal do solo, é utilizada como um dos principais indicadores da qualidade e da saúde do solo em programas de monitoramento propostos por diversos países (Nielsen & Winding, 2002; Araújo & Monteiro, 2007; Chaer *et al.*, 2009). Essa medida representa a oxidação da matéria orgânica por organismos aeróbios do solo, principalmente os micro-organismos, e é avaliada a partir

do consumo do oxigênio gasoso ( $O_2$ ) e/ou da liberação do dióxido de carbono (Anderson and Domsch, 1993; Anderson, 2003).

Pela baixa concentração de  $CO_2$  na atmosfera, a medida da respiração basal torna-se um método sensível pela liberação do dióxido de carbono, isto garante a essa técnica a sensibilidade necessária para ser utilizada como indicadora das atividades microbianas do solo e utilizada para avaliação de áreas degradadas e em recuperação (Santos *et al.*, 2013, 2016).

Outro ponto que torna essa técnica bastante difundida é a ampla variedade de métodos para essa quantificação, que vão desde titulações simples até técnicas mais complexas como a cromatografia gasosa, eletrorespirômetro, condutividade elétrica ou até mesmo com isótopos radioativos como o Carbono 14 (Nielsen & Winding, 2002; Wall *et al.*, 2015). Pela variação das condições ambientais interferir em processos fisiológicos, como a oxidação do carbono, a respiração pode, também, indicar alterações nos ambientes naturais e, por essa mesma razão, recomenda-se o acompanhamento contínuo na avaliação da respiração basal e, até mesmo, induzindo a mesma com o auxílio de substratos, tais como carboidratos (Santos *et al.*, 2016).

A partir dos dados de respiração basal do solo, combinados com os dados de biomassa microbiana presente nas amostras de solo, pode ser calculado o quociente metabólico, um eficiente indicador de estresse nos ecossistemas. O quociente metabólico permite uma avaliação da utilização da energia, baseado na respiração, e do carbono, baseado na biomassa microbiana no solo, um aumento nos seus valores pode mostrar alta eficiência na incorporação de carbono na biomassa microbiana indicando algum tipo de estresse ambiental (Anderson & Domsch, 1993; Santos *et al.*, 2013; Świeciło & Zych-Wezyk, 2013).

Estudos que avaliaram áreas após sua utilização em atividades de mineração verificaram que, em geral, a respiração basal do solo aumenta à medida que o estresse ao ecossistema se torna mais severo. O que se supõe está relacionado ao fato de que fora de condições ambientais ótimas micro-organismos aeróbios demandariam mais energia e, conseqüentemente, mais oxidação de carbono para o funcionamento de seu metabolismo (Santos *et al.*, 2013; Quadros *et al.*, 2016).

## 6. CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA

Por definição, biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica constituída principalmente por membros dos domínios Bacteria e Archaea, além de membros de alguns grupos do domínio Eukarya, como os fungos, nematoides e protozoários. Ela em geral, é expressa em microgramas de carbono por grama de solo seco. Diversos métodos podem avaliar a biomassa microbiana, tendo destaque para o método proposto por Vance et al. (1987), conhecido também com método da fumigação-extração.

Diversos trabalhos associam a avaliação da biomassa microbiana com as atividades e processos desempenhados pelos micro-organismos e pela microbiota do solo, com os micro-organismos tendo destaque na ciclagem de nutrientes, de composição da matéria e na produção de compostos que auxiliam em processos de agregação do solo (Sheoran, Sheoran, & Poonia, 2010). Deste modo, a quantificação da biomassa microbiana presente no solo pode ser utilizada como um indicador do funcionamento dos ecossistemas permitindo, até mesmo, a avaliação de possíveis distúrbios causados por eventos naturais ou ações antrópicas (Bastida *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2009).

## 7. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS MICROBIANAS NO SOLO

Enzimas desempenham papel-chave em diversos processos biológicos que são desempenhados pelos micro-organismos do solo. Processos como a mineralização, a decomposição da matéria orgânica, a fixação biológica de nitrogênio e a ciclagem de nutrientes necessitam da atividade enzimática dos micro-organismos para ocorrer. Deste modo, as atividades enzimáticas verificadas no solo são relacionadas à presença dos micro-organismos e ao funcionamento dos serviços ecossistêmicos (Li *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015).

A análise das atividades de determinadas enzimas no solo tem sido utilizada como indicador das atividades do solo e de perturbações no ambiente, bem como no monitoramento da recuperação de ambientes naturais por sua elevada sensibilidade, relativa simplicidade e rapidez nos experimentos a serem realizados (Gianfreda, 2015; Li *et al.*, 2015). A avaliação das atividades enzimáticas faz parte de programas de monitoramento do solo de diversos países como principal indicador de saúde e qualidade

(Nielsen & Winding, 2002). A relação de algumas enzimas com a ciclagem de nutrientes também traz informações importantes na avaliação de indicadores do desempenho das funções dos ecossistemas presentes no solo. A atividade da aril-sulfatase é correlacionada com a ciclagem de enxofre, e a desidrogenase está diretamente relacionada à atividade metabólica da microbiota heterotrófica (Araújo & Monteiro, 2007). Beta glicosidase e fosfomonoesterases (conhecidas genericamente como fosfatases) são as principais enzimas avaliadas em áreas possivelmente degradadas. A primeira delas atua na fase final da degradação da celulose em energia, já as fosfatases ácida e alcalina atuam na conversão do fósforo orgânico em fosforo inorgânico e são produzidas por grupos de bactérias e fungos, respectivamente, fornecendo um diagnóstico da ciclagem de nutrientes pela atividade microbiana no solo (Nannipieri *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

Em áreas em recuperação sob revegetação, a avaliação da atividade enzimática é utilizada para a mensuração do impacto e também na avaliação da recuperação. Quadros *et al.* (2016) avaliaram a atividade enzimática de desidrogenase e beta-glicosidase e verificaram que solos em recuperação após atividade mineradora apresentaram menor atividade das referidas enzimas e que programas de revegetação implementados nas mesmas regiões aumentaram a atividade dessas enzimas ao longo do tempo. Outro trabalho realizado por LI *et al.* (2016) avaliou a perda de funções do solo pela alteração da diversidade microbiana e usou as atividades das fosfomonoesterases ácida e alcalina como indicadores do funcionamento dos ecossistemas e das funções do solo (Smith *et al.*, 2015).

## **8. DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADOR BIOLÓGICO**

A diversidade microbiana tem sido objeto de discussão como indicador nos últimos anos, principalmente pelo advento das técnicas moleculares que ampliaram o acesso a diversidade e possibilitaram novas formas de cultivo dos micro-organismos (Stefani *et al.*, 2015). Uma das principais vantagens da utilização da diversidade está no fato de micro-organismos serem sensíveis às mudanças ambientais, dependendo mais das características do habitat que das condições sazonais. Estudos prévios correlacionam a perda de diversidade microbiana à perda de funções do solo e serviços ambientais (Philippot *et al.*, 2013).

A contagem em meio seletivo para determinados grupos comparando áreas controle com áreas de estudo é prática consolidada e recorrente no estudo de áreas

degradadas e como indicador da qualidade do solo, sendo utilizada pela facilidade, rapidez e custo mais baixo (Santos *et al.*, 2013, 2016; Segura *et al.*, 2016). No entanto, nesse caso não se pode falar em diversidade, termo que em diversos trabalhos é erroneamente citado em referência a estes estudos de plaqueamento, já que o próprio meio seleciona e, sem identificação, esse micro-organismos passam a ser considerados de maneira homogênea de determinado grupo (Hughes *et al.*, 2016).

Outras técnicas que também comparam perfis e quantificam micro-organismos, são o DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante), PCR-RFLP (Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição), ARDRA (Análise da restrição de DNA ribossomal amplificado), PCR em Tempo Real, Biolog, além das abordagens metagenômicas como o sequenciamento de genes marcados (como o 16 S) e o sequenciamento total *Shotgun*. Essas últimas fornecendo dados de diversidade mais robustos que as demais já que indicam riqueza e abundância (Maron *et al.*, 2011; Sultana *et al.*, 2013; Birtel *et al.*, 2015).

Assim como outros indicadores biológicos, a diversidade possui certas limitações e observações, valores altos ou baixos dos índices ecológicos podem representar tanto um alto grau de perturbação quanto de conservação em determinado ambiente. Estudos prévios em áreas degradadas e em locais com atividade mineração em diversas partes do mundo, mostraram uma clara redução da diversidade de micro-organismos nas áreas mineradas e posterior aumento da mesma após programas de recuperação. Já no estudo do gradiente de transformações da floresta em pastagem na região amazônica, a diversidade das áreas degradadas é superior ao das áreas florestais de controle (Navarrete *et al.*, 2013, 2015; Mendes *et al.*, 2015).

Portanto, o uso de índices de diversidade como indicador da saúde dos solos deve ser contextualizado com outros parâmetros como histórico de transformações da área, parâmetros físico-químicos e outros indicadores para uma análise mais robusta do funcionamento do solo em áreas de interesse. Além disso, recomenda-se também a avaliação da diversidade beta, que compara a aproximação entre diferentes regiões e o uso de uma região controle não perturbada (Louis *et al.*, 2016).

Também vale destacar destacam que o grupo dos procariotos são mais sensíveis às mudanças ambientais, destacando-se frente aos fungos, pelas diversas estratégias nutricionais e maior dependência das condições ambientais, fazendo com que a estrutura

de suas comunidades reflita alterações no ambiente com maior rapidez (Maron *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015).

## 9. DIVERSIDADE MICROBIANA EM AMOSTRA AMBIENTAIS

O conhecimento da comunidade microbiana e de seu papel, sempre foram desafios para a microbiologia. Entretanto, a complexidade de ambientes naturais, tanto quanto o avanço das técnicas de biologia molecular e as conclusões de Carl Woese sobre o uso de marcadores RNA ribossomal para classificar a vida, mostraram que até mesmo a tarefa de identificar se mostraria altamente improvável pelos métodos dependentes de cultivos. Acredita-se que apenas de 0,1% a 1% dos micro-organismos existentes no solo teriam sido previamente isolados e identificados (Torsvik *et al.*, 1990; Alain & Querellou, 2009; Maron *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2013). No ano de 2003, o cientista americano Craig Venter, abriu novas possibilidades no estudo da ecologia microbiana ao utilizar sequenciadores para a análise de amostras ambientais do mar do Sargaço, dando um incremento nos estudos de metagenômica (Kumar *et al.*, 2015; Lam *et al.*, 2015).

Pode-se definir metagenômica como o estudo do material genético proveniente diretamente de amostras ambientais. Essa nova área de pesquisa permitiu, a partir do material genético, o acesso à identidade e função dos micro-organismos acessados em diversos ambientes, incluindo inexplorados, possibilitando a descoberta de novos micro-organismos e funções microbianas. Esse estudo, pode ser abordado com o sequenciamento do tipo *shotgun*, ou total, que avalia além da taxonomia as funções ambientais potenciais das amostras e as abordagens baseadas em amplificação de genes marcados (amplicons ou *Gene Survey*), como o RNA ribossomal (rRNA). Estas últimas ainda dominam o número de estudos, pelo custo relativamente mais baixo, inferindo taxonomia e abundância de um gene previamente selecionado (Sharpton, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Sinclair *et al.*, 2015).

Todo o desenvolvimento da ecologia microbiana, trazido pela metagenômica se deveu aos avanços das técnicas de sequenciamento de DNA, que passaram pelo sequenciamento de molécula única até o sequenciamento massivo em paralelo. Conhecido também como sequenciamento de nova geração (com sigla NGS, do inglês *Next Generation Sequencer*), essa tecnologia e seu constante aprimoramento permitiu

uma ampliação no número de estudos, redução de tempo de sequenciamento, do custo por base sequenciada e a abertura de novas possibilidades de análise (Caporaso *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Sinclair *et al.*, 2015).

Atualmente, existem quatro gerações de sequenciadores, que estão sendo utilizadas com diversos objetivos. Na primeira geração, os sequenciadores de molécula única baseados no método de Sanger (Applied Biosystem), a segunda geração já baseada no sequenciamento massivo em paralelo, baseado em sinais em emissão de luz, como os sequenciadores 454 e 454 Júnior (Roche), Illumina (Illumina), além do método SoliD (Applied Biosystem). A terceira geração de sequenciadores, que conta com sequenciamento massivo em paralelo de molécula única, cujos representantes são o HeliScope e o Pacific Biosciences SMRT (conhecido como PacBio), ambos com o diferencial de gerar “reads” mais longas. A quarta geração de sequenciadores, conta os sequenciadores íon-Torrent (Life-Technologies), baseado em alterações do pH e o sequenciador Nanopore (Oxford Nanopore Technologies), baseado em mudanças na corrente elétrica em poros biológicos de proteínas.

Para a maioria dos estudos de metagenômica são utilizados os sequenciadores de *High-throughput* de segunda geração como o Illumina (Illumina) e 454 (Roche). Estes equipamentos permitem sequenciar amostras complexas em pouco tempo e baixo custo (Caporaso *et al.*, 2012; Ju & Zhang, 2015). A partir dos dados do sequenciamento, estudos de identificação e quantificação das sequências podem ser “lidas” pela ecologia como “riqueza”, e “abundância” de grupos microbianos e podem ser utilizadas para estimar a diversidade de micro-organismos em amostras ambientais (Kaden and Krolla-Sidenstein, 2015).

Como a quantidade de dados gerada pelo sequenciamento de amostras ambientais é bastante significativo, diversas plataformas são utilizadas para processamento desses dados, como por exemplo Mothur (<http://www.mothur.org>), Qiime (<http://qiime.org>, Quantitative Insights Into Microbial Ecology), MG-RAST, *MetaGenome Rapid Annotation using Subsystem Technology* (<http://metagenomics.anl.gov/>) e RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>), Ribossomal Database Project, além de outras (Kim *et al.*, 2013; Nilakanta *et al.*, 2014; Lam *et al.*, 2015).

O tratamento dos dados é muitas vezes definido pelo pesquisador, o que pode gerar outra grande variação nos dados obtidos. Assim frente a essa questão, diversos

guias de utilização (*pipelines*) são desenvolvidos para guiar as análises de bioinformática (Kim *et al.*, 2013; Plummer & Twin, 2015), como por exemplo o *Brazilian Microbiome Project* (Pylro *et al.*, 2014), que utiliza a plataforma Qiime.

## 10. ÍNDICES DE DIVERSIDADE APLICADOS ÀS COMUNIDADES MICROBIANAS

A diversidade microbiana, que pode ser estimada através de índices matemáticos, como Shannon-Wave, ACE, Simpson ou Chao-1, é importante tema de estudo em ecologia. O uso desses índices matemáticos embora tenham limitações e restrições são amplamente utilizados e seu uso é reiteradamente consolidado por vários trabalhos, já que podem apontar tendências na ecologia das comunidades microbianas de maneira rápida e sintetizar a interpretação de uma grande quantidade de dados proveniente dos mais variados ambientes (Kaden & Krolla-Sidenstein, 2015).

No entanto, a interpretação dos índices de diversidade e dos dados de sequenciamento requerem uma abordagem multifatorial, a depender do contexto local, da amostra sequenciada e sua amostragem, da extração do material genético e do tratamento realizado sob dados de bioinformática gerados (Plummer & Twin, 2015). Assim, é de grande importância contextualizar os resultados com outros dados, como análises físico-químicas e o contexto do local de onde se retirou a amostra analisada (Faoro *et al.*, 2010).

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alain, K. and Querellou, J. (2009) Cultivating the uncultured: Limits, advances and future challenges. *Extremophiles* **13**: 583–594.
- ANA, A.N. de águas (2016) Próton Doc N° 139/2016.
- Anderson, T.-H. and Domsch, K.H. (1993) The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil biology and biochemistry* **25**: 393–395.
- Anderson, T.H. (2003) Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **98**: 285–293.
- Araújo, A.S.F. and Monteiro, R.T.R. (2007) Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Biosci. J.* **23**: 66–75.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., and García, C. (2008) Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* **147**: 159–171.
- Bastos, A.C., Quaresma, V.S., Marangoni, M.B., D'Agostini, D.P., Bourguignon, S.N., Cetto, P.H., et al.

- (2015) Shelf morphology as an indicator of sedimentary regimes: A synthesis from a mixed siliciclastic-carbonate shelf on the eastern Brazilian margin. *Journal of South American Earth Sciences* **63**: 125–136.
- Birtel, J., Walser, J.-C., Pichon, S., Bürgmann, H., and Matthews, B. (2015) Estimating Bacterial Diversity for Ecological Studies: Methods, Metrics, and Assumptions. *Plos One* **10**: e0125356.
- Bowker, L.N. and Chambers, D.M. (2015) The risk, public liability & economics of tailings storage facility failures Montana, USA.
- Brasil (2015) Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W. a, Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* **6**: 1621–1624.
- Cardoso, E.J.B.N., Vasconcellos, R.L.F., Bini, D., Miyauchi, M.Y.H., Santos, C.A. dos, Alves, P.R.L., et al. (2013) Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Scientia Agricola* **70**: 274–289.
- CARVALHO, F. de (2005) Atributos Bioquímicos com Indicadores da Qualidade de Solo em Florestas de Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktze. No Estado de São Paulo. 79.
- Chaer, G.M., Myrold, D.D., and Bottomley, P.J. (2009) A soil quality index based on the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 822–830.
- Dickinson, N.M., Hartley, W., Uffindell, L.A., Plumb, A.N., Rawlinson, H., and Putwain, P. (2005) Robust biological descriptors of soil health for use in reclamation of brownfield land. *Land Contamination and Reclamation* **13**: 317–326.
- Ding, G.-C., Piceno, Y.M., Heuer, H., Weinert, N., Dohrmann, A.B., Carrillo, A., et al. (2013) Changes of Soil Bacterial Diversity as a Consequence of Agricultural Land Use in a Semi-Arid Ecosystem. *PLoS ONE* **8**: e59497.
- Faoro, H., Alves, A.C., Souza, E.M., Rigo, L.U., Cruz, L.M., Al-Janabi, S.M., et al. (2010) Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the southern brazilian atlantic forest. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4744–4749.
- Fernandes, G.W., Goulart, F.F., Ranieri, B.D., Coelho, M.S., Dales, K., Boesche, N., et al. (2016) Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação* **4**: 35–45.
- Filho, H.N., Luiza, M., Costa, S., Friede, R.R., Coordenador, U., Unig, U.I., et al. (2017) Responsabilidade civil por dano ambiental decorrente do rompimento das barragens do Fundão, em Mariana, Minas Gerais Civil liability for environmental damage caused by the disruption of the

Fundão dams in Mariana , Minas Gerais.

- Fragoso-Moura, E.N., Oporto, L.T., Maia-Barbosa, P.M., and Barbosa, F.A.R. (2016) Loss of biodiversity in a conservation unit of the Brazilian Atlantic Forest: the effect of introducing non-native fish species. *Brazilian Journal of Biology* **76**: 0–0.
- FundaçãoRenova (2017) No Title. *Socioambientais*.
- Garcia, L.C., Ribeiro, D.B., de Oliveira Roque, F., Ochoa-Quintero, J.M., and Laurance, W.F. (2016) Brazil's worst mining disaster: Corporations must be compelled to pay the actual environmental costs. *Ecological Applications* **27**: 5–9.
- Gianfreda, L. (2015) Enzymes of importance to rhizosphere processes. *Journal of soil science and plant nutrition* **104**: 0–0.
- Guedes, G.R., Simão, A.B., Dias, C.A., and Braga, E. de O. (2015) Risk of contamination from exposure to Rio Doce water: a case study on the population's perceptions in Tumiritinga, Minas Gerais State, Brazil. *Cadernos de saúde pública* **31**: 1257–68.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., Bohannan, B.J.M., Sinclair, L., Osman, O.A., et al. (2016) Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity  
MINIREVIEW Counting the Uncountable : Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and environmental microbiology* **10**: 4399–4406.
- Ju, F. and Zhang, T. (2015) 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 4119–4129.
- Kaden, R. and Krolla-Sidenstein, P. (2015) How to Show the Real Microbial Biodiversity? A Comparison of Seven DNA Extraction Methods for Bacterial Population Analyses in Matrices Containing Highly Charged Natural Nanoparticles. *Microorganisms* **3**: 695–706.
- Kim, M., Lee, K.-H., Yoon, S.-W., Kim, B.-S., Chun, J., and Yi, H. (2013) Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era. *Genomics & Informatics* **11**: 102.
- Kirchherr, J. and Charles, K.J. (2016) The social impacts of dams: A new framework for scholarly analysis. *Environmental Impact Assessment Review* **60**: 99–114.
- Kumar, S., Krishnani, K.K., Bhushan, B., and Brahmane, M.P. (2015) Metagenomics: Retrospect and Prospects in High Throughput Age. *Biotechnology research international* **2015**: 121735.
- Labonne, B. (2016) Mining dam failure: Business as usual? *Extractive Industries and Society* **3**: 651–652.
- Lam, K.N., Cheng, J., Engel, K., Neufeld, J.D., and Charles, T.C. (2015) Current and future resources for functional metagenomics. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–8.
- Li, J., Zhou, X., Yan, J., Li, H., and He, J. (2015) Effects of regenerating vegetation on soil enzyme activity and microbial structure in reclaimed soils on a surface coal mine site. *Applied Soil Ecology*

87: 56–62.

- Li, Y., Jia, Z., Sun, Q., Zhan, J., Yang, Y., and Wang, D. (2016) Ecological restoration alters microbial communities in mine tailings profiles. *Scientific Reports* **6**: 25193.
- Li, Y., Wen, H., Chen, L., and 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**:
- Louis, B.P., Maron, P.-A., Menasseri-Aubry, S., Sarr, A., Lévêque, J., Mathieu, O., et al. (2016) Microbial Diversity Indexes Can Explain Soil Carbon Dynamics as a Function of Carbon Source. *Plos One* **11**: e0161251.
- Maron, P.A., Mougel, C., and Ranjard, L. (2011) Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus - Biologies* **334**: 403–411.
- Marta-Almeida, M., Mendes, R., Amorim, F.N., Cirano, M., and Dias, J.M. (2016) Fundao Dam collapse: Oceanic dispersion of River Doce after the greatest Brazilian environmental accident. *Marine Pollution Bulletin* **112**: 359–364.
- Mendes, I.C., Hungria, M., dos Reis Junior, F.B., Fernandes, M.F., Chaer, G.M., Mercante, F.M., and Zilli (2009) Bioindicadores para Avaliação da Qualidade dos Solos Tropicais: utopia ou realidade? *Documentos*, **246** **1**: 32.
- Mendes, L.W., Tsai, S.M., Navarrete, A.A., de Hollander, M., van Veen, J.A., and Kuramae, E.E. (2015) Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. *Microbial Ecology* **70**: 255–265.
- Miranda, L.S. and Marques, A.C. (2016) Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna – an example from the staurozoans (Cnidaria). *Biota Neotropica* **16**: 1–3.
- Mukherjee, A. and Lal, R. (2014) Comparison of soil quality index using three methods. *PLoS ONE* **9**:
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., and Renella, G. (2011) Phosphorus in Action. *Soil Biology* **26**: 215–243.
- Navarrete, A.A., Kuramae, E.E., de Hollander, M., Pijl, A.S., van Veen, J.A., and Tsai, S.M. (2013) Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. *FEMS Microbiology Ecology* **83**: 607–621.
- Navarrete, A.A., Venturini, A.M., Meyer, K.M., Klein, A.M., Tiedje, J.M., Brendan, B.J., et al. (2015) Differential response of Acidobacteria subgroups to forest-to-pasture conversion and their biogeographic patterns in the western Brazilian Amazon. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–10.
- Nielsen, M.N. and Winding, A. (2002) Microorganisms as indicators of soil health.
- Nilakanta, H., Drews, K.L., Firrell, S., Foulkes, M.A., and Jablonski, K.A. (2014) A review of software for analyzing molecular sequences. *BMC Research Notes* **7**: 830.

- Paz-Ferreiro, J. and Fu, S. (2016) Biological Indices for Soil Quality Evaluation: Perspectives and Limitations. *Land Degradation and Development* **27**: 14–25.
- Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C.M., et al. (2013) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal* **7**: 1609–1619.
- Pires, J.M.M., Lena, J.C. de, Machado, C.C., and Pereira, R.S. (2003) Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco Mineração: Estudo de caso da barragem de Germano. *Revista Árvore* **27**: 393–397.
- Plummer, E. and Twin, J. (2015) A Comparison of Three Bioinformatics Pipelines for the Analysis of Preterm Gut Microbiota using 16S rRNA Gene Sequencing Data. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* **8**: 283–291.
- Porto, M.F. de S. (2016) A tragédia da mineração e do desenvolvimento no Brasil : desafios para a saúde coletiva The tragedy of mining and development in Brazil : public health challenges La tragedia de la minería y el desarrollo en Brasil : desafíos para la salud colectiva. **32**: 1–3.
- Pôrto, M.L., Alves, J.C., Diniz, A.A., de Souza, A.P., and Santos, D. (2009) Indicadores biológicos de qualidade do solo em diferentes sistemas de uso no brejo paraibano. *Ciencia e Agrotecnologia* **33**: 1011–1017.
- Pyro, V.S., Fernando, L., Roesch, W., Ortega, J.M., Morais, A., Tótola, M.R., et al. (2014) Brazilian Microbiome Project : Revealing the Unexplored Microbial Diversity — Challenges and Prospects. *Microbial Biotechnology* 237–241.
- Quadros, P.D. de, Zhalnina, K., Davis-Richardson, A.G., Drew, J.C., Menezes, F.B., Camargo, F.A. de O., and Triplett, E.W. (2016) Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied Soil Ecology* **98**: 195–203.
- Samarco (2016) UM ANO DO ROMPIMENTO DE FUNDÃO. 37.
- Santos, J.V. dos, De Melo Rangel, W., Azarias Guimarães, A., Duque Jaramillo, P.M., Rufini, M., Marra, L.M., et al. (2013) Soil biological attributes in arsenic-contaminated gold mining sites after revegetation. *Ecotoxicology* **22**: 1526–1537.
- Santos, J.V. dos, Varónn-López, M., Fonsêca Sousa Soares, C.R., Lopes Leal, P., Siqueira, J.O., and de Souza Moreira, F.M. (2016) Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 6735–6748.
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G. ??bida L., et al. (2016) Potential risks of the residue from Samarco’s mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution* **218**: 813–825.
- Sharpton, T.J. (2014) An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in plant science* **5**: 209.

- Sheoran, V., Sheoran, A.S., and Poonia, P. (2010) Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation : A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water* **3**: 1–21.
- Sinclair, L., Osman, O.A., Bertilsson, S., and Eiler, A. (2015) Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. *PLoS ONE* **10**: 1–18.
- Smith, A.P., Marín-Spiotta, E., and Balsler, T. (2015) Successional and seasonal variations in soil and litter microbial community structure and function during tropical postagricultural forest regeneration: A multiyear study. *Global Change Biology* **21**: 3532–3547.
- Stefani, F.O.P., Bell, T.H., Marchand, C., De La Providencia, I.E., El Yassimi, A., St-Arnaud, M., and Hijri, M. (2015) Culture-dependent and -independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. *PLoS ONE* **10**: 1–16.
- Sultana, H., Neelakanta, G., and Sultana, H. (2013) The Use of Metagenomic Approaches to Analyze Changes in Microbial Communities. *Microbiology Insights* **37**.
- Świeciło, A. and Zych-Wezyk, I. (2013) Bacterial stress response as an adaptation to life in a soil environment. *Polish Journal of Environmental Studies* **22**: 1577–1587.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 782–787.
- Wall, D.H., Nielsen, U.N., and Six, J. (2015) Perspective Soil biodiversity and human health. *Nature* **528**: 69–76.
- Zhang, L., Chen, W., Burger, M., Yang, L., Gong, P., and Wu, Z. (2015) Changes in soil carbon and enzyme activity as a result of different long-term fertilization regimes in a greenhouse field. *PLoS ONE* **10**: 1–13.

## Capítulo 2

# **RESPOSTA DA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO AO DESASTRE AMBIENTAL DE REJEITOS DE MINERAÇÃO E À REVEGETAÇÃO EM MARIANA-MG, BRASIL.**

João Paulo Campos Moura Cavalcante<sup>1</sup>; Helena Santiago Lima<sup>1</sup>; Livia Carneiro Fidelis Silva<sup>1</sup>; Marliane de Cássia Soares da Silva<sup>2</sup>; Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>2</sup>; Marcos Rogério Tótola<sup>3</sup>, Cynthia Canêdo da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária /BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Associações Micorrízicas, Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária / BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o meio ambiente, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## **ABSTRACT**

The environmental disaster caused for the breaking of the ore mine tailings dam spread approximately 33 million m<sup>3</sup> of tailings in the Rio Doce Basin, southeast of Brazil, and Atlantic Ocean. After this, a revegetation program was started under soils with tailings for avoid more carrying for riverbed. Microorganisms develop key roles in ecosystem roles and in the recovery of soil beyond and they are very sensitive to environmental changes. We evaluated how the bacterial diversity, community structure and soil chemical features were changed with the environmental disaster and then with two and nine months after the revegetation program start. The sequencing of 16S rRNA showed strong changes in soil bacterial community structure with enhance of diversity indexes for affected areas, high abundance of Proteobacteria and Actinobacteria at revegetation sites and strong reduction of abundance of oligotrophic groups. The soil presented alkaline pH, low organic matter, low concentration of metals, except iron and manganese. The soil pH shows alkaline trends, low organic matter, low concentration of some metal, except iron and manganese. A successional microbial process can be observed in the region with the result of revegetation. We conclude that chemical characteristics, community structure and bacterial diversity of the soil were changed by the environmental disaster and the revegetation program is favouring the establishment of bacterial community of affected soils.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biomarcadores; Samarco; diversidade bacteriana, gene RNAr 16S; mineração.

---

Autor correspondente: Cynthia Canêdo da Silva, Laboratório de Genética molecular de Bactérias, Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil. E-mail: ccanedo@ufv.br

## **INTRODUÇÃO**

Nos últimos 100 anos, o rompimento de barragens de rejeitos de mineração tem ocasionado desastres ambientais em diversas partes do mundo resultando também impactos econômicos e sociais. Entretanto, nenhum deles, teve o mesmo volume e dispersão em área que o rompimento ocorrido em novembro de 2015 no sudeste do Brasil, no qual 33 milhões de rejeitos de mineração de ferro foram lançados a bacia hidrográfica do Rio Doce (Bowker and Chambers, 2015). A onda de rejeitos, liberada após o rompimento da barragem de Fundão em Mariana, Minas Gerais, percorreu mais de 600 Km até alcançar o oceano Atlântico, espalhando-se por mais milhares de Km<sup>2</sup> (Marta-Almeida *et al.*, 2016; Samarco, 2016). Ao longo desse percurso três vilarejos foram destruídos, 19 pessoas foram mortas, solos e a água dos Rios Gualaxo do Norte, Rio do Carmo e Rio Doce, foram contaminadas, assim como águas subterrâneas e de ecossistemas marinhos e estuarinos (Gomes *et al.*, 2017). O nível de turbidez dos rios foi dramaticamente aumentado, quase 2.000 ha de vegetação natural foram removidos, o leito do rio foi destruído em algumas regiões e milhões de animais foram mortos além da geomorfologia da região que foi alterada (Brasil, 2015; Garcia *et al.*, 2016).

A maior parte dos rejeitos lançados na bacia, quase 80 %, foi depositado nos primeiros 100 Km sob o solo, no leito dos rios ou retida na Usina hidroelétrica Risoleta Neves, também conhecida como Candonga (Samarco, 2016). Para evitar um maior carreamento dos rejeitos depositados sob o solo para o leito dos rios e já compensar o dano ambiental causado, ações foram tomadas incluindo um programa de revegetação combinado com técnicas de bioengenharia e avaliações do impacto às comunidades vegetal e animal, além da química do solo. Entretanto, até o momento, pouca importância foi dada aos micro-organismos ou ao funcionamento dos ecossistemas do solo nas áreas afetadas (Fernandes *et al.*, 2016; Samarco, 2016; Segura *et al.*, 2016).

O solo é a base de todos os ecossistemas, tendo os micro-organismos atuação chave no seu funcionamento, como na ciclagem de nutrientes, associações biológicas e no desempenho de serviços ambientais, especialmente necessários após perturbações antrópicas. Estudos em diferentes áreas, baseados em cronosequências, mostraram que locais afetados por atividades da mineração mostraram redução da diversidade microbiana, da riqueza de espécies e de indicadores biológicos do solo como atividades enzimáticas (Li *et al.*, 2015; Quadros *et al.*, 2016). A perda da diversidade microbiana está relacionada com a perda de algumas funções ecológicas específicas que podem pôr em risco todo o processo de recuperação dos ambientes degradados pelo desastre (Philippot *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2016).

Neste estudo, nossa hipótese é que a composição da comunidade e a diversidade bacteriana, além das características químicas do solo foram alteradas pelos rejeitos liberados e que a revegetação, mesmo em curto prazo, altera a composição bacteriana do solo. O objetivo desse trabalho foi analisar o comportamento da comunidade bacteriana frente às mudanças das características químicas e programas de revegetação em áreas afetadas do distrito de Paracatu de Baixo, pertencente à Mariana localizada na bacia do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. Para isso, foi empregado o sequenciamento do gene RNAr 16S e análises químicas do solo para avaliar áreas afetadas pelo rejeito de mineração com ou sem programas de revegetação em curso, com dois e 8 meses após o início da revegetação, além de área adjacente não afetada que foi utilizada como controle.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo**

Amostras de solo foram coletadas próximas ao distrito de Paracatu de Baixo (20°18'15" Sul e 43°13'51" Oeste), no município de Mariana, na região central do estado de Minas Gerais (MG), aproximadamente 50 Km distante da barragem de rejeitos de Fundão. Esse distrito foi o segundo atingido pela onda de rejeitos de mineração de ferro e foi totalmente destruído. De acordo com a classificação climática de Koppen-geiger a região é Cwa, com clima mesotérmico com estação chuvosa no verão com temperaturas elevadas. A média da temperatura anual é 20,4° e a média anual de chuvas é 1307 mm. O inverno é a estação seca e vai de junho até setembro, e o verão que concentra a maior parte das chuvas e vai de dezembro a março (Peel *et al.*, 2006; Reboita *et al.*, 2016).

Três áreas foram escolhidas para a amostragem, uma área afetada pelos rejeitos sem programa de revegetação em curso (REC1) e duas diferentes áreas com programas de revegetação em andamento (REC2 e REC3). Uma área adjacente e não afetada pelos rejeitos de mineração foi escolhida como controle, contendo vegetação natural da mata atlântica (UND). Na segunda amostragem na mesma região, o crescimento de plantas foi observado sob a área REC1. Nós acreditamos que provavelmente sementes foram espalhadas a partir da área controle e das áreas de revegetação próximas.

Nas áreas REC2 e REC3, há um programa de revegetação em andamento desde janeiro de 2016. Esse programa é composto por espécies de leguminosas e gramíneas que identificamos como *Canavalia ensiformis*, *Stylosanthes spp.*, *Glycine wightii*, *Crotalaria spp.*, *Calopogonio mucunoides*, *Mucuna pruriens*, *Avena spp.*, *Vicia sativa*, *Sorghum bicolor*, *Lolium multiflorum*, *Panicum notatum*, *Raphanus sativus*, *Pennisetum glaucum*, *Cajanus cajan* and *Mucuna aterrina* (Agroflor, 2016). Em todas as áreas afetadas (REC1, REC2, REC3) sedimentos de mineração depositados no solo após o desastre foram parcialmente removidos, com o restante permanecendo misturado e sob o solo.

### **Amostragem**

A amostragem foi realizada nos meses de março e setembro de 2016, quarto e dez meses após o desastre. No final do verão e final do inverno respectivamente. Os pontos de coleta foram aleatoriamente selecionados e marcados através de aparelho GPS (Garmim, apêndice Tabela S2). Três amostras compostas foram coletadas em cada área, cada uma delas formada por cinco amostras simples em uma área de 3 m<sup>2</sup> e a profundidade de 0 a 15 cm com aproximadamente 1 Kg. As amostras foram estocadas em sacos plásticos e transportadas sob refrigeração, onde foram peneiradas (>2 mm) e estocadas a 10° para análises químicas e a -20° C para análises moleculares.

### **Análises químicas**

Foram analisadas as características químicas de todas as amostras. O pH foi determinado em água (relação 1:2,5 w/v) com o auxílio de um potenciômetro. Potássio (K) e fósforo (P) foram extraídos por solução bi-ácida composta por ácido sulfúrico e ácido hidro clorídrico e determinadas por fotometria de chama. Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Alumínio (Al) foram extraídos com uma solução neutra de cloreto de potássio (KCl, 1 mol L<sup>-1</sup>), e o primeiro e o segundo foram medidos com espectrofotometria de absorção atômica (Varian) com a adição de cloreto de estrôncio a 0,05, já o alumínio foi medido por titulação com hidróxido de sódio. A acidez potencial (H + Al) foi extraída

utilizando solução neutra de acetato de cálcio (1 N) por titulação e hidróxido de sódio (NaOH). A saturação de bases (V), capacidade de troca catiônica (CEC) e a soma de bases (SB) foram calculadas. A matéria orgânica (M.O) foi analisada através do método colorimétrico e oxidação e a medição do carbono orgânico foi obtida pela aproximação  $C.O = M.O/1,724$ . As concentrações de ferro, manganês, cobre e zinco foram obtidas através do extrator Mehlich-I (Defelipo & Ribeiro, 1981).

### **Extração de DNA total do solo**

O DNA total foi extraído a partir de 0,5 g de cada mostra de solo usando o Kit *Nucleospin Soil* (Macherey-Nagel Laboratories, Germany), de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram checadas através de eletroforese em gel de agarose com concentração de 1 %, corado com Brometo de Etídio visualizado em transiluminador (Applied Biosystems, USA) e quantificado em *Nanodrop* (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA).

A região V4 do gene RNAr procarioto foi marcada e amplificada com o conjunto de primers 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') propostos originalmente por Caporaso *et al.*, (2011, 2012) e modificados por Apprill *et al* (2015) e Parada *et al* (2016). Barcodes foram construídos por Walters *et al* (2015) e foram adicionados aos primers *forward* de acordo com as recomendações da plataforma Illumina. A reação de PCR foi realizada em 25.0 µL contendo PCR-grade 13,0 µL, água ultra-pura, 10,0 µL PCR *master mix* – (Platinum Hot Start PCR Master Mix (2X), Thermo Fisher, USA), 10 µM de cada primer, e 50ng DNA. O conjunto de reações foi submetido as seguintes condições 94 °C por 3 min; 35 Ciclos a 94 °C por 1 min; 35 ciclos a 50 °C for 1 min; 35 ciclos de 72 °C por 105 s; 72 °C por 10 min e 4 °C. Amostras amplificadas foram feitas em triplicata e misturadas em um único volume. Amplicons foram quantificados com o Kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay* (ThermoFisher/ Invitrogen cat. no. P11496) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR foram sequenciados na plataforma sequenciadora Illumina MiSeq (Illumina Inc, USA) na Argonne National Laboratory (Chicago, USA). As seqüências foram depositadas e estão disponíveis no MG-RAST, *Metagenomic Rapid annotation using Subsystem Technology* (<http://metagenomics.anl.gov/>), sob o registro: Projeto RD BASIN.

### **Análises de bioinformática e estatística**

As análises de bioinformática, para o sequenciamento da região do gene RNAr 16S, foram realizadas seguindo a pipeline padrão do *Brazilian Microbiome Project/BMP* (Pylro *et al.*, 2014) que utiliza uma combinação de uma série de outros softwares e pipelines para a análise. O processo inicial de montagem e remoção de adaptadores, demultiplexação, atribuição de taxonomia e alinhamento de sequências foram realizados através da plataforma *Qiime* (Quantitative Insight in Microbial Ecology) versão 1.8 (Caporaso, Kuczynski, *et al.*, 2011). Foram aplicados os seguintes filtros de qualidade: notas mínimas PHred index = 25, nenhum mismatch foi permitido, sequências foram permitidas com tamanhos entre 200 a 1000 bp e sigletons descartados. Sequências truncadas ou leituras menores que 240 bp foram descartadas. Sequências aprovadas nesses filtros de qualidade e com mais de 97 % de similaridade foram consideradas a mesma unidade taxonômica operacional (OTU) para UPARSE v.7.1 (Edgar, 2013). Sequências quiméricas foram removidas com UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). Análise taxonômica foi assignada usando o método UCLUST (Edgar, 2010) contra a base de dados de referência SILVA Versão 128 (Quast *et al.*, 2013).

A partir da abundância relativa a nível de filo, 80 % de similaridade genética para cada região, foi realizada uma análise de variância (Two-way ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, tendo como variáveis, área estudada versus coleta realizada. Para avaliar a dinâmica do perfil da comunidade ao longo do tempo para os principais grupos bacterianos. Foi também realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) entre as áreas, os filos mais abundantes e os atributos físicos e químicos

O nível taxonômico de OTU, 97 % de similaridade para a sequência de nucleotídeos, foi utilizado para o cálculo dos índices de diversidade biológica. Alfa diversidade foi avaliada através dos índices de diversidade de Shannon-Weaver e Simpson, estimador de riqueza de Chao-1, índice de cobertura de Good e curvas de rarefação através do *software* R utilizando o pacote *Vegan* (Oksanen *et al.*, 2015). Beta diversidade, foi avaliada do cálculo de similaridade a nível de OTU (Unidades Taxonômicas Operacionais) com 97 % de identidade nucleotídica, através da distância Unifrac e representado em dendrograma gerado pelo programa PAST.

Análises de variância foram realizadas no *software* SISVAR (Ferreira *et al.*, 2011), correlação e análises multivariadas foram realizados no *software* PAST (Hammer *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

### Análises Químicas

Os resultados das análises químicas mostraram que a concentração de ferro nas áreas afetadas foi até 8 vezes maior que a área controle não afetada (UND). O pH das regiões afetadas foi em média 7,62, tendendo de neutro a alcalino, enquanto o da região controle apresentou média de 5,85, ácido. Na segunda coleta, a concentração de ferro medida diminuiu 66 %. Com relação a primeira, a concentração de ferro no solo entre as regiões afetadas foi reduzida em 48%. SB, m, V, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup> e H+Al tiveram suas concentrações fortemente reduzidas entre as áreas afetadas e as áreas controle, o que se manteve ao longo do tempo. A concentração de manganês também foi aumentada com relação ao controle analisado e diminuiu nas áreas afetadas após seis meses.

Em relação a matéria orgânica (M.O) e o carbono orgânico (C.O) a diferença entre as áreas afetadas e o controle manteve-se constante durante os 6 meses entre as coletas e foi em torno de 5 vezes maior nas áreas controle.

**Tabela 1.** Análises químicas dos solos, nas áreas afetadas com processo de revegetação (REC2 e REC3), sem revegetação (REC1) e área controle (UND) em Paracatu de Baixo, distrito de Mariana (MG)

Área	Coleta	pH	P	K	Na	S	B	Fe	Zn	Mn	Cu	
		-----mg/dm <sup>3</sup> -----										
UND	Março	6,30	10,17	127,67	5,00	26,90	0,70	18,90	4,60	90,90	0,30	
	Setembro	5,40	4,80	88,33	3,00	23,60	0,30	5,20	3,00	69,50	0,50	
REC1	Março	7,60	5,57	8,67	11,00	4,20	0,10	129,30	2,50	117,50	0,40	
	Setembro	8,00	7,77	62,67	46,00	42,60	0,00	110,40	0,60	134,00	0,90	
REC2	Março	7,20	26,80	19,67	30,00	37,80	0,10	142,50	0,90	192,20	0,80	
	Setembro	7,17	8,43	50,67	106,00	72,30	0,10	95,80	0,80	181,10	1,10	
REC3	Março	7,73	22,70	25,00	75,00	41,80	0,10	160,20	1,20	258,30	0,70	
	Setembro	8,03	8,67	48,67	340,00	88,80	0,00	85,40	0,60	195,50	1,40	
		SB	V	M	M.O	C.O	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Al <sup>+3</sup>	H+Al	CtC	
		-----%-----						-----cmol/ dm <sup>3</sup> -----				
UND	Março	8,57	8,63	1,67	7,20	4,17	6,57	1,67	0,07	5,56	11,73	
	Setembro	3,77	4,13	11,00	4,75	2,76	2,37	1,17	0,37	3,14	9,33	
REC1	Março	0,73	0,73	0,00	0,96	0,56	0,73	0,00	0,00	0,17	0,93	
	Setembro	1,60	1,60	0,00	0,99	0,57	1,40	0,03	0,00	0,17	1,77	
REC2	Março	1,10	1,10	0,00	1,15	0,67	0,97	0,07	0,00	0,17	1,23	
	Setembro	1,10	1,10	0,00	1,25	0,73	0,87	0,13	0,00	0,17	1,30	
REC3	Março	1,13	1,13	0,00	0,99	0,58	0,97	0,07	0,07	0,22	1,30	
	Setembro	1,30	1,30	0,00	1,08	0,63	1,13	0,03	0,00	0,17	1,47	

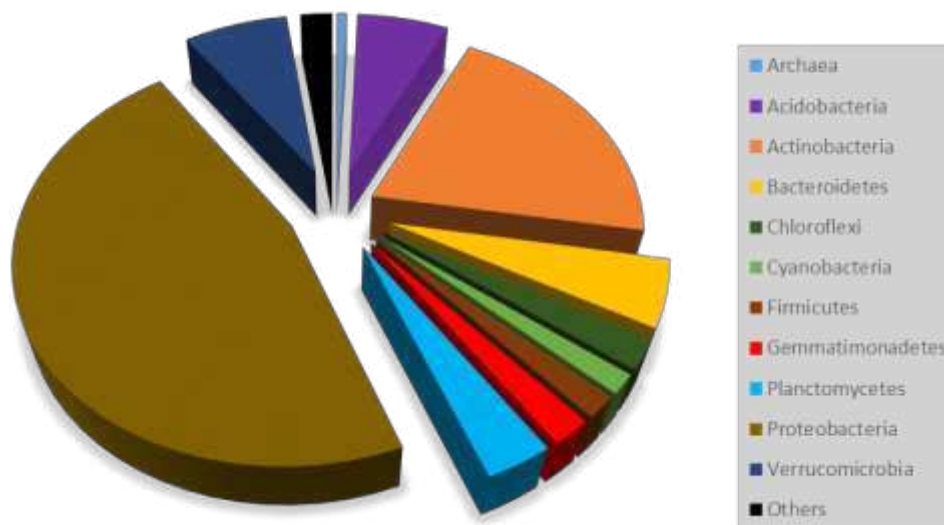
UND = Área controle, REC1 = área afetada sem programa de revegetação em curso, REC2 e REC3 = área afetada com programa de revegetação em curso. SB = soma de bases, V = Saturação de bases, CtC = Capacidade de troca catiônica, C.O. = Carbono orgânico, M.O. = Matéria orgânica.

## **Análise de diversidade**

Após as análises bioinformáticas das sequências, foram obtidas um total 492,811 sequências, 93 % filiadas ao domínio Bacteria, 0,7 % afiliadas ao Domínio Archaea. As 24 amostras compostas sequenciadas tiveram uma média de 20.533 sequências de tamanho aproximado de 240 pb. As curvas de rarefação, que mostram o esforço amostral em cada área, mostram-se ascendentes com tendência ao platô em alguns casos, a nível de OTU com 97% de similaridade (Figura S4, apêndice). As sequências foram anotadas como pertencentes a 41 filos, 38 deles bacterianos e 3 pertencentes a Archaea, 110 classes, 139 ordens, 274 famílias e 447 gêneros.

O número total de OTU a 97 % de similaridade foi de 1.395, em sua maioria pertencentes ao domínio Bacteria e outras 13 ao domínio Archaea. O filo Proteobacteria foi o mais abundante (46,1 %), seguido por Actinobacteria (20,2 %), Verrucomicrobia (7,3 %), Acidobacteria (6,5%), Bacteroidetes (5,1 %) Planctomycetes (3,40 %), Chloroflexi (2,36 %), Gemmatimonadetes (2 %), Firmicutes (1,71 %) e Cyanobacteria (1,53 %), Figura 1. As sequências afiliadas ao domínio Archaea representaram 0,7 % do total de leituras, sendo o filo mais predominante Euryarchaeota (0,52 %), seguido por Thaumarchaeota (0,18 %) e Bathyarchaeota, este último presente apenas na amostra REC1 da primeira coleta.

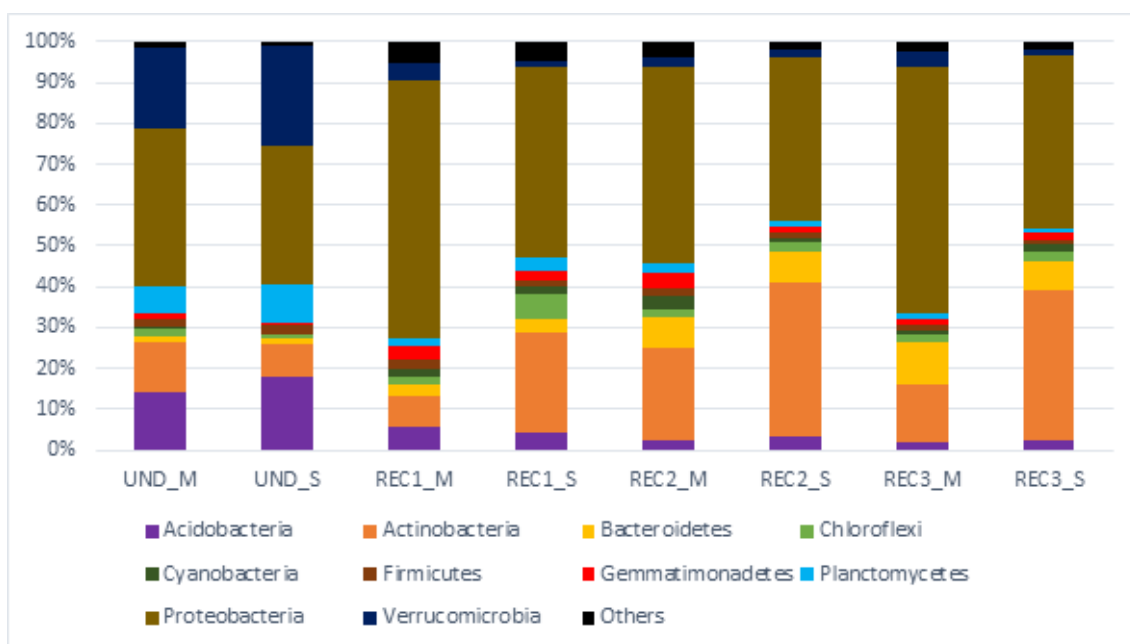
Em todas as amostras obtidas, com relação a abundância relativa, o filo Proteobacteria foi dominante com abundância relativa de 49,87 % nas áreas afetadas e 36,28 % na área utilizada como controle, em ambas as coletas (Figura 2). A abundância relativa do grupo Actinobacteria apresentou um aumento após seis meses nas áreas afetadas e foi de 14,25 % para 26,86 %. Entretanto, Proteobacteria apresentou um comportamento inverso após seis meses tendo a sua abundância relativa diminuída de 52,64 % para 40,71 % na média das áreas afetadas. A abundância relativa dos filos bacterianos na área controle permaneceu praticamente inalterada após 6 meses, com exceção do grupo Verrucomicrobia que apresentou um aumento significativo de 19,9 % em março para 24,2% em setembro (Tabela S3, apêndice). Nas áreas afetadas, em ambas coletas, o segundo e o terceiro grupos mais abundantes foram Actinobacteria e Bacterioidetes, enquanto nas áreas controle o segundo e terceiro grupos mais abundantes foram Verrucomicrobia e Acidobacteria.



**Figura 1.** Abundância relativa de filós bacterianos e do domínio Archaea em todas as áreas estudadas. Grupos aqui representados foram aqueles com abundância relativa maior que 1% dos reads totais e o domínio Archaea. Filós bacterianos cuja leitura de reads totais foi < 1% são representados conjuntamente no grupo artificial “Others”.

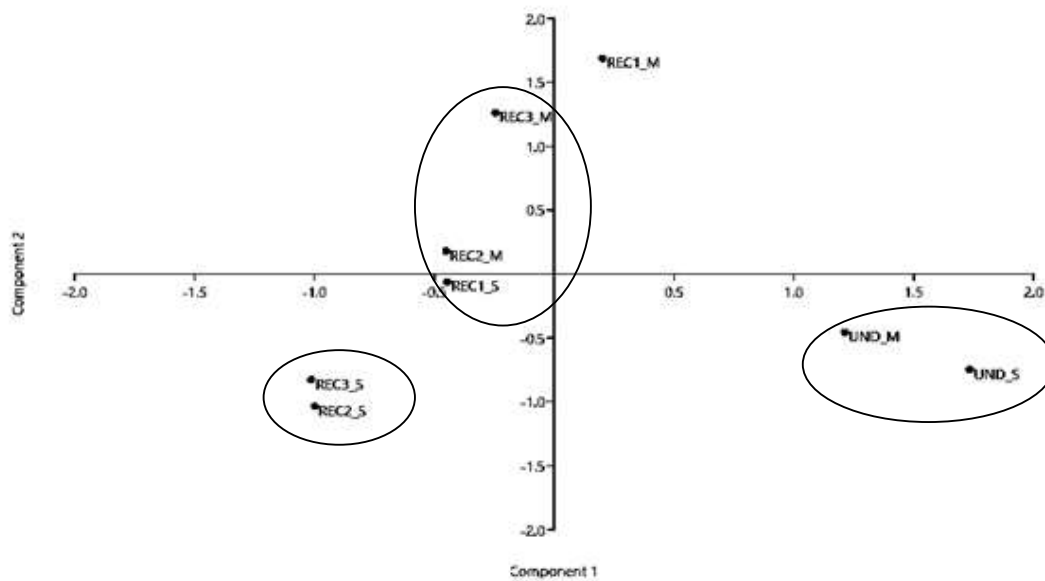
A estrutura da comunidade ao nível de filo, 80% de similaridade nucleotídica, tornou-se distinta entre as áreas afetadas e a área controle adjacente (Figura 2). Nas áreas afetadas e sem programa de revegetação em curso (REC1), apenas 3 filós bacterianos, (Proteobacteria, Actinobacteria e Chloroflexi) apresentaram valores maiores que 5% do total de seqüências afiliadas, nas áreas sob revegetação (REC2 e REC3) o mesmo número de filós superou o patamar, entretanto o terceiro mais abundante foi Bacteroidetes, e não Chloroflexi. Em contraste, nas áreas controle adjacentes, cinco grupos apresentaram mais de 5% das leituras, em ordem decrescente de abundância relativa, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Actinobacteria e Planctomycetes.

O teste de comparação de médias Tukey realizado mostrou, que não houve diferença entre a abundância relativa entre os filós em relação ao tempo na área controle UND, com exceção para o grupo Verrucomicrobia que teve sua abundância relativa aumentada nesta área. Esses resultados, sugerem que as mudanças observadas nas áreas estudadas ao longo do tempo são devidas principalmente ao impacto do desastre e ao efeito do programa de revegetação implantado nas regiões.



**Figura 2.** Gráficos de barra com média das abundâncias relativas (n=3) no nível de filo (80% similaridade), para cada área e coleta avaliadas. Legenda: UND = área controle, REC1 = área afetada sem programa oficial de revegetação, REC2 e REC3 = áreas afetadas sob revegetação. A terminação M ou S, referem-se à primeira e segunda coleta respectivamente. Grupos bacterianos cuja abundância relativa foi < 1% foram agrupados no grupo artificial “Others”.

A análise multivariada de Componentes Principais relacionando o nível de filo com áreas e características químicas de cada região mostrou os eixos PC1 e PC2 explicaram mais de 97 % da variância dos dados (Figure 4, apêndice: Figura S1, Tabela S1). Foram observadas a formação de quatro agrupamentos entre amostras similares. A região controle em ambas as coletas se agrupou, isolada das demais, assim como a área REC1 na primeira coleta, quando não havia nenhuma cobertura vegetal sobre esta área. Entretanto, na segunda coleta a mesma região, que naturalmente apresentava crescimento de plantas foi agrupada com as áreas de revegetação, REC2 e REC3, na primeira coleta quando o processo de revegetação nas áreas havia iniciado há dois meses. O quarto agrupamento mostrado, relaciona as duas áreas de revegetação com nove meses, mostrando a semelhança principalmente na composição e no desenvolvimento da vegetação nessas duas regiões.



**Figura 3.** Análise de Componentes Principais (PCA) entre as abundâncias relativas médias (n=3) a nível de filo cada área estudada e coleta realizada.

Essa análise mostrou que os grupos Acidobacteria, Verrucomicrobia e Planctomycetes foram correlacionados a áreas controle, sendo Verrucomicrobia o mais correlacionado. O filo Actinobacteria foi fortemente relacionado a áreas com revegetação mais avançada (REC2\_S e REC3\_S). Proteobacteria foi relacionado as áreas afetadas, especialmente com REC1\_M, quando não havia plantas ou cobertura vegetal sob o solo.

Em comparação com a primeira coleta, na segunda coleta, a abundância relativa do filo Actinobacteria apresentou aumento nas áreas afetadas (Teste Tukey,  $p < 0,01$ ). A abundância deste filo se tornou superior até mesmo a encontrada na área controle, se aproximando aos valores para o grupo mais abundante, em todas as áreas e coletas, Proteobacteria. Este por sua vez não apresentou mudança significativa entre as coletas estudadas.

### **Diversidade Alfa e Beta a 97 % de similaridade**

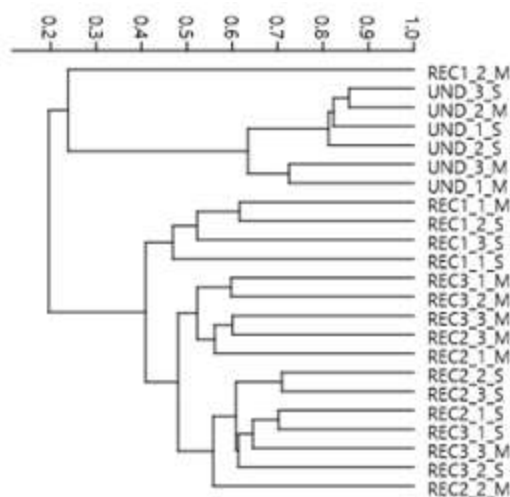
Os índices de diversidade alfa de Shannon e Simpson, e os estimadores de riqueza de Chao-1 e números de OTU mostraram valores superiores para as áreas afetadas com relação a área controle nas duas amostragens. Entretanto, todas as áreas apresentaram

valores que indicam alta diversidade bacteriana e o índice de cobertura de Good avaliando a profundidade do sequenciamento também mostrou valores acima de 80 % (Tabela 2).

**Tabela 3.** Média (n=3) dos índices de diversidade de Shannon e Simpson, do estimador de riqueza de Chao-1, Número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e cobertura de Good, em percentual, mostrando o esforço amostral.

Index / Coleta	UND		REC1		REC2		REC3	
	M	S	M	S	M	S	M	S
Shannon	4,8	4,4	4,41	5,26	5,09	4,91	5	5,11
Simpson	0,97	0,96	0,89	0,99	0,98	0,97	0,98	0,98
Chao-1	624,93	568,06	734,53	769,5	745,03	761,93	734,53	759,06
OTU	561,7	479	587	693,3	648	655,33	632	641,33
Cobertura - %	89,9	84,09	92,21	90,08	86,77	85,98	86	84,35

O dendrograma (Figura 4), baseado na distância evolutiva de Unifrac, uma representação da diversidade beta, revela a similaridade das regiões, agrupando as áreas controle em ambas as coletas com mais de 60 % de similaridade. Todas as áreas estudadas em ambas as coletas apresentaram apenas 20 % de similaridade, mostrando forte diferenciação entre as áreas adjacentes atingidas e controles após o desastre de rejeitos de mineração. As áreas afetadas com e sem programa de revegetação tiveram 40 % de similaridade. Para as áreas afetadas, o agrupamento evidenciou o efeito da revegetação sob o solo, com as áreas de revegetação e a área afetada com regeneração natural agrupando independente de tempo de coleta em ramos distintos, cada um com 50 % de similaridade. Entre as áreas de revegetação, o agrupamento ocorreu principalmente com relação ao tempo de coleta, evidenciando o efeito do desenvolvimento da comunidade vegetal sobre a comunidade bacteriana do solo.



**Figura 4.** Dendrograma baseado na distância filogenética Unifrac a 97 % de similaridade entre as amostras analisadas. UND= área controle, REC 1= área afetada sem programa de revegetação, REC2 e REC 3= áreas submetidas a programas de revegetação. **M** (abreviação de Março) e **S** (abreviação de Setembro), referem a primeira e segunda coleta respectivamente.

## DISCUSSÃO

O resultado da análise das características químicas dos solos analisados mostrou diferenças entre as áreas afetadas e o controle, principalmente com relação a concentração de metais, matéria orgânica e o pH aferido no solo (Tabela 1). Essas estão relacionadas principalmente aos efeitos da contaminação do solo com o rejeito de mineração, já que a onda de rejeitos carregou e/ou soterrou as camadas superficiais do solo retirando matéria orgânica e transportando metais. O ferro e o manganês presentes nas áreas afetadas são os principais componentes (mais de 60 % do rejeito) do rejeito de mineração inerte de ferro liberado na Bacia do Rio Doce, assim como o pH alcalino apresentado se deve ao rejeito, pois durante o processamento do minério de ferro chega ao pH 10,5 (Pires *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006).

O pH apresentado, pode prejudicar alguns processos importantes entre micro-organismos do solo e plantas como a fixação biológica de nitrogênio, que depende da atuação da enzima nitrogenase cujo pH ótimo está próximo a 5,5 e associações micorrízicas que poderiam contribuir com o sucesso dos programas de revegetação em curso (Ferreira *et al.*, 2016).

A maior concentração de potássio encontrada nas áreas de revegetação, possivelmente se deve a fertirrigação implantada na região, que assim como outros

minerais foram introduzidos juntos com espécies de leguminosas e gramíneas para tentar deter o carreamento de mais rejeitos sob o solo para o leito dos rios (Agroflor, 2016).

A partir das mudanças nas características químicas do solo, era esperado que a composição da comunidade bacteriana fosse distinta da área utilizada como controle. Já que estudos anteriores revelaram que a composição da comunidade microbiana nos primeiros estágios de recuperação de áreas degradadas foi mais determinada pela composição química que por outras iniciativas como a revegetação (Li *et al.*, 2014). A modulação da diversidade da comunidade microbiana do solo pela composição química foi recentemente esclarecida por Delgado-Baquerizo *et al.* (2017a). Estes, através de modelagem em quase 180 distintos ecossistemas verificaram que primariamente a comunidade bacteriana do solo é dirigida pelo uso do solo e pelas formas e a disponibilidade de C, N e P presentes no solo e secundariamente por fatores como o pH e da vegetação, sugerindo o uso da composição química do solo como ferramenta para prever a microbiota. Esses resultados, ajudam a corroborar a diversidade beta avaliada (Figura 6) na qual as áreas controle agruparam-se, assim como as áreas afetadas sem e com revegetação mais avançadas. Ou seja, o agrupamento ocorreu primariamente pelas características químicas e em seguida pela influência da revegetação tanto ao nível de filo (Figura 4), quanto ao dendrograma apresentado a nível de OTU com 97 % de similaridade (Figura 6). Também, não se pode ignorar, o fato que parte do rejeito de mineração permaneceu misturado no solo nas áreas afetadas, esse rejeito com características físicas próprias, entre outras a granulometria arenosa e baixa retenção de umidade (Pires *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006) certamente contribuiu para a alteração da composição da comunidade bacteriana juntamente com as mudanças químicas (Trivedi *et al.*, 2017).

A redução, com relação a área controle, da matéria orgânica tem consequências diretas sobre a microbiota do solo, já que esta nutre a comunidade microbiana heterotrófica, o que prejudica e pode diminuir a abundância de grupos oligotróficos e copiotróficos do solo, como Acidobacteria, Verrucomicrobia e Planctomycetes, como de fato foi verificado. Grupos metabolicamente mais diversos como Proteobacteria e Actinobacteria, aproveitam-se de nichos até então explorados por outros grupos ou novos nichos surgidos com o desastre e assim conseguem manter sua abundância relativa a níveis semelhantes (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2017).

O filo Acidobacteria sofreu redução na sua abundância relativa com relação a área controle (UND) em ambas as amostragens e ao longo do processo de revegetação (Teste

Tukey,  $p < 0,01$ ). Estudos tem mostrado que este filo é bastante sensível as condições ambientais, especialmente a variações no pH, carbono orgânico total, nitrogênio disponível, além da concentração de metais, uso e cobertura do solo, tendo seus subgrupos comportamentos distintos frente a mudanças ambientais como a conversão de floresta em pastagem na Amazônia brasileira (Navarrete *et al.*, 2015).

A partir de várias evidências, Kielak *et al.*, (2016) sugerem que este grupo é composto por membros oligotróficos, K-estrategistas e com alta especialização celular e enzimática. Nossos resultados, sugeririam o mesmo, já que a diminuição da abundância relativa do grupo ocorreu em áreas que tiveram as características químicas profundamente alteradas, com redução da matéria orgânica e de uma série de outros minerais, sugerindo também que o grupo possa ser copiótrófico e utilizado para monitorar alterações ambientais.

As abundâncias relativas dos filos Planctomycetes e Verrucomicrobia, assim como Acidobacteria, apresentaram forte redução entre as áreas controle e as áreas afetadas (Teste tukey,  $p < 0,01$ ) e sem mudanças após seis meses. Ambos os grupos são correlacionados positivamente com características ambientais do solo, especialmente com a umidade do solo e inversamente relacionado ao pH apresentado (Buckley & Schmidt, 2001; Buckley *et al.*, 2006). O rejeito de mineração misturado ao solo das áreas afetadas tem baixa capacidade de retenção de água (dados não mostrados), o que corrobora a diminuição da abundância dos grupos citados (Pires *et al.*, 2003).

A alta ou aumento da abundância relativa de Proteobacteria e Actinobacteria em áreas afetadas pela atividade mineradora e em processo de revegetação é relatado em diferentes áreas estudadas sob recuperação no mundo em curto e longo prazo. Li *et al.* (2014) estudando cronosequências de antigas áreas de mineração sob revegetação na China, verificaram um aumento dos mesmos grupos nas etapas iniciais do processo de recuperação e uma posterior redução em 20 anos para números semelhantes ao das áreas controle estudadas. Os autores, sugeririam que os grupos possuem papel importante nos processos de recuperação e na ciclagem de elementos remanescentes de processo de mineração sob o solo, como ferro e arsênio.

No nosso estudo, a estrutura da comunidade (Figura 2) apresentou consideráveis mudanças entre as regiões afetadas e a área controle, bem como as regiões afetadas mostraram alteração entre os tempos de amostragem. Este resultado, seguiu a tendência

de estudos em áreas degradadas quando apontaram forte alteração da comunidade microbiana após mudanças nos parâmetros ambientais e programas de recuperação (Zhan & Sun, 2012; Ju & Zhang, 2015; Navarrete et al., 2015). Entretanto, mesmo com a mudança das estações do ano, a área controle não apresentou mudança na estrutura da comunidade bacteriana para a abundância relativa ao nível de filo, assim, podemos inferir que parte considerável das alterações na abundância relativa dos grupos, principalmente Actinobacteria, ao longo dos seis meses se deveu ao desastre, a composição do rejeito e ao avanço do processo de revegetação implementado nas áreas afetadas.

Os índices de diversidade e riqueza avaliados (97 % de similaridade) foram superiores para as áreas afetadas pelo desastre em comparação com as áreas controle em ambas as coletas (Tabela 3). Já os estudos anteriores realizados em áreas de mineração sob recuperação apontaram uma redução desses índices como consequência da degradação imposta pela atividade mineradora sob o solo (Li *et al.*, 2014; Sprocati *et al.*, 2014; Quadros *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2016). Porém, é importante salientar, que Paracatu de Baixo não é uma região cujo solo foi utilizado para a extração de minérios, mas atingida por uma onda de rejeitos decorrente da extração e processamento do minério de ferro, a 50 Km de distância da região aqui estudada, o que faz da comparação com essas áreas mineradas apenas uma referência.

Os índices de diversidade alfa e de riqueza nas áreas afetadas superior ao das áreas controle estudadas, não seguiram o que é recorrente para áreas de mineração sob revegetação nas quais é relatada diminuição da diversidade e riqueza das comunidades bacterianas do solo (Quadros *et al.*, 2016). Entretanto, os maiores índices de diversidade para áreas perturbadas foram também observados na conversão de floresta a pastagem em regiões da Amazônia Brasileira. Mendes *et al.* (2015) estudando áreas perturbadas desta região, observaram que a alta diversidade alfa e a redundância funcional verificadas tinham por objetivo a manutenção de ecossistemas do solo em funcionamento, enquanto em áreas não perturbadas as comunidades microbianas atuavam nos ecossistemas do solo baseados na alta abundância apresentando assim mais baixos valores destes índices.

Na mesma linha, os resultados obtidos por Delgado-Baquerizo *et al.*, (2017b) verificaram que a composição e a riqueza microbiana conduziram a multifuncionalidade dos ecossistemas do solo, mostraram que estes fatores atuaram de maneira independente na multifuncionalidade. Os mesmos autores propuseram um modelo, baseado em estudo de campo e em microcosmos no qual concluíram que gamaproteobacteria, Actinobacteria

e Bacteroidetes foram os principais grupos responsáveis pela multifuncionalidade dos solos.

Resultados semelhantes também foram observados por nós, que verificamos os mesmos grupos, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes, como os mais abundantes nas áreas de revegetação estudadas. Nossa possível explicação é que após o desastre e as mudanças nos solos, a manutenção da alta abundância relativa de Proteobacteria e o crescimento de Actinobacteria e Bacteroidetes nas áreas de revegetação estejam relacionados a redundância funcional e à promoção da multifuncionalidade no solo desempenhadas por esses grupos na tentativa de recuperação dos ecossistemas afetados. As mudanças nas características químicas do solo, como a redução da matéria orgânica, o pH alcalino, a oligotrofia e a capacidade de utilização de compostos recalcitrantes como a celulose e a lignina, introduzidos com a revegetação, além da maior competitividade frente a perturbações ambientais são correlacionados positivamente à abundância desses grupos (Nacke *et al.*, 2011; Trivedi *et al.*, 2013; Maestre *et al.*, 2015; Delgado-Baquerizo, Trivedi, *et al.*, 2017). Estes grupos passam então a atuar na manutenção e na recuperação das funções do solo, ocupando o nicho dos grupos mais sensíveis que ficam reduzidos até que as características do solo próximas as das áreas não afetadas sejam restabelecidas.

Além de justificar o crescimento desses grupos nos primeiros estágios de recuperação e revegetação para as áreas aqui observadas, justifica também o motivo desses mesmos grupos após décadas de recuperação com revegetação de antigas áreas de mineração apresentarem abundâncias relativas decrescentes e próximas a das áreas não perturbadas (Li *et al.*, 2014). Embora nossa hipótese para o desenvolvimento da comunidade microbiana para áreas afetadas só possa ser confirmada com um contínuo monitoramento da evolução da comunidade ao longo do tempo, o estudo do impacto no início da recuperação avaliados aqui permitirá uma base de comparação para futuros estudos na mesma e em regiões semelhantes. Essa base permite avaliar o desenvolvimento da comunidade bacteriana ao longo do tempo, o que pode mostrar um resultado mais robusto que o uso das cronosequências, comumente utilizadas em estudos da comunidade microbiana de áreas degradadas por essas últimas apresentarem primariamente um “retrato do momento”.

Gostaríamos de salientar que não encontramos trabalhos anteriores relacionados a microbiota de nenhuma área da Bacia do Rio Doce anterior ao desastre. Após o desastre,

encontramos apenas o estudo desenvolvido por Segura *et al.*, (2016) que avaliando o potencial citotóxico do rejeito de mineração liberado na Vila de Bento Rodrigues (Mariana-MG), primeiro distrito destruído pela onda de rejeitos de mineração, comparou quantidades de micro-organismos cultiváveis em placas de Petri isolados da área do rejeito de mineração e de áreas adjacentes. Os resultados revelaram que todas as amostras apresentaram números elevados de UFC/g (unidades formadoras de colônias/grama de solo) e quantitativamente não houve diferença entre a contagem dos grupos estudados nas amostras coletadas. Os autores sugerem que as características físicas e químicas do rejeito de mineração podem atuar favorecendo o crescimento microbiano. Embora ensaios em placas de Petri sejam limitados para expressar a diversidade e a riqueza em amostras ambientais (Torsvik *et al.*, 1990; Stefani *et al.*, 2015). Esses resultados concordam com os nossos quando verificamos altos índices de riqueza, assim também, podemos esperar um alto número de bactérias cultiváveis dos solos e rejeitos em Paracatu de Baixo.

Assim, acreditamos que o uso de dois níveis de taxonomia, 80 % e 97 % de similaridade nucleotídica, como sugerido por alguns autores (Kunin *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2011), permitiu uma avaliação eficiente e precisa das mudanças na comunidade microbiana dos solos permitindo resultados robustos na caracterização das mesmas. Sugerimos então, um monitoramento nesses mesmos níveis para avaliar o desenvolvimento da comunidade microbiana ao longo do tempo e que estes dados possam ser utilizados como base para o manejo e o acompanhamento da recuperação das áreas afetadas pelo desastre de rejeitos de mineração, bem como servir de base para estudos das comunidades microbianas em outras áreas de afetadas sob processo de revegetação.

Os resultados obtidos com o sequenciamento metagenômico do gene rRNA 16S serviram para aclarar os efeitos e a importância dos micro-organismos dos solos frente ao desastre ambiental e ao rejeito de mineração com características únicas, bem como caracterizar microbiologicamente os solos da região. Esta última abordagem, de caracterização e diferenciação de solos é suportada por Khodakova *et al.*, (2014), quando aponta o sequenciamento de amplicons como técnica sensível e precisa para a caracterização e diferenciação forense de diversos solos, o que também pode ser levado em conta na bacia do Rio Doce. Este estudo também soma-se a outros que pela mesma técnica avaliaram com precisão e predisseram mudanças em ambientes pela ação antrópica como práticas agrícolas e a sua influência na degradação de bacias hidrográficas (Bowles *et al.*, 2014; Van Rossum *et al.*, 2015), atividades pecuárias (Ding *et al.*, 2013;

García-Orenes *et al.*, 2013; Chronakova *et al.*, 2015) e mineração especialmente de carvão (Escobar *et al.*, 2015; Ju and Zhang, 2015; Li *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015; Quadros *et al.*, 2016) convergindo que o tempo e o manejo adotados podem em médio e longo prazo recuperar a composição bacteriana das áreas perturbadas e assim as funções dos ecossistemas.

## **CONCLUSÕES**

A onda de rejeitos de mineração alterou as características químicas, que junto aos programas de revegetação modularam alterações na composição da comunidade bacteriana dos solos afetados. A diversidade bacteriana nas regiões afetadas apresentou valores maiores que a área controle estudada o que indica uma resposta da comunidade bacteriana a perturbações ambientais. A revegetação, mesmo em curto prazo, diferenciou os solos afetados em sua composição microbiana, mesmo com a manutenção das características químicas.

Filos bacterianos com maiores exigências ambientais para crescimento, como Acidobacteria, Verrucomicrobia e Planctomycetes, tiveram sua abundância reduzida. Enquanto, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes, que apresentam grande versatilidade metabólica no ambiente apresentaram maior abundância nas áreas afetadas e em recuperação.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

J.C e C.S escreveram o artigo e definiram a pesquisa; J.C, M.S, M.K foram responsáveis pela amostragem. J.C., H.L., L.S, C.S e M.T foram responsáveis pela análise de dados, M.K forneceu suporte financeiro e de infraestrutura a pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Essa pesquisa foi financiada com recursos do edital *Tecnologias para a Recuperação da Bacia do Rio Doce*, na linha temática: recuperação de biodiversidade, da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, FAPEMIG e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (APQ-01097-16). Os autores também agradecem a CAPES, FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudos aos autores e financiamento a demais atividades e AGROFLOR LTDA pelo apoio técnico na escolha dos pontos de amostragem.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não ter conflitos de interesses ou potencial conflito de interesses na condução dessa pesquisa.

## REFERENCES

- Agroflor (2016) Contenção de carreamento de sedimentos por meio de revegetação nas áreas afetadas pelo rejeito. 62.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., and Weber, L. (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* **75**: 129–137.
- Bowker, L.N. and Chambers, D.M. (2015) The risk, public liability & economics of tailings storage facility failures Montana, USA.
- Bowles, T.M., Acosta-martínez, V., Calderón, F., and Jackson, L.E. (2014) Soil Biology & Biochemistry Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biology and Biochemistry* **68**: 252–262.
- Brasil (2015) Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais.
- Buckley, D.H., Huangyutitham, V., Nelson, T.A., Rumberger, A., and Thies, J.E. (2006) Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4522–4531.
- Buckley, D.H. and Schmidt, T.M. (2001) Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiology Ecology* **35**: 105–112.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., et al. (2011) NIH Public Access. *Nature methods* **7**: 335–336.

- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl**: 4516–22.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W. a, Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* **6**: 1621–1624.
- Chronakova, A., Schloter-hai, B., Radl, V., and Endesfelder, D. (2015) Response of Archaeal and Bacterial Soil Communities to Changes Associated with Outdoor Cattle Overwintering. 1–22.
- Defelipo, B.V. and Ribeiro, A.C. (1981) Análise química do solo (Metodologia) 29th ed. Viçosa.
- Delgado-Baquerizo, M., Reich, P.B., Khachane, A.N., Campbell, C.D., Thomas, N., Freitag, T.E., et al. (2017) It is elemental: soil nutrient stoichiometry drives bacterial diversity. *Environmental microbiology* **0**: 1–41.
- Delgado-Baquerizo, M., Trivedi, P., Trivedi, C., Eldridge, D.J., Reich, P.B., Jeffries, T.C., and Singh, B.K.. (2017) Microbial richness and composition independently drive soil multifunctionality. *Environmental microbiology* **12**: 3218–3221.
- Ding, G.-C., Piceno, Y.M., Heuer, H., Weinert, N., Dohrmann, A.B., Carrillo, A., et al. (2013) Changes of Soil Bacterial Diversity as a Consequence of Agricultural Land Use in a Semi-Arid Ecosystem. *PLoS ONE* **8**: e59497.
- Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460–2461.
- Edgar, R.C. (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Meth* **10**: 996–998.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**: 2194–2200.
- Escobar, I.E.C., Santos, V.M., da Silva, D.K.A., Fernandes, M.F., Cavalcante, U.M.T., and Maia, L.C. (2015) Changes in Microbial Community Structure and Soil Biological Properties in Mined Dune Areas During Re-vegetation. *Environmental*

*Management* **55**: 1433–1445.

- Fernandes, G.W., Goulart, F.F., Ranieri, B.D., Coelho, M.S., Dales, K., Boesche, N., et al. (2016) Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação* **4**: 35–45.
- Ferreira, T.C., Aguilar, J.V., Souza, L.A., Justino, G.C., Aguiar, L.F., and Camargos, L.S. (2016) pH effects on nodulation and biological nitrogen fixation in *Calopogonium mucunoides*. *Revista Brasileira de Botanica* **39**: 1015–1020.
- García-Orenes, F., Morugán-Coronado, A., Zornoza, R., Cerdà, A., and Scow, K. (2013) Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem. *PloS one* **8**: e80522.
- García, L.C., Ribeiro, D.B., de Oliveira Roque, F., Ochoa-Quintero, J.M., and Laurance, W.F. (2016) Brazil's worst mining disaster: Corporations must be compelled to pay the actual environmental costs. *Ecological Applications* **27**: 5–9.
- Gomes, L.E. de O., Correa, L.B., Sá, F., Neto, R.R., and Bernardino, A.F. (2017) The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin* **120**: 28–36.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., and Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4(1)**: 1–9.
- Ju, F. and Zhang, T. (2015) 16S rRNA gene high-throughput sequencing data mining of microbial diversity and interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**: 4119–4129.
- Jung, J., Philippot, L., and Park, W. (2016) Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports* 1–10.
- Khodakova, A.S., Smith, R.J., Burgoyne, L., Abarno, D., and Linacre, A. (2014) Random Whole Metagenomic Sequencing for Forensic Discrimination of Soils. **9**.
- Kielak, A.M., Barreto, C.C., Kowalchuk, G.A., Veen, J.A. Van, and Kuramae, E.E. (2016) The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1–16.

- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., and Hugenholtz, P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* **12**: 118–123.
- Lemos, L.N., Fulthorpe, R.R., Triplett, E.W., and Roesch, L.F.W. (2011) Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. *Journal of Microbiological Methods* **86**: 42–51.
- Li, J., Zhou, X., Yan, J., Li, H., and He, J. (2015) Effects of regenerating vegetation on soil enzyme activity and microbial structure in reclaimed soils on a surface coal mine site. *Applied Soil Ecology* **87**: 56–62.
- Li, Y., Wen, H., Chen, L., and 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**:
- Ma, Q., Qu, Y.-Y., Zhang, X.-W., Shen, W.-L., Liu, Z.-Y., Wang, J.-W., et al. (2015) Identification of the microbial community composition and structure of coal-mine wastewater treatment plants. *Microbiological Research* **175**: 1–5.
- Maestre, F.T., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T.C., Eldridge, D.J., Ochoa, V., Gozalo, B., et al. (2015) Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 201516684.
- Marta-Almeida, M., Mendes, R., Amorim, F.N., Cirano, M., and Dias, J.M. (2016) Fundao Dam collapse: Oceanic dispersion of River Doce after the greatest Brazilian environmental accident. *Marine Pollution Bulletin* **112**: 359–364.
- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., et al. (2011) Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS ONE* **6**:
- Navarrete, A.A., Soares, T., Rossetto, R., van Veen, J.A., Tsai, S.M., and Kuramae, E.E. (2015) Verrucomicrobial community structure and abundance as indicators for changes in chemical factors linked to soil fertility. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **108**: 741–752.
- Navarrete, A.A., Venturini, A.M., Meyer, K.M., Klein, A.M., Tiedje, J.M., Brendan, B.J., et al. (2015) Differential response of Acidobacteria subgroups to forest-to-pasture

- conversion and their biogeographic patterns in the western Brazilian Amazon. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–10.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., et al. (2015) vegan: Community Ecology Package. *R package version 2.3-2* <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Parada, A.E., Needham, D.M., and Fuhrman, J.A. (2016) Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* **18**: 1403–1414.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., and McMahon, T. a. (2006) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Meteorologische Zeitschrift* **15**: 259–263.
- Philippot, L., Spor, A., Hénault, C., Bru, D., Bizouard, F., Jones, C.M., et al. (2013) Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME Journal* **7**: 1609–1619.
- Pires, J.M.M., Lena, J.C. de, Machado, C.C., and Pereira, R.S. (2003) Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco Mineração: Estudo de caso da barragem de Germano. *Revista Árvore* **27**: 393–397.
- Pyro, V.S., Fernando, L., Roesch, W., Ortega, J.M., Morais, A., Tótoia, M.R., et al. (2014) Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity — Challenges and Prospects. *Microbial Biotechnology* 237–241.
- Quadros, P.D. de, Zhalnina, K., Davis-Richardson, A.G., Drew, J.C., Menezes, F.B., Camargo, F.A. de O., and Triplett, E.W. (2016) Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied Soil Ecology* **98**: 195–203.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Glo, F.O., and Yarza, P. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **41**: 590–596.
- Reboita, M.S., Rodrigues, M., Silva, L.F., and Alves, M.A. (2016) Aspectos climáticos do estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Climatologia* **18**: 307–326.
- Van Rossum, T. V., Peabody, M.A., Uyaguari-Diaz, M.I., Cronin, K.I., Chan, M., Slobodan, J.R., et al. (2015) Year-long metagenomic study of river microbiomes across land use and water quality. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–15.

- Samarco (2016) UM ANO DO ROMPIMENTO DE FUNDÃO. 37.
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G. ??bida L., et al. (2016) Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution* **218**: 813–825.
- Silva, G.P., Fontes, M.P.F., da Costa, L.M., and de Barros, N.F. (2006) Caracterização química, física e mineralógica de estéreis e rejeito da mineração de ferro da mina de Alegria, Mariana-MG. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **36**: 45–52.
- Sprocati, A.R., Alisi, C., Tasso, F., Fiore, A., Marconi, P., Langella, F., et al. (2014) Bioprospecting at former mining sites across Europe: Microbial and functional diversity in soils. *Environmental Science and Pollution Research* **21**: 6824–6835.
- Stefani, F.O.P., Bell, T.H., Marchand, C., De La Providencia, I.E., El Yassimi, A., St-Arnaud, M., and Hijri, M. (2015) Culture-dependent and -independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. *PLoS ONE* **10**: 1–16.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., and Daae, F.L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 782–787.
- Trivedi, P., Anderson, I.C., and Singh, B.K. (2013) Microbial modulators of soil carbon storage: Integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. *Trends in Microbiology* **21**: 641–651.
- Trivedi, P., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T.C., Trivedi, C., Anderson, I.C., Lai, K., et al. (2017) Soil aggregation and associated microbial communities modify the impact of agricultural management on carbon content. *Environmental Microbiology*.
- Walters, W., Hyde, E.R., Berg-lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., et al. (2015) Improved Bacterial 16S rRNA gene (v4 AND v4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* **1**: e0009-15.
- Yan, X., Luo, X., and Zhao, M. (2016) Metagenomic analysis of microbial community in uranium-contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 299–310.
- Zhan, J. and 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. *Microbiological Research* **167**: 157–165.

# Capítulo 3

# ATIVIDADES BIOLÓGICAS EM SOLOS CONTAMINADOS COM REJEITO DE MINERAÇÃO ORIUNDO DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO, MARIANA-MG.

João Paulo Campos Moura Cavalcante<sup>1</sup>; Gustavo Sampaio de Lima Martins<sup>2</sup>; Marcos Rogério Tótolá<sup>2</sup>, Maria Catarina Megumi Kasuya<sup>3</sup>, Cynthia Canêdo da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Instituto de Biotecnologia aplicada a agropecuária/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o meio ambiente, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Associações Micorrízicas, Instituto de Biotecnologia aplicada a agropecuária/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

## ABSTRACT

After the largest environmental disaster know in volume and extension caused for mining tailings dam disrupt, occurred on November 2015, a revegetation program was started in the Rio Doce Basin, southeast of Brazil, for the environmental recovery of impacted soils. Thus, soil biological indicators, including enzymatic activities, basal respiration, microbial carbon biomass, besides chemical features of soil were used to better understand the total impact of the disaster and help recovery programs in Paracatu de Baixo, a village part of Mariana, Minas Gerais. The pH of affected sites, showed alkaline tendency, organic matter and some metals in soil showed low values related with the tailing's composition. There were profound changes in the chemical characteristics and the soil biological community was severely affected. All the biological indicators studied showed a reduction in relation to the control, a forest not affected directly by the tailings, and the activity of  $\beta$ -glucosidase was more sensitive to recent revegetation program in course.

**Palavras-chave:** Desastre ambiental, enzimas do solo, Samarco, Saúde do solo

---

Autor Correspondente: Cynthia Canêdo da Silva, Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus, Viçosa, MG, 36570-900, Brasil. E-mail:ccanedo@ufv.br

## INTRODUÇÃO

No mês de novembro de 2015, o Brasil sofreu um dos maiores desastres ambientais e sociais conhecidos, causado pelo rompimento de uma barragem de rejeitos de mineração de ferro, tanto em extensão como em volume de rejeitos liberados (Bowker and Chambers, 2015). Estima-se que 33 milhões m<sup>3</sup> de rejeitos de mineração tenham sido lançados a bacia do Rio Doce, sudeste do Brasil, que se espalharam por mais de 663 Km da bacia até a foz do Rio Doce no estado do Espírito Santo e, em seguida, por milhares de quilômetros no Oceano Atlântico (Brasil, 2015b; Marta-Almeida *et al.*, 2016). Os principais impactos para o meio ambiente decorrentes da tragédia foram a morte de milhares de animais terrestres e aquáticos, a contaminação de três rios da bacia, a remoção de quase 2.000 ha de vegetação natural e modificações de ambientes estuarinos e marinhos, além da sedimentação do rejeito nos leitos dos rios e do solo, especialmente nos primeiros 100 Km após a barragem de Fundão (BRASIL, 2015a; Fernandes *et al.*, 2016).

A barragem de Fundão, propriedade da mineradora Samarco, uma *joint venture* entre a Vale e a BHP Billiton, está localizada no município de Mariana, uma cidade histórica de Minas Gerais, Brasil e parte da conhecida região mineradora chamada de Quadrilátero Ferrífero. A principal atividade econômica na região é a mineração de recursos naturais e a agricultura familiar, ambas atividades dependentes do uso do solo e seus recursos (Brasil, 2015b). Em menos de dois meses após o desastre, a companhia iniciou ações para remover o rejeito de mineração das calhas dos rios, das margens adjacentes e sob o solo, associados às ações de bioengenharia. Essas ações incluíram um programa de revegetação composto por leguminosas e gramíneas para evitar que mais rejeito de mineração de ferro fosse carregado do solo para o leito dos rios, na tentativa de recuperar a estrutura do solo e características químicas alteradas pelo desastre (Brasil, 2015a, 2015b; Samarco, 2016; Segura *et al.*, 2016).

A estrutura do solo, as características químicas e a revegetação iniciada são relacionados como influenciadores da comunidade microbiana. Esses podem alterar e serem modulados pela comunidade microbiana exercendo influência recíproca. Microorganismos podem também potencializar programas de revegetação pela sua capacidade de reciclar nutrientes e estabelecer relações simbióticas com plantas e animais, além de produzir importantes metabólitos (Sheoran *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

Atributos biológicos tais como o carbono da biomassa microbiana, a respiração basal e as atividades enzimáticas são usados como indicadores da saúde do solo e são parte de programas de monitoramento da qualidade e uso dos solos em diversos países, pois eles são sensíveis às alterações e mostram resultados rápidos, mais baratos, e confiáveis (Nannipieri *et al.*, 2003; Paz-Ferreiro e Fu, 2016). O uso desses atributos está se tornando comum nas atividades agropecuárias, pois são mais sensíveis e acurados que os padrões físicos e químicos do solo analisados de maneira isolada. Assim, integrar dados biológicos e ambientais dará mais confiança na avaliação a saúde do solo e nos programas de recuperação ambiental (Cardoso *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015; Narendrula-Kotha and Nkongolo, 2017). Estudos prévios mostraram que, após atividades de mineração, a biomassa microbiana do solo decresce, a ciclagem de nutrientes pode ser fortemente reduzida e o funcionamento do ecossistema pode ser prejudicado, tornando ainda mais difícil a recuperação de ambientes degradados (Li *et al.*, 2014; Louis *et al.*, 2016; Quadros *et al.*, 2016).

Neste trabalho, nossa hipótese é que o depósito de rejeitos de mineração sobre o solo reduziu as atividades biológicas da comunidade biológica do solo e a revegetação das áreas afetadas pode potencializar a recuperação das mesmas em um curto mais período. Para tanto, foram avaliadas as atividades enzimáticas, o carbono da biomassa microbiana e a respiração basal do solo de áreas diretamente afetadas pelo rejeito com o objetivo de estudar o efeito do rejeito de mineração e da revegetação sobre a comunidade biológica do solo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo**

A área de estudo foi *Paracatu de Baixo*, um distrito da cidade de Mariana, estado de Minas Gerais, Brasil. O distrito está localizado a 20°18'15" Sul e 43°13'51" Oeste, em uma altitude de 583 m, e está a aproximadamente 50 Km distante da barragem de Fundão, e foi totalmente destruído pela onda de rejeitos liberada pelo rompimento dessa barragem. A classificação climática, de acordo com a classificação de Koppen-Geiger é Cwa, o inverno é a estação seca, a média anual de chuvas é 1.307 mm e a média da temperatura anual é de 20.4° Celsius (Peel *et al.*, 2006; Reboita *et al.*, 2016). Após o rompimento da barragem de Fundão, uma enorme quantidade de rejeitos de mineração de

ferro foi depositada sobre o solo. Esse rejeito de mineração foi em grande parte removido pela Samarco antes do início do programa de revegetação. Em seguida, o programa de revegetação foi iniciado pela introdução de sementes de espécies de leguminosas e gramíneas. Esse programa foi combinado com técnicas de bioengenharia nas regiões próximas ao leito dos rios atingidos com o objetivo de evitar ou reduzir o carreamento desses rejeitos para o leito do rio na estação chuvosa, iniciada a menos de dois meses do desastre.

### **Coleta e amostragem**

A coleta foi realizada em quatro áreas: UND –área adjacente não afetada pela onda de rejeitos e coberta por vegetação natural- floresta; REC1 –área afetada sem programa de revegetação em andamento; e REC2 e REC3 - regiões afetadas pelo rejeito de mineração com programas de revegetação em curso há 9 meses. O programa de revegetação apresentou a seguinte composição de plantas: *Canavalia ensiformis*, *Stylosanthes* spp., *Glycine wightii*, *Crotalaria* spp., *Calopogonio mucunoides*, *Mucuna pruriens*, *Avena* spp., *Vicia sativa*, *Sorghum bicolor*, *Lolium multiflorum*, *Panicum notatum*, *Raphanus sativus*, *Pennisetum glaucum*, *Cajanus cajan* e *Mucuna aterrina* (Agroflor, 2016).

A coleta foi realizada no mês de setembro de 2016, dez meses após o rompimento da barragem de rejeitos de mineração e final da estação seca. Em cada área, transeptos foram realizados randomicamente e cada ponto foi marcado com o auxílio de um GPS (Garmin, Tabela S1 apêndice). Para a amostragem, o material vegetal e orgânico sobre a superfície do solo foi removido e as ferramentas de coleta foram limpas antes e após cada amostragem. Três amostras compostas (contendo cinco sub-amostras) foram coletadas de cada área, num total de 12 amostras. Cada uma das amostras compostas foi coletada em uma área de 1 m<sup>2</sup>, a uma profundidade de 0 a 15 cm, num total de aproximadamente 1 Kg. As amostras coletadas foram armazenadas em sacolas plásticas e colocadas sob refrigeração e levadas ao laboratório onde foram peneiradas (> 2 mm) e estocadas a 8° C, até realização das análises.

## **Análises químicas do solo**

Foram analisadas as características químicas de todas as amostras coletadas. O pH foi determinado em água (relação 1:2,5 w/v), com o auxílio de um potenciômetro. Potássio (K) e fósforo (P) foram extraídos por solução bi-ácida composta por ácido sulfúrico e ácido hidro clorídrico e determinados por fotometria de chama. Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Alumínio (Al) foram extraídos com uma solução neutra de cloreto de potássio (KCl, 1 mol.L<sup>-1</sup>), o primeiro e o segundo foram medidos com espectrofotometria de absorção atômica (Varian) com a adição de cloreto de estrôncio a 0,05, e o alumínio foi medido por titulação com hidróxido de sódio. A acidez potencial (H + Al) foi extraída utilizando solução neutra de acetato de cálcio (1 N) por titulação e hidróxido de sódio (NaOH). A saturação de bases (V), capacidade de troca catiônica (CtC) e a soma de bases (SB) foram calculadas. A matéria orgânica (M.O.) foi analisada pelo método colorimétrico e oxidação e a medição do carbono orgânico foi obtida pela aproximação  $C.O. = M.O. / 1,724$  (Defelipo & Ribeiro, 1981).

## **Indicadores biológicos do solo**

O carbono da biomassa microbiana foi avaliado pelo método da fumigação-extração proposto por Vance *et al.* (1987). Cada amostra foi dividida em duas subamostras com 20 g cada (massa úmida), a primeira subamostra foi utilizada como controle e o carbono extraído imediatamente com K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mol L<sup>-1</sup>), em seguida agitada a 200 rpm por 0,5 h e filtrada. Na segunda subamostra, foi adicionado 0,1 mL de clorofórmio, colocado no dessecador por 48 h, e após esse período o dessecador foi aberto liberando o clorofórmio com o carbono sendo extraído, assim como foi realizado no controle. A medição foi realizada a partir da reação com permanganato de potássio (Bartlett e Ross, 1994).

O carbono orgânico do solo (C.O.) e o carbono da biomassa microbiana (CBM) foram utilizados para o cálculo do quociente microbiano (*qMic*), que foi calculado para cada amostra pela relação entre o CBM e o C.O. e expresso em porcentagem (Sparling, 1992).

A respiração basal do solo (C-CO<sub>2</sub>) foi mensurada colocando-se 50 g de cada amostra em recipientes de 500 mL e incubadas por 96 h a 25 °C. As análises foram realizadas num respirômetro automatizado com detector infravermelho (Sable Systems –

Mod. TR-RM8 Respirometer Multiplexer), seguindo o proposto por Heinemeyer *et al.* (1989).

O quociente metabólico foi determinado para cada amostra de acordo com Anderson e Domsch (1993), obtendo-se o valor pela relação entre os valores de C-CO<sub>2</sub> e CBM.

As atividades enzimáticas das fosfatases alcalina e ácida, além das atividades  $\beta$ -Glucosidase foram realizadas segundo os métodos colorimétricos propostos por Tabatabai (1994). Todas as análises enzimáticas usaram o análogo de substrato *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranosídeo (*p*NPG), com diferentes tampões. Para avaliação da atividade da  $\beta$ -Glucosidase, foram pesados, duas vezes, 1 g de cada amostra de solo úmido (massa úmida) e colocados em tubos de ensaio. A primeira amostra foi utilizada como controle para cada ensaio. A seguir, os tubos foram incubados com a adição de 0,25 mL de tolueno, 4 mL do tampão universal a 0,05 M (pH 6,0). Um mililitro de 25 mM *p*NPG (5 mM na concentração final) dissolvido no tampão foi adicionado apenas nos tubos utilizados como controle. Os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e colocados em banho-maria por uma hora a 37 °C. Em seguida, foi adicionado em todos os tubos 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,5 M) e 4 mL THAM (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) (0,2 M), ajustado para o pH 12. Um mililitro de *p*NPG –para nitrofenil fosfato (25 mM ) foi adicionado apenas nos tubos em tratamento. Todos os tubos de ensaio foram agitados novamente e a solução foi filtrada. Sendo a absorbância do filtrado medida no comprimento de onda de 410 nm. Os valores obtidos foram corrigidos pelas amostras controles, a unidade do solo e para a absorção do lançamento de *para*-nitrophenol (*p*NP). A atividade de  $\beta$ -glucosidase foi expressa como  $\mu\text{mol } p\text{NP g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$ .

### **Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SISVAR (Ferreira, 2011). Todos os dados resultantes das características químicas, como os dos indicadores biológicos, foram submetidos à análise de variância (one-way ANOVA) e, quando pertinente, ao teste Scott-Knott para comparação de médias ( $p < 0,05$ ). Os testes de correlação linear de Pearson e análise multivariada de Componentes Principais entre os indicadores biológicos e os dados químicos foram realizadas através do *software* PAST (Hammer *et al.*, 2001).

## RESULTADOS

### Análises químicas do solo

Os resultados das análises químicas revelaram diferenças entre as áreas afetadas e a área controle. O pH mostrou valores maiores ( $p < 0,05$ ), com tendência ao neutro ou ao alcalino nas áreas afetadas (REC1, REC2 e REC3) e a área controle (UND) apresentou valores ácidos (Tabela 1).

Com exceção do fósforo, que apresentou valores em torno de duas vezes maiores nas áreas afetadas, todas as outras características químicas estudadas apresentaram valores superiores ao da área controle. A matéria orgânica apresentou valores aproximadamente cinco vezes maior na área controle que nas áreas afetadas, mesmo após nove meses de programa de revegetação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características químicas de solo/resíduo de área não afetada (UND) e das áreas afetadas pelo rejeito de mineração de ferro (REC1, REC2 e REC3) em Paracatu de Baixo, Mariana, MG.

Área	pH	P -----mg/dm <sup>3</sup> -----	K	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>+3</sup>	SB	V cmolc/ dm <sup>3</sup>	CtC -----%-----	C.O.	M.O
UND	5.40b	4.80b	88.33a	2.37a	1.16a	5.55 a	3.7a	4.13a	9.33a	27.57a	4.75a
REC1	8.0a	7.77a	62.67a	1.4a	0.03b	0.17b	1.6b	1.6b	1.77b	5.74b	0.99b
REC2	7.17a	8.43a	50.67a	0.87a	0.13b	0.17b	1.1b	1.1b	1.30b	7.25b	1.25b
REC3	8.03a	8.67a	68.67a	1.13a	0.03b	0.17b	1.3b	1.3b	1.47b	6.28b	1.08b

Letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knot ( $p < 0,05$ ). UND = Área controle, REC1 = área afetada sem programa de revegetação em curso, REC2 e REC3 = área afetada com programa de revegetação em curso. SB = soma de bases, V = Saturação de bases, CtC = Capacidade de troca catiônica, C.O. = Carbono orgânico, M.O = Matéria orgânica.

### Indicadores biológicos do solo

Os resultados dos indicadores biológicos mostraram diferenças marcantes entre a área controle (UND) e as áreas afetadas pelos rejeitos de mineração (REC1, REC2, REC3). As atividades das enzimas  $\beta$ -Glucosidase, ACP, AKP, CBM e RS apresentaram valores menores ( $p < 0,05$ ) nas áreas afetadas em relação ao controle (Tabela 2).

Os valores mais altos para  $\beta$ -Glucosidase (BG) foram observados na área controle, seguido pelas áreas de revegetação (REC2 e REC3) e por último a região afetada, mas sem programa de revegetação (REC1) (Tabela 2). Esses resultados revelaram que a atividade de BG foi sensível ao programa de revegetação iniciado na área, mesmo em curto prazo. Evidenciou também uma diferença entre as áreas afetadas submetidas ao

processo de revegetação. As áreas sob revegetação (REC2 e REC3) apresentaram valores duas vezes menores que a área controle, enquanto a área não submetida ao programa de revegetação (REC1) apresentou valor quase 10X menor.

Em relação as outras atividades biológicas estudadas, os valores de AKP, ACP, RS e MBC foram mais altos para a área controle, indicando maiores atividades, biomassa e atividade da biomassa nessa região com relação as áreas afetadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores dos indicadores biológicos de amostras da área não afetada (UND) e das áreas afetadas pelo rejeito de mineração de ferro com revegetação espontânea (REC1) ou revegetada (REC2, REC3), em Paracatu de Baixo, Mariana, MG. (n=3).

Área	AKP	ACP	BG	CBM	RB	qCO <sub>2</sub>	qMIC
	---- $\mu\text{g g}^{-1}$ p-nitrofenol solo seco $\text{h}^{-1}$ ----			$\mu\text{g g}^{-1}$ solo seco	$\mu\text{g C-CO}_2 \text{g}^{-1}$ solo seco $\text{dia}^{-1}$	----- % -----	
UND	217,90a	493,40a	65,79a	274,49a	36,226 a	7,347a	5,58a
REC1	19,81b	13,01b	5,47c	45,51b	0,005 b	0,01b	0,1335b
REC2	4,16b	12,01b	32,67b	81,91b	0,003 b	0,006b	0,0950b
REC3	6,17b	10,80b	36,79b	107,92b	2,006b	0,002b	0,0069b

Letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam que as médias diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knot ( $p < 0,05$ ). AKP= Atividade de fosfatase Alcalina, ACP= atividade de fosfatase ácida, BG= atividade da enzima beta-glicosidase, RB= respiração basal, qCO<sub>2</sub> = quociente metabólico, qMIC= quociente microbiano, UND = Área controle, REC1 = área afetada sem programa de revegetação em curso, REC2 e REC3=área afetada com programa de revegetação em curso.

Os valores do quociente metabólico, respiração basal do solo e quociente microbiano mostraram-se maiores para a região controle em relação às áreas afetadas, mas sem diferenças estatística entre as áreas afetadas (Tabela 2).

Os resultados dos indicadores biológicos (Tabela 2) e químicos (Tabela 1) não terem mostrado diferença entre as duas áreas com programas de revegetação (REC2 e REC3). Entretanto, a fisionomia vegetal foi distinta pela observação em campo com REC2 possuindo plantas mais altas, mais cobertura vegetal, enquanto a região REC3 apresentava crescimento mais baixo, com a predominância de gramíneas.

O carbono da biomassa microbiana (MBC) foi maior na área controle e entre as áreas afetadas não houve diferença ( $p < 0,05$ ), mesmo com o programa de revegetação em curso há nove meses (Tabela 2).

As atividades das fosfatases, ácida e alcalina, mostraram resultados similares, ambos os valores de atividades foram maiores na área controle (UND) ( $p < 0,05$ ) e sem diferença significativa entre as áreas afetadas pelos rejeitos (Tabela 3).

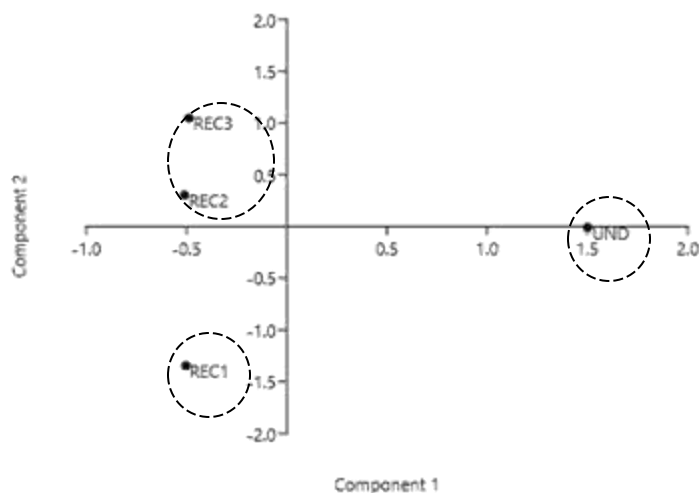
A correlação linear de Pearson foi aplicada para verificar a correlação entre os indicadores biológicos e alguns indicadores químicos (Tabela 3). Os resultados mostraram que o pH foi associado de maneira negativa com todos os parâmetros biológicos. Como nós esperávamos, as atividades enzimáticas foram fortemente associadas ao CBM, já que este é o principal reservatório de enzimas do solo e atua na formação da matéria orgânica, assim como é parte dela.

Os resultados obtidos pela Análise de Componentes Principais (PCA) mostraram que os eixos PC1 e PC2 explicaram 99,89 % (Tabela S1, apêndice) da variância entre os indicadores biológicos e as características químicas (Figura 1, Figura S2 apêndice). Esta análise evidenciou a formação de três agrupamentos, sendo o primeiro formado pela amostra UND, segundo pelas amostras REC 2 e REC 3 e terceiro pela amostra REC1. Assim, uma maior relação foi observada entre as áreas afetadas submetidas ao processo de revegetação (REC2 e REC3) em comparação com as demais, REC1 e Controle (UND). Esta análise também mostrou que todos os indicadores biológicos tais como as fosfatases, o carbono da biomassa microbiana e BG foram relacionados à área controle.

**Tabela 3.** Coeficiente de correlação de Pearson entre indicadores biológicos e características químicas de amostras da área controle (UND) e das áreas afetadas pelo rejeito de mineração de ferro (REC1, REC2 e REC3) em Paracatu de Baixo, Mariana, MG.

	AKP	ACP	BG	CBM	pH	P	CtC	O.C	O.M	qCO <sub>2</sub>	qMIC
AKP											
ACP	0,99796										
BG	0,78823	0,82467									
CBM	0,95099	0,96661	0,93533								
pH	-0,93182	-0,94641	-0,84824	-0,92092							
P	-0,98807	-0,97779	-0,68883	-0,89226	0,90872						
CtC	0,99975	0,99887	0,80085	0,95756	-0,933	-0,98441					
C.O	0,99271	0,99819	0,84807	0,97244	-0,96229	-0,968	0,99425				
M.O.	0,99273	0,99818	0,84779	0,97227	-0,9624	-0,96811	0,99425	1			
qCO <sub>2</sub>	0,85863	0,82592	0,36232	0,65961	-0,71814	-0,92506	0,84746	0,80016	0,80044		
qMIC	0,99842	0,99988	0,81762	0,96275	-0,9477	-0,98049	0,99901	0,99792	0,99793	0,83287	
RB	0,9964	0,99978	0,83583	0,97084	-0,9504	-0,97357	0,99769	0,9991	0,99909	0,81452	0,99947

AKP = Atividade da fofatase alcalina, ACP = Atividade da fosfatase ácida, BG= atividade da  $\beta$ -Glucosidase , CBM=carbono da biomassa microbiana , CtC= capacidade de troca cationica, O.C= carbono orgânico, M.O. = matéria orgânica, qCO<sub>2</sub>= quociente metabólico, qMIC= quociente microbiano, RB= respiração basal do solo.



**Figura 1.** Análise de Componentes Principais entre indicadores biológicos e características químicas do solo para a área controle (UND) e as áreas afetadas com o rejeito de mineração de ferro com revegetação espontânea (REC1) ou submetida a programas de revegetação (REC2 e REC3), localizadas em Paracatu de Baixo, Mariana, MG

## DISCUSSÃO

As características químicas mostraram profundas diferenças entre as áreas afetadas (REC1, REC2, REC3) e a área controle (UND). Os valores de pH das áreas afetadas mais alcalinos que a área controle pode ser atribuído a presença do rejeito de mineração de ferro liberado e ainda presente no solo. Durante o processamento do minério de ferro, uma das etapas é a flotação catiônica reversa, esta utiliza uma série de substâncias, como amido, eterminas, eterdiaminas, além de hidróxido de sódio separando a parte de interesse comercial e deixando o rejeito com pH próximo a 10 (PIRES et al., 2003; SILVA et al., 2006).

O valor de pH observados nas áreas afetadas pode ser prejudicial para importantes processos naturais que poderiam auxiliar no reestabelecimento da comunidade vegetal, como por exemplo a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esse processo, que tem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, depende do estabelecimento de uma relação simbiótica entre leguminosas ou gramíneas com alguns gêneros bacterianos, especialmente *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (classe  $\alpha$ -Proteobacteria), que é bastante sensível as condições ambientais, incluindo baixo ou alto pH (Júnior and Reis, 2008). Ferreira *et al.* (2016) estudando fixação biológica de nitrogênio e nodulação em *Calopogonium mucunoides*, uma das espécies usadas no programa de revegetação em Paracatu de Baixo, mostrou que o aumento nos valores de pH pode reduzir a atividade enzima nitrogenase, que é chave no processo da FBN. No estudo em questão, com solo apresentando pH 7, a atividade da nitrogenase medida foi de 0,07 versus 4,78  $\mu\text{mol H}_2 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$  em pH 5.5, sendo que em pH 7, a FBN não foi observada. Esse fato é importante para reforçar a necessidade de ajustar o pH dos solos afetados para valores em que se propicia a ocorrência dos processos biológicos, como a FBN, que é uma importante fonte de nitrogênio para planta.

A redução da matéria orgânica do solo nas áreas afetadas em relação ao controle pode ser explicada. Após passar pelo distrito de Paracatu de Baixo, a onda de rejeitos de mineração de ferro ainda percorreu centenas de quilômetros e dias após o desastre iniciou-se a estação chuvosa na região, carreando restos de vegetais, animais e biomassa microbiana, assim como outros minerais.

Atribuímos a maior concentração de fosforo observada para as áreas afetadas, ao processo periódico de fertirrigação e às técnicas de bioengenharia, como forma de conter o carreamento, aplicadas sobre estes solos (Agroflor, 2016).

No nosso estudo, a atividade de  $\beta$ -Glucosidase (BG) mostrou redução em relação a área controle, entretanto foi possível observar a influência dos programas de revegetação na recuperação destes solos pela comparação dos valores apresentados pelas amostras REC 2 e REC 3, em relação à atividade enzimática REC1. Esses resultados destacam a aplicação desta enzima para o monitoramento de recuperação de áreas degradadas, como eficiente medidora da influência da revegetação na microbiota do solo. Em áreas contaminadas com metais pesados, as atividades de BG foram as melhores que as atividades de urease, invertase, fenol oxidase e fosfatase ácida para distinguir os graus de danos, não sendo inclusive, sua análise influenciada pela presença de metais nos solo (Hinojosa *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

Os indicadores biológicos, como atividade BG, a matéria orgânica, o carbono orgânico e o carbono da biomassa microbiana são relacionados, pois atuam em distintos pontos da ciclagem de carbono. Entretanto, nesse estudo, apenas a BG foi sensível ao programa de revegetação sob o solo, indicando maior atividade dessa enzima. Nós sugerimos uma possível explicação, que a onda de rejeitos de mineração de ferro carrou parte da matéria orgânica e modificou as características químicas da região, em seguida, o programa de revegetação introduziu carbono orgânico complexo nas áreas de revegetação e nutrientes pela fertirrigação. Essa entrada de carbono orgânico e nutrientes pôde nutrir a comunidade microbiana do solo, que utiliza a enzima BG para quebrar as ligações químicas, lançando carbono orgânico assimilável para os micro-organismos. Pelo fluxo proposto nesta explicação, pode-se prever que o programa de revegetação ainda não mostrou influência sobre os valores de matéria orgânica, carbono orgânico, carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo pelo curto período de tempo implementado e aqui estudado.

Estudos em cronosequências fluxo proposto que reforça essa ideia. Quadros *et al.* (2016) estudando solos danificados pela mineração de carvão após o processo de revegetação, mostrou resultados similares, a atividade da enzima BG distinguiu mais estágios de recuperação e revegetação do solo no princípio do processo que o carbono da biomassa microbiana (CBM), o quociente metabólico, a respiração basal do solo e as atividades da enzima desidrogenase, sendo capaz de diferenciar duas áreas com 3 e 4 anos

de início de recuperação. Assim como, Escobar *et al.* (2015) verificaram em cronosequências para a recuperação de áreas de mineração, que após a revegetação houve mudanças na comunidade microbiana associadas a um aumento da abundância de grupo que atuam como decompositores associado com o aumento das atividades de BG e do CBM. Esses dois indicadores, mostram o funcionamento da ciclagem de carbono, um dos principais ciclos biogeoquímicos utilizados para avaliar a recuperação de áreas degradadas, indicando ainda um aumento da matéria orgânica no solo, um indicador químico.

Em nossos resultados, CBM respondeu apenas diferenciando áreas afetadas e controle, sem distinção em relação ao programa de revegetação, provavelmente isso se deve ao curto período do programa (9 meses), onde supomos que levará mais tempo para que a vegetação possa recuperar o carbono da biomassa microbiana do solo. O baixo valor apresentado do CBM nas áreas afetadas é um ponto que necessita atenção, já que todas as atividades relacionadas com os micro-organismos serão de certa forma prejudicadas, afetando, por exemplo, a ciclagem de nutrientes.

As fosfatases são responsáveis em converter fósforo orgânico em fósforo inorgânico tornando o mesmo disponível para a comunidade vegetal, suas atividades são sensíveis em mostrar danos ao ambiente e são utilizadas na avaliação do impacto de práticas agrícolas e de programas de revegetação sobre o solo. Estudando áreas utilizadas para mineração de carvão, mas já em processo de recuperação, Finkenbein *et al.* (2013) analisaram nove enzimas do solo. Eles observaram que a atividade da fosfatase ácida respondeu a distintos tratamentos e poderia ser utilizada como um indicador da recuperação da área. Os autores também sugeriram que a atividade desta enzima estava relacionada a limitações na concentração de fósforo no solo.

Em nosso estudo, uma correlação negativa entre a atividade das fosfatases e a concentração de fósforo no solo também foi observada, a presença de fósforo inorgânico proveniente da fertirrigação inibiu a atividade dessa enzima, assim como o pH alcalino do solo das áreas afetadas. Assim, embora tenha conseguido distinguir entre as áreas afetadas e a controle, a atividade das fosfatases no solo pode estar sendo “mascarada” por esses dois interferentes químicos e pode não ter refletido o verdadeiro grau de impacto ou de recuperação das áreas estudadas, limitando assim o uso desse indicador em futuros programas de monitoramento biológico para região estudada (Nannipieri *et al.*, 2011).

A redução de atividades enzimáticas no solo e outros indicadores biológicos, como as fosfatases (ácidas e alcalinas), BG e CBM tem sido associadas a alterações na diversidade microbiana e na perda de funções ecossistêmicas como a ciclagem de nutrientes (Li *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2016).

A biomassa microbiana é o maior reservatório de enzimas do solo, assim sendo umas das principais responsáveis pela dinâmica da matéria orgânica. Processos como a decomposição da matéria, a formação do solo e a própria revegetação podem ser promovidos pelo aumento da biomassa microbiana nos solos, por esse motivo, programas de monitoramento dão especial atenção à essas medições. Elas possibilitam uma visão global da presença microbiana no ambiente e tem sido um dos parâmetros mais utilizados ao redor do mundo para medir o impacto das ações antrópicas sobre o solo (Bastida *et al.*, 2008).

Os grupos vegetais introduzidos na área para a recuperação, leguminosas e gramíneas, possuem uma série de vantagens, como possuir crescimento rápido, aumentando de maneira rápida a matéria orgânica e a agregação do solo (Santos *et al.*, 2013). Entretanto, de acordo com Li *et al.* (2014) em curtos períodos de processos de recuperação de áreas degradadas, as características químicas do solo e ambientais são mais importantes que a vegetação para o estabelecimento da comunidade microbiana, sendo assim podemos inferir, que estas características também podem afetar os indicadores microbianos.

Nossos resultados ressaltam a necessidade do uso de indicadores biológicos para o monitoramento da recuperação do solo de áreas degradadas, já que podem mostrar de modo rápido e sensível mudanças no ambiente, que indicadores químicos, como a matéria orgânica, levariam mais tempo para indicar uma recomposição. Além disso, esses indicadores refletem o funcionamento de processos naturais dos ecossistemas, indicando o grau de funcionamento das comunidades do solo. A atividade da BG, sensível, mesmo em curto período, ao programa de revegetação implementado, pode ser utilizado como indicador ambiental de recuperação ou de mudanças no ambiente, além de ser, como já foi dito, menos influenciada pela presença de metais pesados, ou concentração de algum mineral no solo como destacado por Stott *et al.* (2010).

A respiração basal do solo, quocientes metabólico ( $qCO_2$ ) e microbiano ( $qMIC$ ) também tiveram seus valores reduzidos com relação a área controle. Os dois primeiros

indicadores referem a transformações do carbono, o primeiro representa a utilização da matéria orgânica pelos micro-organismos aeróbios do solo, o segundo, mede a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada por unidade de carbono microbiano. De maneira geral, valores altos para esses dois indicadores sugerem estresse ambiental, entretanto aqui, seu significado foi o oposto. O impacto apresentado pela área foi severo, a ponto de reduzir drasticamente os processos respiratórios no solo, resultados esses que podem estar relacionados tanto com a abrupta redução do carbono orgânico da biomassa microbiana disponíveis, quanto às características físico-químicas particulares do solo contaminado com rejeito, como a baixa capacidade de retenção de água medida (dados não mostrados), as características físicas como a granulometria e a extrema compactação observada para este rejeito (Pires *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006).

A redução do qMIC, também era esperada já que tanto CBM quanto o C.O foram significativamente reduzidos nas áreas afetadas com relação ao controle. Esse indicador, que mede a fração da biomassa microbiana no carbono orgânico total do solo, mostrou valores reduzidos em áreas degradadas, tanto em áreas agrícolas (Camylla *et al.*, 2017), quanto para áreas de mineração sob recuperação (Anderson e Domsch, 1989).

Um fato interessante, observado por Pires *et al.* (2003) é que devido a presença de geotita, este rejeito de mineração teria a capacidade de reter metais pesados, o que neste trabalho não foi avaliado. Torna-se importante essa medição, já que Santos *et al.* (2016) quando estudaram antigos sítios de mineração com metais pesados em processo de recuperação, sugeriram que a medição de indicadores como a respiração do solo, o quociente metabólico e o quociente microbiano podem sofrer interferência pela presença desses elementos e ser ainda mais reduzida. A partir dos nossos resultados, nós encorajamos nosso e outros grupos a avaliarem a presença de metais pesados nas áreas avaliadas, como forma de esclarecer esse ponto.

Diversos estudos anteriores utilizando indicadores biológicos do solo, tentaram buscar um único indicador ou índice que conseguisse mostrar o estado de saúde e qualidade do solo. Em grande parte, os pesquisadores sugerem a utilização combinada de algum indicador da atividade microbiana, tal como enzimas do solo, com alguma característica química ou concentração de determinado mineral (Chaer *et al.*, 2009; Mukherjee & Lal, 2014). Indicadores biológicos, tais como os utilizados aqui avaliam transformações ou o acúmulo de compostos provenientes da atividade de organismos do solo, entretanto como cada indicador reflete, em geral, apenas um tipo de processo

mediado pela biota do solo, apenas a avaliação de mais de um indicador relacionado a distintos processos mostrará com maior precisão o impacto ao solo de alterações ambientais. Assim, nós recomendamos, o uso de distintos indicadores biológicos para o monitoramento das regiões afetadas e dos programas de revegetação propostos visando avaliar a recuperação de atributos biológicos e químicos do solo como forma de promover e normalizar o funcionamento dos ecossistemas após o desastre ambiental.

## **CONCLUSÃO**

Neste estudo, verificamos que as características químicas e os indicadores biológicos das áreas afetadas pelo rejeito apresentam forte redução nos seus valores em relação a área controle. Os valores do pH e da concentração de fósforo, apresentaram valores maiores nas regiões afetadas, que atribuímos à composição do rejeito e à fertirrigação empregada no programa de revegetação.

A revegetação implementada nas áreas afetadas auxiliou no aumento da atividade de BG, evidenciando o início de uma recuperação da ciclagem de carbono com relação a área afetada sem revegetação em curso.

## **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

J.C, C.C e M.T definiram a pesquisa; J.C e C.C escreveram o artigo e analisaram dados; J.C, G.S e M.T realizaram os experimentos; J.C e M.K foram responsáveis pela amostragem; M.K e M.T auxiliaram com suporte financeiro o desenvolvimento da pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro no desenvolvimento dessa pesquisa e a bolsa de estudos do primeiro e segundo autor desse trabalho. Agradecemos também, a AGROFLOR Ltda por indicar os pontos nos quais as áreas de revegetação foram implementadas em Paracatu de Baixo.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não possuir nenhum tipo de conflito de interesses no presente estudo.

## REFERENCIAS

- Agroflor (2016) Contenção de carreamento de sedimentos por meio de revegetação nas áreas afetadas pelo rejeito. 62.
- Anderson, T.-H. and Domsch, K.H. (1993) The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil biology and biochemistry* **25**: 393–395.
- Bartlett, R.J. and Ross, D.S. (1988) COLORIMETRIC DETERMINATION OF OXIDIZABLE CARBON IN ACID SOIL SOLUTIONS. *Soil Science Society of America Journal* **1192**: 1191–1192.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., and García, C. (2008) Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* **147**: 159–171.
- Bowker, L.N. and Chambers, D.M. (2015) The risk, public liability & economics of tailings storage facility failures Montana, USA.
- Brasil (2015a) Encarte Especial sobre a Bacia do Rio Doce Rompimento da Barragem em Mariana/MG DF.
- Brasil (2015b) Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais.
- Camylla, P., Assis, R., Stone, L.F., and Luís, A. (2017) Biological Soil Properties in Integrated Crop-Livestock-Forest Systems. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 1–12.
- Cardoso, E.J.B.N., Vasconcellos, R.L.F., Bini, D., Miyauchi, M.Y.H., Santos, C.A. dos, Alves, P.R.L., et al. (2013) Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? *Scientia Agricola* **70**: 274–289.
- Chaer, G.M., Myrold, D.D., and Bottomley, P.J. (2009) A soil quality index based on

- the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 822–830.
- Defelipo, B.V. and Ribeiro, A.C. (1981) Análise química do solo (Metodologia) 29th ed. Viçosa.
- Escobar, I.E.C., Santos, V.M., da Silva, D.K.A., Fernandes, M.F., Cavalcante, U.M.T., and Maia, L.C. (2015) Changes in Microbial Community Structure and Soil Biological Properties in Mined Dune Areas During Re-vegetation. *Environmental Management* **55**: 1433–1445.
- Fernandes, G.W., Goulart, F.F., Ranieri, B.D., Coelho, M.S., Dales, K., Boesche, N., et al. (2016) Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza & Conservação* **4**: 35–45.
- Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciencia e Agrotecnologia* **35**: 1039–1042.
- Ferreira, T.C., Aguiar, J.V., Souza, L.A., Justino, G.C., Aguiar, L.F., and Camargos, L.S. (2016) pH effects on nodulation and biological nitrogen fixation in *Calopogonium mucunoides*. *Revista Brasileira de Botanica* **39**: 1015–1020.
- Finkenbein, P., Kretschmer, K., Kuka, K., Klotz, S., and Heilmeyer, H. (2013) Soil enzyme activities as bioindicators for substrate quality in revegetation of a subtropical coal mining dump. *Soil Biology and Biochemistry* **56**: 87–89.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., and Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4(1)**: 1–9.
- Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A., and Walenzik, G. (1989) Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infra-red gas analysis. *Plant and Soil* **116**: 191–195.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J., García-Ruiz, R., and Dick, R.P. (2004) Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 1559–1568.
- Jung, J., Philippot, L., and Park, W. (2016) Metagenomic and functional analyses of the

- consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports* 1–10.
- Júnior, P.F. and Reis, V. (2008) Algumas limitações a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. *Embrapa Agrobiologia, Seropédica.(Documentos ...*
- Li, J., Zhou, X., Yan, J., Li, H., and He, J. (2015) Effects of regenerating vegetation on soil enzyme activity and microbial structure in reclaimed soils on a surface coal mine site. *Applied Soil Ecology* **87**: 56–62.
- Li, Y., Jia, Z., Sun, Q., Zhan, J., Yang, Y., and Wang, D. (2016) Ecological restoration alters microbial communities in mine tailings profiles. *Scientific Reports* **6**: 25193.
- Li, Y., Wen, H., Chen, L., and 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**..
- Louis, B.P., Maron, P.-A., Menasseri-Aubry, S., Sarr, A., Lévêque, J., Mathieu, O., et al. (2016) Microbial Diversity Indexes Can Explain Soil Carbon Dynamics as a Function of Carbon Source. *Plos One* **11**: e0161251.
- Marta-Almeida, M., Mendes, R., Amorim, F.N., Cirano, M., and Dias, J.M. (2016) Fundao Dam collapse: Oceanic dispersion of River Doce after the greatest Brazilian environmental accident. *Marine Pollution Bulletin* **112**: 359–364.
- Mendes, L.W., Tsai, S.M., Navarrete, A.A., de Hollander, M., van Veen, J.A., and Kuramae, E.E. (2015) Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. *Microbial Ecology* **70**: 255–265.
- Miranda, L.S. and Marques, A.C. (2016) Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna – an example from the staurozoans (Cnidaria). *Biota Neotropica* **16**: 1–3.
- Mukherjee, A. and Lal, R. (2014) Comparison of soil quality index using three methods. *PLoS ONE* **9**..
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Lan Di, L., Pietramellar, G., and Renell, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**: 655.

- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., and Renella, G. (2011) Phosphorus in Action. *Soil Biology* **26**: 215–243.
- Narendrula-Kotha, R. and Nkongolo, K.K. (2017) Changes in enzymatic activities in metal contaminated and reclaimed lands in Northern Ontario (Canada). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **140**: 241–248.
- Paz-Ferreiro, J. and Fu, S. (2016) Biological Indices for Soil Quality Evaluation: Perspectives and Limitations. *Land Degradation and Development* **27**: 14–25.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., and McMahon, T. a. (2006) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Meteorologische Zeitschrift* **15**: 259–263.
- Pires, J.M.M., Lena, J.C. de, Machado, C.C., and Pereira, R.S. (2003) Potencial poluidor de resíduo sólido da Samarco Mineração: Estudo de caso da barragem de Germano. *Revista Árvore* **27**: 393–397.
- Quadros, P.D. de, Zhalnina, K., Davis-Richardson, A.G., Drew, J.C., Menezes, F.B., Camargo, F.A. de O., and Triplett, E.W. (2016) Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Applied Soil Ecology* **98**: 195–203.
- Reboita, M.S., Rodrigues, M., Silva, L.F., and Alves, M.A. (2016) Aspectos climáticos do estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Climatologia* **18**: 307–326.
- Samarco (2016) UM ANO DO ROMPIMENTO DE FUNDÃO. 37.
- Santos, J.V. dos, De Melo Rangel, W., Azarias Guimarães, A., Duque Jaramillo, P.M., Rufini, M., Marra, L.M., et al. (2013) Soil biological attributes in arsenic-contaminated gold mining sites after revegetation. *Ecotoxicology* **22**: 1526–1537.
- Santos, J.V. dos, Varónn-López, M., Fonsêca Sousa Soares, C.R., Lopes Leal, P., Siqueira, J.O., and de Souza Moreira, F.M. (2016) Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 6735–6748.
- Segura, F.R., Nunes, E.A., Paniz, F.P., Paulelli, A.C.C., Rodrigues, G.B., Braga, G. ??bida L., et al. (2016) Potential risks of the residue from Samarco’s mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution* **218**: 813–825.

- Sheoran, V., Sheoran, A.S., and Poonia, P. (2010) Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation : A Review. *International Journal of Soil, Sediment and Water* **3**: 1–21.
- Silva, G.P., Fontes, M.P.F., da Costa, L.M., and de Barros, N.F. (2006) Caracterização química, física e mineralógica de estéreis e rejeito da mineração de ferro da mina de Alegria, Mariana-MG. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **36**: 45–52.
- Sparling, G.P. (1992) Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research* **30**: 195–207.
- Stott, D.E., Andrews, S.S., Liebig, M.A., Wienhold, B.J., and Karlen, D.L. (2010) Evaluation of  $\beta$ -Glucosidase Activity as a Soil Quality Indicator for the Soil Management Assessment Framework. *Soil Science Society of America Journal* **74**: 107.
- Tabatabai, M.A. (1994) Soil Enzymes. In, Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomley, P.S. (ed), *Methods of Soil Analyses , Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 755–833.
- Vance, E., Brookes, P., and Jenkinson, D. (1987) An extration method for measuring Microbial Biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* **19**: 703–707.
- Zhang, C., Huang, L., Luan, T., Jin, J., and Lan, C. (2006) Structure and function of microbial communities during the early stages of revegetation of barren soils in the vicinity of a Pb/Zn Smelter. *Geoderma* **136**: 555–565.

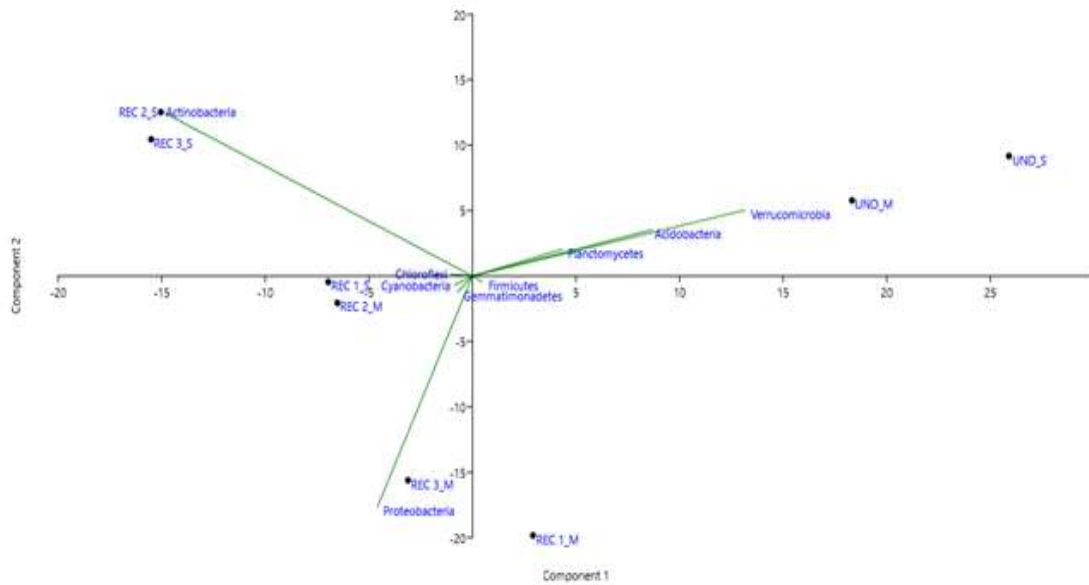
## **CONCLUSÕES GERAIS:**

O desastre ambiental proveniente do rompimento da barragem de rejeitos de mineração de Fundão alterou a estrutura da comunidade bacteriana do solo, aumentou a diversidade biológica nas áreas afetadas, as características químicas e afetou reduzindo a atividade de indicadores biológicos das funções desempenhadas especialmente por micro-organismos do solo afetados.

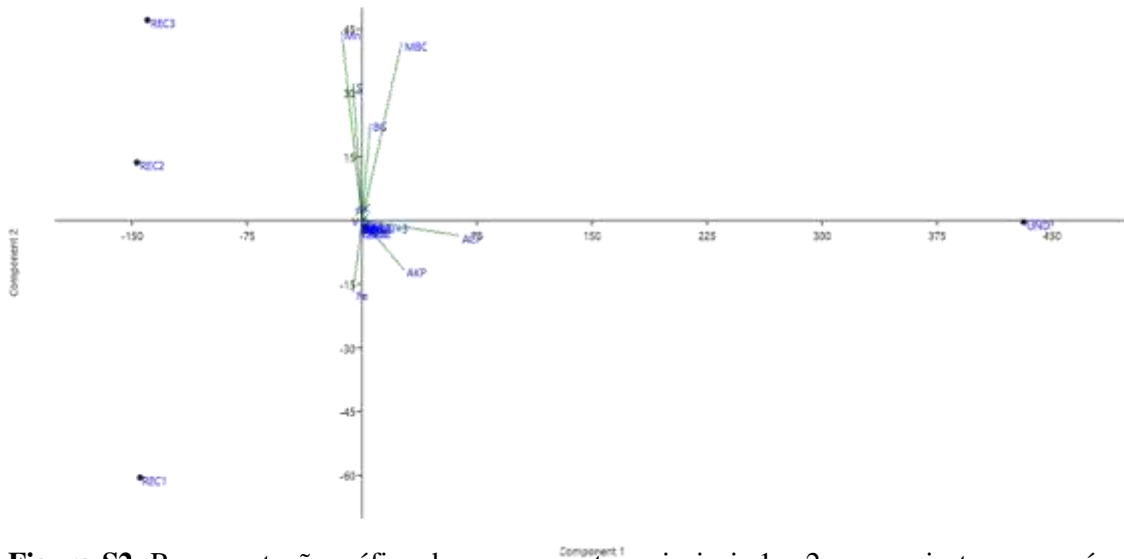
O programa de revegetação implementado mesmo em curto prazo atuou em curto prazo aumentando a atividade da beta glicosidase, um indicador biológico para a ciclagem de carbono avaliado, bem como influenciou a alteração da abundância relativa, com aumento da abundância relativa dos filos Actinobacteria e Bacteroidetes e a dominância do filo Proteobacteria.

A comunidade bacteriana e os indicadores biológicos aqui estudados podem ser utilizados para o monitoramento das regiões afetadas e em recuperação na bacia do Rio Doce por se mostrarem sensíveis as mudanças decorrentes do desastre e as medidas de revegetação adotadas.

## APÊNDICE:



**Figura S1.** Representação gráfica dos componentes principais 1 e 2, em conjunto responsáveis por 96,91% da variância, da Análise de Componentes Principais (PCA) entre áreas estudadas/coletas realizadas e a abundância relativa para o nível de filo (80% de similaridade nucleotídica).



**Figura S2.** Representação gráfica dos componentes principais 1 e 2, em conjunto responsáveis por 99,2% da variância, da Análise de Componentes Principais (PCA) entre áreas estudadas, as características químicas e os indicadores biológicos do solo estudados.

**Tabela S1.** (a): Resultados da Análise de componentes principais entre Áreas, coletas e abundâncias relativas de filos bacterianos. (b): Resultados da Análise de componentes principais entre Áreas e indicadores biológicos e químicos para a segunda coleta. PC = componente principal.

PC	-----a-----		-----b-----	
	Valor	% Variância	Valor	% Variância
1	231,329	57,782	80059,8	98,893
2	156,662	39,131	795,117	0,8216
3	8,33381	2,0816	101,222	0,12503
4	2,29472	0,57318	-	-
5	1,5054	0,37602	-	-
6	0,183088	0,045732	-	-
7	0,0427102	0,010668	-	-

**Tabela S2.** Localização georeferenciada das áreas de amostragem e respectivo código das áreas de amostragem citado ao longo dos capítulos. Todas as áreas pertencentes ao distrito de Paracatu de Baixo, município de Mariana, zona da mata, Minas Gerais.

Área de amostragem	Código	Latitude	Longitude
Área controle	UND 1	20° 18' 8,94"	43° 14' 15,72"
	UND 2	20° 18' 9,15"	43° 14' 14,88"
	UND 3	20° 18' 8,16"	43° 14' 12,99"
Afetada/ revetação natural	REC1-1	20° 18' 8,73"	43° 14' 11,13"
	REC1-2	20° 18' 7,38"	43° 14' 11,32"
	REC1-3	20° 18' 10,33"	43° 14' 14,20"
Afetada c/ programa de revegetação	REC2-1	20° 17' 57,01"	43° 14' 13,33"
	REC2-2	20° 17' 56,17"	43° 14' 13,55"
	REC2-3	20° 17' 55,67"	43° 14' 12,35"
Afetada c/ programa de revegetação	REC3-1	20° 18' 12,36"	43° 13' 57,26"
	REC3-2	20° 18' 11,82"	43° 13' 57,40"
	REC3-3	20° 18' 11,18"	43° 13' 58,26"

**Figura S3.** Mapas das áreas amostras em Paracatu de Baixo, Mariana, Minas Gerais. Pontos marcados em amarelo representam áreas de amostragem. UND= área controle; REC1=área afetada sem programa de revegetação; REC2 e REC3= área afetada com programa de revegetação em andamento. Fonte da imagem: Google Earth; Data da imagem: Junho de 2017.



**Tabela S3.** Médias das abundâncias relativas ao nível de filo, 80% de similaridade, para as áreas e coletas realizadas. Grupos cuja abundância relativa apresentou menos de 1% do total de leituras para o sequenciamento foram agrupados no grupo artificial “others”.

	UND M	UND S	REC1 M	REC1 S	REC2 M	REC2 S	REC3 M	REC3 S
Acidobacteria	<b>14,40%</b>	<b>17,7%</b>	<b>5,77%</b>	4,34%	2,58%	3,28%	1,79%	2,38%
Actinobacteria	11,87%	8,24%	<b>7,33%</b>	<b>24,58%</b>	<b>22,56%</b>	<b>37,88%</b>	<b>14,46%</b>	<b>36,75%</b>
Bacteroidetes	1,76%	1,22%	3,11%	3,22%	<b>7,37%</b>	<b>7,50%</b>	<b>10,19%</b>	<b>6,90%</b>
Chloroflexi	1,51%	1,15%	1,67%	<b>6,21%</b>	1,90%	2,26%	1,66%	2,72%
Cyanobacteria	0,73%	0,12%	1,97%	1,57%	3,53%	1,00%	1,16%	1,67%
Firmicutes	1,99%	1,98%	2,51%	1,78%	1,53%	1,21%	1,50%	1,20%
Gemmatimonade tes	1,04%	0,62%	3,33%	2,21%	3,90%	1,76%	1,55%	1,45%
Planctomycetes	6,65%	9,65%	1,86%	3,14%	2,24%	1,28%	1,15%	1,03%
Proteobacteria	<b>38,89%</b>	<b>33,9%</b>	<b>62,96%</b>	<b>46,57%</b>	<b>48,36%</b>	<b>40,01%</b>	<b>60,37%</b>	<b>42,28%</b>
Verrucomicrobia	<b>19,70%</b>	<b>24,2%</b>	4,04%	1,62%	2,24%	1,80%	3,90%	1,46%
Others	1,47%	1,05%	5,44%	4,77%	3,80%	2,02%	2,26%	2,15%

**Legenda:** UND = Área controle não afetada; REC1= área afetada e sem programa de revegetação em curso; REC2 e REC3= áreas afetadas com programas de revegetação e bioengenharia; M= primeira coleta Março/2016; S= segunda coleta setembro/2016.

**Tabela S4.** Médias das abundâncias relativas (n=3) ao nível de classe, para as áreas e coletas realizadas e total de leituras dos grupos entre as amostras sequenciadas. Valores destacados mostram os 3 grupos com maior abundância relativa dentro de cada amostra. Grupos com abundância relativa total no sequenciamento maior que 0,5%.

	UND M	UND S	REC1 M	REC1 S	REC2 M	REC2 S	REC3 M	REC3 S
OPB35 soil group	1,50%	2,10%	0,70%	0,90%	0,37%	0,63%	0,43%	0,43%
Opitutae	0,07%	0,00%	2,13%	0,53%	0,77%	0,30%	1,30%	0,40%
Spartobacteria	<b>18,00%</b>	<b>22,00%</b>	1,13%	0,10%	0,73%	0,77%	0,37%	0,50%
Alphaproteobacteria	<b>26,87%</b>	<b>24,53%</b>	<b>41,00%</b>	<b>26,37%</b>	<b>27,47%</b>	<b>24,43%</b>	<b>32,20%</b>	<b>28,77%</b>
Betaproteobacteria	2,63%	1,73%	<b>8,70%</b>	6,63%	<b>8,63%</b>	<b>9,90%</b>	7,87%	<b>7,13%</b>
Deltaproteobacteria	6,17%	4,90%	4,57%	5,00%	5,73%	3,23%	3,10%	2,70%
Gammaproteobacteria	3,10%	2,70%	<b>7,63%</b>	<b>8,23%</b>	5,37%	2,30%	<b>15,77%</b>	3,23%
Planctomycetacia	5,83%	<b>9,13%</b>	1,50%	2,63%	1,60%	0,93%	1,00%	0,73%
Nitrospira	0,77%	0,60%	0,80%	0,60%	0,33%	0,20%	0,23%	0,30%
Gemmatimonadetes	1,00%	0,63%	3,23%	1,87%	3,10%	1,37%	1,50%	1,23%
Bacilli	1,77%	1,47%	1,30%	0,90%	1,13%	1,03%	1,00%	0,77%
Sphingobacteria	1,37%	1,00%	2,07%	1,97%	4,77%	4,13%	6,10%	3,90%
Cytophagia	0,17%	0,17%	0,77%	1,20%	2,30%	3,27%	3,60%	2,83%
Thermoleophilia	3,70%	2,40%	1,20%	3,87%	1,13%	3,53%	0,43%	2,57%
Actinobacteria	<b>6,90%</b>	4,80%	3,57%	<b>10,20%</b>	<b>17,57%</b>	<b>28,73%</b>	<b>11,63%</b>	<b>26,07%</b>
Acidimicrobiia	1,10%	0,93%	2,40%	7,43%	3,17%	4,67%	2,00%	6,57%
Acidobacteria/ Subgrupo 6	4,53%	2,80%	1,80%	2,73%	1,47%	2,40%	0,60%	1,87%
Acidobacteria/ Subgrupo 2	2,20%	3,57%	0,13%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Blastocatellia	1,17%	0,37%	1,43%	0,17%	0,17%	0,33%	0,33%	0,10%
Acidobacteria	3,33%	6,23%	0,30%	0,13%	0,03%	0,10%	0,03%	0,03%

**Legenda:** UND = Área controle não afetada; REC1= área afetada e sem programa de revegetação em curso; REC2 e REC3= áreas afetadas com programas de revegetação e bioengenharia; M= primeira coleta Março/2016; S= segunda coleta setembro/2016.

**Tabela S5.** Médias das abundâncias relativas (n=3) ao nível de ordem, para as áreas e coletas realizadas e total de leituras dos grupos entre as amostras sequenciadas. Valores destacados mostram os 3 grupos com maior abundância relativa dentro de cada amostra. Grupos com abundância relativa total no sequenciamento maior que 0,5%.

	UND M	UND S	REC1 M	REC1 S	REC2 M	REC2 S	REC3 M	REC3 S
Acidobacteriales	3,33%	6,23%	0,30	0,13%	0,03%	0,10%	0,03%	0,03%
Blastocatellales	1,17%	0,37%	1,43	0,17%	0,17%	0,33%	0,33%	0,10%
Solibacterales	1,77%	3,50%	1,43	0,63%	0,67%	0,33%	0,63%	0,27%
Acidimicrobiales	1,10%	0,93%	2,40	<b>7,43%</b>	3,17%	4,67%	2,00%	<b>6,57%</b>
Frankiales	1,33%	2,43%	1,40	1,20%	1,53%	1,93%	0,57%	1,63%
Kineosporiales	0,07%	0,00%	0,00	0,30%	1,10%	0,63%	0,37%	1,23%
Micrococcales	0,20%	0,07%	0,80	4,07%	<b>9,50%</b>	<b>13,90%</b>	6,77%	<b>13,03%</b>
Micromonosporales	2,53%	0,93%	0,37	0,40%	1,27%	1,80%	1,80%	1,20%
Propionibacteriales	0,33%	0,10%	0,47	2,50%	3,10%	5,27%	1,13%	4,67%
Pseudonocardiales	0,57%	0,27%	0,07	1,27%	0,60%	3,07%	0,40%	2,10%
Streptomycetales	0,90%	0,47%	0,17	0,23%	0,33%	1,67%	0,27%	0,87%
Streptomycetales	0,90%	0,47%	0,17	0,23%	0,33%	1,67%	0,27%	0,87%
Gaiellales	1,63%	1,13%	0,60	1,97%	0,37%	0,93%	0,17%	0,73%
Solirubrobacterales	2,07%	1,27%	0,57	1,90%	0,73%	2,63%	0,27%	1,87%
Sphingobacteriales	1,37%	1,00%	2,07	1,97%	4,77%	4,13%	6,10%	3,90%
Bacillales	1,77%	1,37%	1,27	0,90%	1,13%	0,97%	1,00%	0,73%
Gemmatimonadales	1,00%	0,63%	3,23	1,87%	3,10%	1,37%	1,50%	1,23%
Nitrospirales	0,77%	0,60%	0,80	0,60%	0,33%	0,20%	0,23%	0,30%
Planctomycetales	<b>5,83%</b>	<b>9,13%</b>	1,50	2,63%	1,60%	0,93%	1,00%	0,73%
Caulobacterales	0,77%	0,43%	1,20	0,67%	1,30%	0,97%	2,07%	1,70%
Rhizobiales	<b>18,6%</b>	<b>17,00%</b>	<b>31,97</b>	<b>16,1%</b>	<b>12,6%</b>	<b>10,40%</b>	<b>17,77%</b>	<b>15,53%</b>
Rhodobacterales	0,03%	0,00%	0,90	0,37%	1,03%	1,60%	1,87%	1,17%
Rhodospirillales	5,60%	6,27%	2,97	3,53%	2,83%	2,63%	2,53%	4,17%
Sphingomonadales	1,40%	0,60%	3,63	5,37%	<b>8,03%</b>	<b>8,73%</b>	<b>7,40%</b>	6,10%
Burkholderiales	1,37%	0,80%	<b>4,00</b>	1,97%	6,33%	7,87%	5,67%	4,97%
Nitrosomonadales	0,33%	0,27%	2,63	3,00%	1,23%	1,23%	0,83%	1,10%
Myxococcales	2,70%	2,10%	1,83	2,97%	2,80%	1,90%	1,53%	1,63%
Legionellales	0,37%	0,20%	0,67	0,90%	0,80%	0,10%	1,07%	0,30%
Pseudomonadales	0,03%	0,00%	0,70	0,43%	0,57%	0,23%	3,37%	0,20%
Xanthomonadales	2,53%	2,40%	<b>5,03</b>	<b>5,93%</b>	3,53%	1,37%	<b>10,43%</b>	2,00%
Opitutales	0,03%	0,00%	2,13	0,53%	0,77%	0,30%	1,27%	0,37%
Chthoniobacterales	<b>18%</b>	<b>22%</b>	1,13	0,10%	0,73%	0,77%	0,37%	0,50%

**Legenda:** UND = Área controle não afetada; REC1= área afetada e sem programa de revegetação em curso; REC2 e REC3= áreas afetadas com programas de revegetação e bioengenharia; M= primeira coleta Março/2016; S= segunda coleta setembro/2016.

**Tabela S6.** Médias das abundâncias relativas (n=3) ao nível de família, para as áreas e coletas realizadas e total de leituras dos grupos entre as amostras sequenciadas. Valores destacados mostram os 3 grupos com maior abundância relativa dentro de cada amostra. Grupos com abundância relativa total no sequenciamento maior que 0,5%.

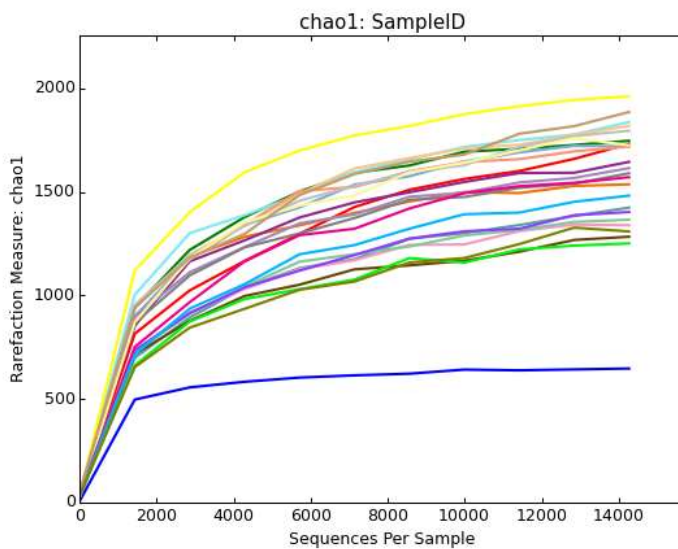
	UND M	UND S	REC1 M	REC1 S	REC2 M	REC2 S	REC3 M	REC3 S
Solibacteraceae (Subgrupo 3)	1,77%	3,50%	1,43%	0,63%	0,67%	0,33%	0,63%	0,27%
Intrasporangiaceae	0,03%	0,00%	0,30%	1,30%	2,30%	2,73%	0,53%	1,87%
Micrococcaceae	0,00%	0,00%	0,23%	1,00%	<b>6,37%</b>	<b>10,13%</b>	4,97%	<b>9,47%</b>
Micromonosporaceae	2,53%	0,93%	0,37%	0,40%	1,27%	1,80%	1,80%	1,20%
Nocardioidaceae	0,33%	0,10%	0,47%	2,50%	3,10%	<b>5,27%</b>	1,13%	4,67%
Pseudonocardiaceae	0,57%	0,27%	0,07%	1,27%	0,60%	3,07%	0,40%	2,10%
Cytophagaceae	0,17%	0,17%	0,70%	1,03%	2,30%	3,23%	3,43%	2,53%
Chitinophagaceae	1,30%	0,90%	1,43%	1,80%	3,90%	3,37%	<b>5,00%</b>	3,13%
Gemmatimonadaceae	1,00%	0,63%	3,23%	1,87%	3,10%	1,37%	1,50%	1,23%
Planctomycetaceae	<b>5,83%</b>	<b>9,13%</b>	1,50%	2,63%	1,60%	0,93%	1,00%	0,73%
Bradyrhizobiaceae	5,33%	3,37%	1,43%	1,27%	1,17%	1,57%	2,10%	1,57%
Hyphomicrobiaceae	2,10%	0,70%	1,37%	2,63%	2,43%	1,50%	3,30%	2,30%
Rhizobiaceae	0,90%	0,53%	<b>21,70%</b>	1,70%	2,20%	1,37%	<b>7,23%</b>	<b>5,20%</b>
Xanthobacteraceae	<b>6,67%</b>	<b>8,23%</b>	<b>4,60%</b>	<b>5,77%</b>	2,63%	1,73%	2,23%	2,67%
Rhodospirillaceae	0,80%	0,23%	1,70%	1,83%	1,90%	1,17%	1,47%	1,90%
Sphingomonadaceae	1,37%	0,60%	3,00%	<b>5,00%</b>	<b>7,17%</b>	<b>7,93%</b>	<b>7,00%</b>	<b>5,23%</b>
Comamonadaceae	0,47%	0,27%	<b>3,30%</b>	1,03%	<b>4,00%</b>	3,00%	3,77%	2,17%
Oxalobacteraceae	0,07%	0,07%	0,47%	0,63%	2,00%	4,67%	1,27%	2,63%
Nitrosomonadaceae	0,33%	0,27%	2,60%	2,93%	1,23%	1,23%	0,83%	1,10%
Solimonadaceae	0,00%	0,00%	2,40%	3,10%	1,67%	0,43%	0,73%	0,73%
Xanthomonadaceae	0,23%	0,20%	1,50%	1,70%	1,53%	0,67%	9,33%	0,73%
Chthoniobacterales/DA101	<b>15,30%</b>	<b>18,63%</b>	0,90%	0,03%	0,00%	0,00%	0,07%	0,07%

**Legenda:** UND = Área controle não afetada; REC1= área afetada e sem programa de revegetação em curso; REC2 e REC3= áreas afetadas com programas de revegetação e bioengenharia; M= primeira coleta Março/2016; S= segunda coleta setembro/2016.

**Tabela S7.** Médias das abundâncias relativas (n=3) ao nível de gênero, para as áreas e coletas realizadas e total de leituras dos grupos entre as amostras sequenciadas. Valores destacados são os 3 grupos com maior abundância relativa dentro da amostra. Grupos com abundância relativa total no sequenciamento maior que 0,4%.

	UND M	UND S	REC1 M	REC1 S	REC2 M	REC2 S	REC3 M	REC3 S
<i>Iamia</i>	0,03%	0,00%	0,33%	1,30%	0,23%	0,33%	0,17%	0,73%
<i>Acidothermus</i>	0,97%	2,13%	0,17%	0,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>Arthrobacter</i>	0,00%	0,00%	0,20%	0,60%	<b>4,97%</b>	<b>8,97%</b>	2,13%	<b>5,70%</b>
<i>Paenarthrobacter</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,27%	1,37%	1,13%	2,80%	3,73%
<i>Micromonospora</i>	0,23%	0,03%	0,00%	0,10%	0,27%	0,60%	1,17%	0,63%
<i>Nocardioides</i>	0,20%	0,07%	0,43%	2,10%	<b>3,03%</b>	<b>4,97%</b>	1,03%	4,23%
<i>Streptomyces</i>	0,90%	0,47%	0,17%	0,23%	0,33%	1,67%	0,27%	0,87%
<i>Solirubrobacter</i>	0,43%	0,13%	0,23%	0,40%	0,40%	1,37%	0,07%	0,67%
<i>Flavisolibacter</i>	0,00%	0,00%	0,10%	0,30%	0,30%	0,97%	0,33%	0,73%
<i>Flavitalea</i>	0,03%	0,00%	0,17%	0,47%	0,60%	0,53%	0,73%	0,67%
<i>Bacillus</i>	1,10%	0,83%	0,23%	0,53%	0,37%	0,47%	0,17%	0,40%
<i>Phenyllobacterium</i>	0,40%	0,23%	0,40%	0,37%	0,40%	0,37%	0,50%	0,43%
<i>Bradyrhizobium</i>	<b>4,87%</b>	<b>3,23%</b>	0,97%	0,67%	0,43%	1,00%	0,97%	0,70%
<i>Devosia</i>	0,27%	0,03%	0,40%	0,77%	1,83%	1,07%	2,53%	1,53%
<i>Mesorhizobium</i>	0,47%	0,10%	0,13%	0,40%	0,70%	0,50%	0,30%	0,43%
<i>Ensifer</i>	0,03%	0,07%	0,03%	0,27%	0,77%	0,23%	1,23%	0,93%
<i>Rhizobium</i>	0,87%	0,50%	<b>21,63%</b>	1,37%	1,23%	1,13%	<b>5,17%</b>	3,97%
<i>Variibacter</i>	<b>3,03%</b>	<b>4,77%</b>	<b>3,43%</b>	<b>5,07%</b>	1,90%	1,20%	1,40%	2,03%
<i>Paracoccus</i>	0,00%	0,00%	0,20%	0,07%	0,63%	0,23%	1,40%	0,60%
<i>Rubellimicrobium</i>	0,00%	0,00%	0,67%	0,23%	0,37%	1,33%	0,33%	0,47%
<i>Sphingomonas</i>	1,17%	0,53%	<b>2,70%</b>	<b>4,50%</b>	<b>6,10%</b>	<b>6,90%</b>	<b>5,53%</b>	<b>4,27%</b>
<i>H16</i>	2,60%	<b>2,43%</b>	0,33%	0,33%	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%
<i>Geobacter</i>	0,03%	0,03%	0,20%	0,50%	1,77%	0,20%	0,33%	0,07%
<i>Pseudomonas</i>	0,03%	0,00%	0,20%	0,27%	0,47%	0,17%	3,17%	0,20%
<i>Polycyclovorans</i>	0,00%	0,00%	2,37%	<b>3,03%</b>	1,57%	0,43%	0,73%	0,73%
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,03%	0,33%	0,03%	<b>5,33%</b>	0,23%
<i>Acidibacter</i>	<b>1,73%</b>	1,97%	0,53%	0,40%	0,10%	0,13%	0,10%	0,17%
<i>Opitutus</i>	0,03%	0,00%	2,13%	0,53%	0,77%	0,30%	1,27%	0,37%

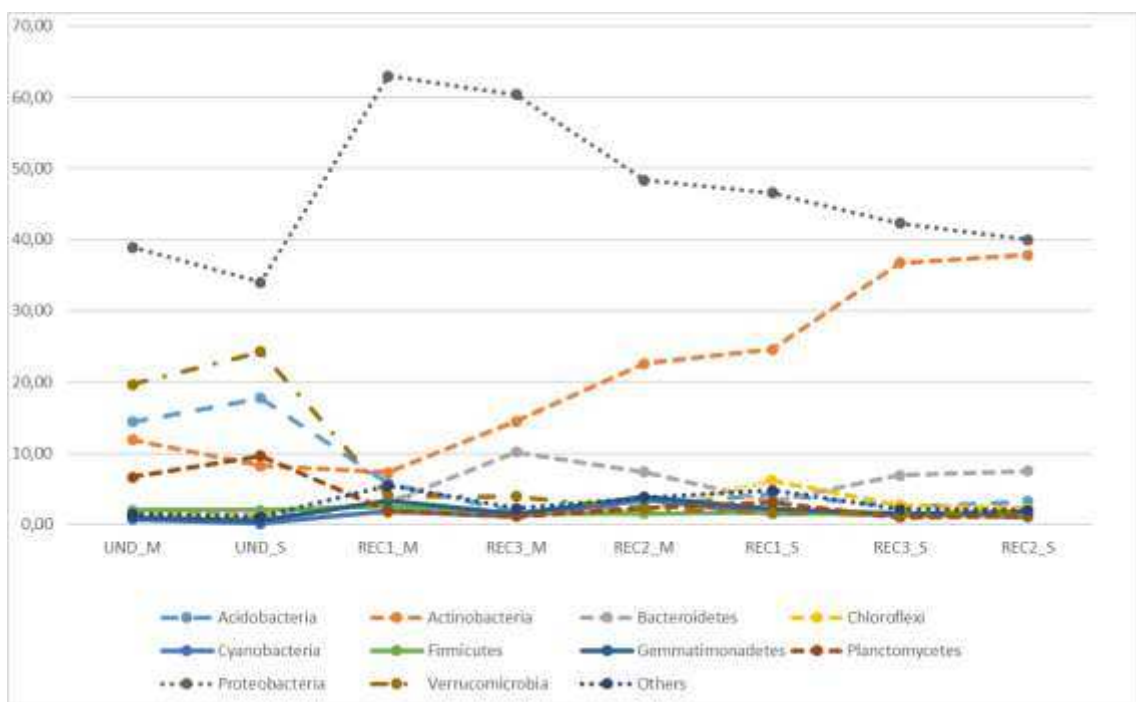
**Legenda:** UND = Área controle não afetada; REC1= área afetada e sem programa de revegetação em curso; REC2 e REC3= áreas afetadas com programas de revegetação e bioengenharia; M= primeira coleta Março/2016; S= segunda coleta setembro/2016.



UND M 1	REC1_1_M	REC2_1_M	REC3_1_M
UND M 2	REC1_2_M	REC2_2_M	REC3_2_M
UND M 3	REC1_3_M	REC2_3_M	REC3_3_M
UND S 1	REC1_1_S	REC2_1_S	REC3_1_S
UND S 2	REC1_2_S	REC2_2_S	REC3_2_S
UND S 3	REC1_3_S	REC2_3_S	REC3_3_S

**Legenda:** UND = Área controle não afetada; REC1= área afetada e sem programa de revegetação em curso; REC2 e REC3= áreas afetadas com programas de revegetação e bioengenharia; M= primeira coleta Março/2016; S= segunda coleta setembro/2016. Números após a identificação da área indicam número da replicata.

**Figura S4.** Representação gráfica das curvas de rarefação entre o número de seqüências obtidas e o estimador de riqueza de Chao-1 para o nível de OTU, 97% de similaridade, para as amostras coletadas e cada uma de suas réplicas no total de 24 curvas. Tendência ao platô indica melhor esforço amostral do sequenciamento realizado com relação a riqueza estimada da comunidade bacteriana nas amostras.



**Figura S5.** Linha temporal hipotética da evolução da abundância relativa com base nas distintas áreas amostradas e nos dois períodos de coleta estudados para o nível de filo, 80 % de similaridade. Grupos cuja abundância relativa total no sequenciamento foram menores que 1 % foram somados no grupo artificial “Others”.