

LETÍCIA DE SOUZA FERREIRA

**MICROBIOTA E ATIVIDADE FUNCIONAL DA ÁREA EM REABILITAÇÃO
AFETADA PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE REJEITOS EM
BRUMADINHO-MG**

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

Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva

Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kayasuya

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F383m
2022

Ferreira, Letícia de Souza, 1997-
Microbiota e atividade funcional da área em reabilitação
afetada pelo rompimento da barragem em Brumadinho-MG /
Letícia de Souza Ferreira. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (96 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.
Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2022.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.017>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Solos - Poluição - Brumadinho (MG). 2. Recuperação
ecológica - Brumadinho (MG). 3. Flora microbiana.
4. Marcadores genéticos. I. Silva, Cynthia Canêdo da, 1978-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 577.5727

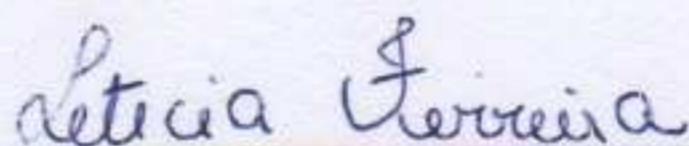
LETÍCIA DE SOUZA FERREIRA

**MICROBIOTA E ATIVIDADE FUNCIONAL DA ÁREA EM REABILITAÇÃO
AFETADA PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE REJEITOS EM
BRUMADINHO-MG**

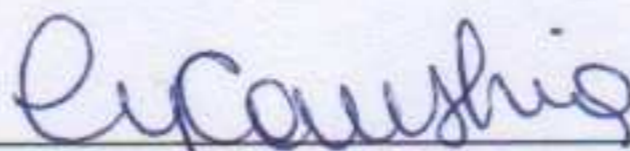
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de outubro de 2022.

Assentimento:



Letícia de Souza Ferreira
Autora



Cynthia Canêdo da Silva
Orientadora

*Aos meus familiares e amigos,
e a todos aqueles que perderam uma
pessoa amada neste desastre.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Aparecida de Souza Moraes Ferreira e Adriano Assis Ferreira que apesar de todas as dificuldades me criaram com muito amor e me ensinaram a ser uma boa pessoa, obrigado por acreditarem em mim e me darem todo suporte para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

Ao meu irmão Wesley Ferreira, por de sua maneira, cuidar de minha família e estar sempre ao meu lado me incentivando, por todo amor e carinho.

A minha vó Rosa e tia Maria por todo amor e carinho, por estarem sempre torcendo por mim e me colocando em suas orações, à minha vó Georgina que olha por mim e se mantém viva em meu coração.

A Larissa Neri, por ser minha âncora independentemente de onde eu esteja, por todos choros e sorrisos compartilhadas nessa caminhada, por trazer ao mundo Analua, que trouxe leveza aos meus dias e me fez acreditar em mundo melhor, por toda amizade, por todo incentivo, por todo amor.

A Yohana Lino pela amizade eterna, por vibrar comigo minhas conquistas e compartilhar as suas, por me incentivar e orar por mim, por todo carinho e amor.

A Helena Santiago, por ser mais que uma amiga, por estar comigo em todos os desafios desta jornada e sempre me incentivar, por todos os sorrisos, conversas boas e implicâncias, obrigado por compartilhar comigo toda sua inteligência para que este trabalho fosse concluído.

Ao Alex Castro por ser um técnico e amigo incrível, por todas conversas e cafés, por compartilhar comigo toda sua expertise e me ajudar a solucionar os problemas mais inéditos nos experimentos realizados.

Aos amigos que fiz nesta jornada, em especial Déborah, Paula, Douglas, Amanda, Nicolly, Lutécia e John por tornaram meus dias mais alegres dentro e fora do laboratório.

A minha orientadora, Cynthia Canêdo da Silva, por me acolher em seu laboratório e acreditar no meu potencial, por todos os ensinamentos e por me ajudar a crescer profissionalmente.

A coorientadora Maria Catarina Megumi Kasuya, por todos ensinamentos, conversas e incentivos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições ao trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Vale, Diego Acineto e Igor Assis pelo suporte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

“As decisões eram apenas o começo de alguma coisa. Quando alguém tomava uma decisão, na verdade estava mergulhando numa correnteza poderosa, que levava a pessoa para um lugar que jamais havia sonhado na hora de decidir”.

Paulo Coelho.

RESUMO

FERREIRA, Letícia de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2022. **Microbiota e atividade funcional da área em reabilitação afetada pelo rompimento da barragem de rejeitos em Brumadinho-MG.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya.

É inegável que a atividade de mineração no Brasil tenha grande importância econômica, contudo, esse tipo de extrativismo é um processo de grande impacto ambiental. Em janeiro de 2019, a barragem B1 de contenção de rejeitos da Mina Córrego do Feijão em Brumadinho-MG se rompeu liberando cerca de 12 milhões de m³ de rejeito, ficando conhecido como um dos maiores desastres ambientais e de perdas humanas do Brasil. Fez-se então necessário planos para restaurar os ambientes naturais com intuito de garantir o retorno dos serviços ecossistêmicos do habitat de forma sustentável. A mineradora Vale retirou os rejeitos da área afetada, aplicando um projeto piloto de reabilitação denominado Marco Zero, desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana do solo como parte do monitoramento das atividades de recuperação ambiental nas áreas do Marco Zero. Para isso, foi realizado sequenciamento de 16S rRNA bacteriano para caracterizar a comunidade microbiana, bem como prever as funções com ênfase nos ciclos biogeoquímicos destes no solo, foi realizado também a quantificação da comunidade microbiana e das comunidades que potencialmente participam do ciclo do nitrogênio. Os resultados observados mostraram que a área em reabilitação afetada com o rejeito de mineração apresentou os índices de diversidade sem diferença estatística com a área de referência. Entretanto, a PcoA revelou que a área em reabilitação é diferente ($p > 0,05$) da área referência e a análise LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*) mostrou um maior número de grupos bioindicadores relacionados a remoção de metais pesados na área restaurada, assim como funções relacionadas a degradação de hidrocarbonetos e compostos aromáticos. A quantificação da comunidade microbiana avaliadas pelo gene rRNA 16S e das populações que potencialmente participam do ciclo do nitrogênio avaliadas pelos genes *amoA* e *narG* não apresentam um padrão claro de diferenciação entre as áreas em reabilitação e as referências, contudo, a presença desses genes foi um indicativo da funcionalidade do ciclo do N nestes ambientes. Ao analisar os pontos relativos à área de reabilitação - pontos de coleta perto da calha do ribeirão (PT1), e os pontos

próximos à floresta (PT3) - foi possível observar na análise de PcoA e nos índices de diversidade que eles divergiram entre si no período seco, onde PT1 apresentou menores índices de diversidade, e no período chuvoso, essa diferença diminuiu, indicando a umidade como um potencial fator de alteração da comunidade microbiana nas áreas em reabilitação. Isto é um indicativo que o monitoramento da área é de extrema importância para garantir o sucesso do programa piloto de reabilitação, para que ela exiba uma comunidade cada vez mais próxima a uma comunidade microbiana que consegue exercer seus serviços ecossistêmicos.

Palavras-chave: Marco Zero. RNAr 16S. Ribeirão Ferro-Carvão.

ABSTRACT

FERREIRA, Letícia de Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2022. **Microbiota and functional activity of the rehabilitation area affected by the collapse of the tailings dam in Brumadinho-MG.** Adviser: Cynthia Canêdo da Silva. Co-adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya.

It is undeniable that mining activity in Brazil is of great economic importance, however, this type of extractivism is a process of great environmental impact. In January 2019, the B1 tailings dam of the Córrego do Feijão Mine in Brumadinho-MG broke, releasing about 12 million m³ of tailings, becoming known as one of the biggest environmental disasters and human losses in Brazil. Plans were then needed to restore the natural environments in order to guarantee the return of the ecosystem services of the habitat in a sustainable way. The mining company Vale removed the tailings from the affected area, applying a pilot rehabilitation project called Marco Zero, thus, this work aimed to evaluate the structure and functionality of the soil microbial community as part of the monitoring of environmental recovery activities in the areas of Marco Zero. To this end, 16S rRNA sequencing was performed to characterize the microbial community, as well as to predict its functions with emphasis on the biogeochemical cycles of these in the soil. Quantification of the microbial community and the communities that potentially participate in the nitrogen cycle was also performed. However, the PcoA revealed that the rehabilitated area is different ($p > 0.05$) from the reference area and the LEfSe (Linear discriminant analysis effect size) analysis showed a greater number of bioindicator groups related to heavy metal removal in the restored area, as well as functions related to the degradation of hydrocarbons and aromatic compounds. The quantification of the microbial community evaluated by the 16S rRNA gene and the populations that potentially participate in the nitrogen cycle evaluated by the genes amoA and narG did not show a clear pattern of differentiation between the areas in rehabilitation and the references, however, the presence of these genes was an indication of the functionality of the N cycle in these environments. When analyzing the points relative to the rehabilitation area - collection points near the stream channel (PT1), and the points near the forest (PT3) - it was possible to observe in the PcoA analysis and in the diversity indices that they diverged from each other in the dry period, where PT1 presented lower diversity indices, and in the rainy period, this

difference decreased, indicating the humidity as a potential factor of alteration of the microbial community in the rehabilitation areas. This is an indication that monitoring the area is of utmost importance to ensure the success of the pilot rehabilitation program, so that it exhibits a community closer to a microbial community that can perform its ecosystem services.

Keywords: Marco Zero. RNAr 16S. Ferro-Carvão Stream.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
CAPÍTULO 1.....	15
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1. O DESASTRE DE BRUMADINHO.....	15
2. MICRORGANISMOS DO SOLO.....	16
3. IMPACTO DO REJEITO DE MINERAÇÃO NA MICROBIOTA DO SOLO.....	19
4. REABILITAÇÃO AMBIENTAL DA ÁREA IMPACTADA.....	20
5. DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADOR BIOLÓGICO.....	21
6. CICLOS BIOGEOQUÍMICOS SOB A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DO SOLO.....	24
6.1. Ciclo do Carbono.....	25
6.2. Ciclo do Nitrogênio.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2.....	41
COMUNIDADE MICROBIANA E ATIVIDADE FUNCIONAL NO SOLO EM REABILITAÇÃO DO RIBEIRÃO FERRO-CARVÃO AFETADO PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE REJEITOS EM BRUMADINHO-MG.....	41
RESUMO.....	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1. Caracterização da área de estudo.....	45
2.2. Amostragem do solo.....	47
2.3. Extração de DNA total das amostras.....	47
2.4. Sequenciamento de <i>Amplicon</i> e análises de dados.....	48
2.6. PCR quantitativo (qPCR).....	48
2.6.1. Preparo do produto de PCR.....	49
2.6.2. Ligação Inseto-Vetor pGEM®-T Easy Vector.....	50
2.6.3. Preparo de Células Ultracompetentes.....	50
2.6.4. Transformação de Células Competentes por Choque Térmico.....	51
2.6.5. Extração de DNA plasmidial de <i>Escherichia coli</i> - Mini prep.....	51
2.6.6. Quantificação em qPCR.....	52
2.6.7. Análises de dados PCR em tempo real.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
3.1. Estrutura da comunidade microbiana do solo.....	53

3.2. Predição funcional.....	72
3.3. Quantificação de genes taxonômicos e funcionais.....	76
4. CONCLUSÕES.....	80
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
AGRADECIMENTOS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	95

INTRODUÇÃO GERAL

O rompimento da barragem B1 de contenção de rejeitos da Mina Córrego do Feijão, na região de Brumadinho, ocorreu em janeiro de 2019, resultando em um desastre ambiental e social de grandes proporções: 12 milhões de metros cúbicos de lama com rejeitos percorreu mais de 10km atingindo o leito do Rio Paraopeba (SILVA *et al.*, 2020; PEREIRA; CRUZ; GUIMARÃES, 2019; XAVIER, 2019).

A última área afetada pelo rejeito antes dele chegar ao Rio Paraopeba foi a região do Ribeirão Ferro-Carvão, que foi a primeira a ser recuperada por meio de um plano de recuperação das características originais do ribeirão Ferro-Carvão denominada Marco Zero, que consistiu na remoção do rejeito, reconstrução do canal original do ribeirão, reposição da camada superior do solo (*topsoil*) e revegetação da área (VALE, 2020).

O estudo da comunidade microbiana tem permitido avaliar respostas dos solos aos diversos tipos de estresse e distúrbios ambientais, a fim de inferir a sustentabilidade do ecossistema, uma vez que atributos microbiológicos são indicadores sensíveis da qualidade do solo (TANG *et al.*, 2019; DORAN; PARKIN, 1994). Os microrganismos exercem funções ecológicas de grande importância para o sustento da vida, principalmente da vida vegetal no solo, mediando principalmente processos de ciclagem de nutrientes, por meio da decomposição e mineralização dos materiais orgânicos mantendo assim os processos ecológicos (CARDOSO; ANDREOTE, 2018; OLIVEIRA SILVA *et al.*, 2018).

Uma ampla gama de microrganismos habitam o solo, como as bactérias, fungos, algas e protozoários que atuam nos processos sinérgicos com as plantas, sendo essas extremamente dependentes dos microorganismos para utilizar o solo como meio de crescimento (PIHLAP *et al.*, 2019; CARDOSO; ANDREOTE, 2018). Os microrganismos também têm papel crucial na estruturação do solo, a exemplo das bactérias que influenciam a agregação das partículas pela produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) e os fungos pelas hifas que emaranha os microagregados do solo e os cimenta entre si. Esse papel é muito importante, pois a estruturação é essencial no desenvolvimento e funcionalidade do solo além de ser um indicador chave para os processos de recuperação (PIHLAP *et al.*, 2019).

As bactérias fazem parte do grupo mais abundante na composição microbiana

do solo, são as mais importantes em relação ao crescimento vegetal. Diferentes grupos bacterianos podem atuar em funções distintas estimulando o crescimento por meio da mobilização de nutrientes, atuando na proteção contra fitopatógeno, biorremediando solos poluídos com compostos xenobióticos (AHMAD *et al.*, 2018; AHEMAD; KIBRET, 2014).

Desta forma, solos com maior abundância ou atividade microbiana, possuem funções relativamente boas, possuem melhor qualidade e melhores taxas de sucesso em processos de revegetação de áreas degradadas. Conclui-se então que, a recuperação da comunidade microbiana do solo é uma etapa fundamental na sua reabilitação para um uso sustentável e benéfico deste ecossistema (TANG *et al.*, 2019; BANNING *et al.*, 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar se os programas de reabilitação implementados na área impactada pelo rompimento da barragem da Mina Córrego do Feijão em Brumadinho irão possibilitar a recuperação da diversidade microbiana bem como, de suas funcionalidades, principalmente aquelas relacionadas à ciclagem de nutrientes, o que será de suma importância para que este ambiente se restabeleça e consiga realizar seus serviços ecossistêmicos.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. O DESASTRE DE BRUMADINHO

Considerado um dos maiores desastres de mineração no Brasil, o rompimento da barragem de contenção de rejeitos provenientes das atividades mineradoras da empresa Vale na região de Brumadinho, ocorreu em 25 de janeiro de 2019, pouco mais de 3 anos após o rompimento da barragem em Mariana-MG. Esse evento resultou em um desastre ambiental e social de grandes proporções, 270 vidas foram perdidas e centenas de pessoas ficaram desabrigadas (XAVIER, 2019). Estima-se que 1.165.667 pessoas foram atingidas direta ou indiretamente com os efeitos do desastre de Brumadinho, além das incluindo moradores, bem como as comunidades tradicionais (indígenas, quilombolas, silvicultores e pescadores artesanais), quando se considerado um raio de 500 a 1000 m, em uma extensão aproximada de 250 km (SILVA *et al.*, 2020; XAVIER, 2019).

A lama de rejeitos que se espalhou por diversas áreas do município atingiu aproximadamente 297 ha de terras que foram soterradas pelo rejeito, sendo 51% de vegetação nativa (cerca de 133 hectares de vegetação nativa de Mata Atlântica e 70 hectares de Áreas de Preservação Permanente (APP), 19% ocupadas com atividades antrópicas e 13% pertencentes a atividades agropecuárias (PEREIRA; CRUZ; GUIMARÃES, 2019). A lama com os rejeitos de minério seguiram o vale do Córrego do Feijão invadindo o deságue dos corpos d'água adjacentes como o Ribeirão Ferro-Carvão até o leito do Rio Paraopeba (XAVIER, 2019).

O estado de Minas Gerais possui aproximadamente 400 barragens que recebem os rejeitos de mineração. Dados apontam que uma preocupante parcela dessas barragens oferecem riscos sociais, ambientais, e econômicos, devido a segurança que suas estruturas proporcionam (COELHO *et al.*, 2021). A Lista de Inventários das Barragens de Minas Gerais da FEAM-Fundação Estadual do Meio Ambiente (2020) inclui o total de 404 barragens associadas à mineração, já o Departamento Nacional da Produção Mineral (DNPM) da Agência Nacional de Mineração (ANM) tem cadastradas 367 barragens, e estima que 148 barragens

(40,3% das 367 barragens cadastradas no DNPM) oferecem riscos ao meio ambiente, às populações ribeirinhas, à infraestrutura urbana e rural e ao patrimônio histórico-cultural; 21 barragens (5,7%) apresentam riscos à população e 39% das estruturas não foram classificadas quanto ao dano potencial associado que apresentam.

Historicamente, o estado de Minas Gerais já vivenciou outros desastres envolvendo a mineração de ferro, o rompimento da parte alteada da barragem da Cava pertencente a Mineração Rio Verde no município de Nova Lima, causou o vazamento de 600 mil m³ de rejeitos que soterram 8 km do leito do córrego Taquaras e deixou 5 mortes (BRASIL, 2019). Em setembro de 2014, na cidade de Itabirito, um deslizamento de terra em uma das barragens da empresa Mineração Herculano deixou 3 mortos e atingiu riachos e córregos da bacia hidrográfica do Rio das Velhas causando graves impactos ambientais (CETEM, 2016; RIBEIRO; REZENDE, 2015). A mesma cidade vivenciou em 1986 um rompimento da barragem da Mineração Itaminas que liberou cerca de 350 mil m³ de rejeitos nos cursos de águas locais e deixou 7 vítimas fatais (BRASIL, 2019). No ano de 2015, uma tragédia de maiores proporções, considerada então o maior desastre ambiental do país, ocorreu no município de Mariana, deixando 19 mortes e liberando um volume estimado de 45 milhões de m³ de rejeito de minério de ferro na Bacia do Rio Doce, resultando em grandes impactos ambientais e socioeconômicos por onde a lama passou, que percorreu cerca de 668 quilômetros desde o local do rompimento até chegar ao Oceano Atlântico. A barragem que se rompeu foi a barragem de rejeitos de Fundão da Mina de Germano pertencente à mineradora Samarco, hoje sob o controle acionário da Vale e da BHP Billiton Brasil, que atingiu de maneira direta e indireta 35 municípios de Minas Gerais e 4 municípios de Espírito Santo (COELHO *et al.*, 2021; LACAZ; PORTO; PINHEIRO, 2017; IBAMA, 2015).

2. MICRORGANISMOS DO SOLO

O solo é um dos mais dinâmicos sítios de interações biológicas na natureza. É um ecossistema único e ao mesmo tempo muito diverso, uma vez que a composição mineral e orgânica pode variar de acordo com as características dos ambientes em que se encontram, nele ocorrem muitas das reações bioquímicas concernentes com

a degradação da matéria orgânica, com a decomposição de rochas, e com a nutrição de plantas (ELSAS *et al.*, 2019). O solo é constituído principalmente por minerais, materiais orgânicos (como plantas, organismos, restos animais e vegetais em decomposição), água e ar (ELSAS *et al.*, 2019; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; AGNELLI *et al.*, 2004).

Os microrganismos apresentam papel crucial na manutenção e composição do solo, são responsáveis por diversos processos e relações ecológicas complexas entre organismos presentes neste ecossistema, desencadeando papéis importantes para a formação da matéria orgânica a partir dos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes, interações diretas e indiretas com plantas e animais edáficos, auxiliando na manutenção e formação do crescimento vegetal (CARDOSO; ANDREOTE, 2018). Fazem parte de um conjunto de diversos filos e espécies diferentes de seres vivos microscópicos, como bactérias, fungos, algas, vírus, protozoários e nematóides (ELSAS *et al.*, 2019; CARDOSO; ANDREOTE, 2018).

Membros do domínio Bacteria são os mais abundantes no solo, apresentando uma ampla diversidade de espécies que exercem diferentes funções (BANNING *et al.*, 2011; PISA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 1994). Uma das principais funções é a participação na decomposição de matéria orgânica e, conseqüentemente, a ciclagem de nutrientes e energia, onde a microbiota utiliza a matéria orgânica morta como fonte de alimento/energia e libera macro e micronutrientes para os produtores primários (MOREIRA *et al.*, 2010). Diversos grupos de bactérias participam dos ciclos biogeoquímicos do solo, as bactérias da rizosfera, por exemplo, desempenham um papel importante em muitos processos, como decomposição, mineralização, fixação biológica de nitrogênio e carbono, além participar como promotoras de crescimento das plantas (PGPR) (BANNING *et al.*, 2011; PISA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 1994).

As bactérias estão intimamente relacionadas com os fatores abióticos do solo. A riqueza e composição de filotipos bacterianos, como Acidobacterias, Actinobacterias e Bacteroidetes, por exemplo estão correlacionados com o pH do solo (LIN, Yu Te *et al.*, 2019). Elas também possuem grande potencial para biorremediação, pois alguns grupos, como as actinobactérias, são capazes de degradar compostos recalcitrantes para formação de húmus, toleram temperaturas um pouco mais elevadas e são

grandes produtores de antibióticos, são bactérias gram-positivas formadoras de esporos, mas sua morfologia se assemelha a um fungo filamentoso pois produz micélios (PRASAD; ARANDA, 2018; ALVAREZ *et al.*, 2017). As bactérias do gênero *Burkholderia* também tem papel importante na biorremediação, principalmente devido a versatilidade metabólica dessas espécies em relação aos compostos orgânicos, em especial aos compostos aromáticos (RODRIGUES; ANDRADE; TENÓRIO, 2021; PRASAD; ARANDA, 2018).

Archaea também estão presentes no solo, são procariotos assim como as Bactérias, porém possuem diferenças principalmente na composição da membrana, na parede celular e no rRNA e tRNA, além de possuir propriedades que as tornam resistente a ambientes inóspitos, podendo ser caracterizadas como microrganismos extremófilos (SIQUEIRA *et al.*, 1994). Os filos que possuem mais atividade no solo são as Crenarchaeota – inclui organismos halofílicos e termofílicos e algumas espécies atuam no processo de nitrificação do solo e no ciclo do enxofre; Euryarchaeota – composto por espécies halófilas extremas, metanogênicas, desnitrificadores, redutores de sulfato e oxidante de ferro, o principal papel desse filo está na degradação anaeróbica de material orgânico pelas arqueias metanogênicas; e o Thaumarchaeota – que não são espécies extremófilas e incluem as arqueias amônio-oxidantes (LI, Xiaoqi *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 1994).

Do domínio Eukarya encontramos principalmente os fungos presentes no solo, que apresentam diversas morfologias e podem ser tanto microscópicos como macroscópicos, unicelular ou pluricelular (ELSAS *et al.*, 2019). São divididos entre os filos Cythridiomycota; Zygomycota; Ascomycota; Basidiomycota e Glomeromycota. No solo os fungos atuam principalmente na decomposição de matéria orgânica e participam na ciclagem de nutrientes assim como as bactérias, são principalmente saprófagos (que realizam a decomposição), e simbiontes (realizam associações benéficas com outros microrganismos, como com algas – líquens, e com raízes de plantas – micorrizas). A associação fungo-alga formando os líquens é essencial para a colonização primária de um solo inabitável, e a conexão entre plantas através de organismos como os fungos micorrízicos permite a troca de nutrientes e sinalizações bioquímicas de situações de estresse para a planta através de uma “rede” de micélios

ligados às raízes das plantas, sendo essencial para o ecossistema (JERBI *et al.*, 2021; YIN *et al.*, 2021; ELSAS *et al.*, 2019).

3. IMPACTO DO REJEITO DE MINERAÇÃO NA MICROBIOTA DO SOLO

Os rejeitos presentes na barragem B1 rompida da mina Córrego do Feijão são formados por materiais finos particulados compostos por aproximadamente 30,3% de areia e 69,7% de silte-argila com grande quantidade principalmente de Ferro (Fe), Alumínio (Al), Manganês (Mn), Titânio (Ti), Zinco (Zn), Cobre (Cu), Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Urânio (U), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Arsênio (As), Estanho (Sn), Mercúrio (Hg), Índio (In), Gálio (Ga), Bário (Ba) e Estrôncio (Sr), sendo as maiores concentrações de Fe (264,9 mg / g), Al (10,8 mg / g), Mn (4,78 mg / g) e Ti (0,43 mg / g), de metais tóxicos como U (1457,4 µg / g), Cd (30,94 µg / g), Pb (14,64 µg / g), As (4,69 µg / g), Sn (547,4 µg / g) e Hg (101,3 ng / g), e raros metais terrosos, como In (210,2 µg / g) e Ga (92,34 µg / g) (VERGILIO *et al.*, 2020).

Dentre os contaminantes, os metais pesados são os mais preocupantes devido a sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade aos organismos e ao ecossistema em geral (BOECHAT, 2014; LIM; SCHOENUNG, 2010). Os elementos mais preocupantes no rejeito da barragem B1 rompida são: arsênio, bário, estrôncio, chumbo, ferro, manganês e alumínio, mesmo que em menores concentrações em relação aos demais poluentes, pois possuem alto potencial para induzir citotoxicidade e danos ao DNA (VERGILIO *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que solos contaminados com metais pesados agem negativamente na comunidade microbiana do solo, principalmente em relação a diversidade e função dos microrganismos. A diversidade e a riqueza de espécies microbianas a nível de espécies e família de solos contaminados com Zn diminuiu (GOŁEBIEWSKI *et al.*, 2014), enquanto a contaminação do solo por Cd não apenas reduziu a diversidade, como também alterou a composição da mesma (FENG *et al.*, 2018). O mesmo ocorreu com solo contaminado por Cr que resultou em uma alteração da comunidade com o aumento do domínio de Firmicutes e Proteobacterias (DESAI *et al.*, 2009). WU e colaboradores (2018) também constataram aumento da

dominância dos filos Firmicutes e Proteobacterias, além da diminuição da abundância de Actinobacterias, e para os fungos foi observado que o filo mais dominante (Ascomycota) diminuiu, enquanto Zygomycota aumentou com a adição de Cd.

Os resultados demonstraram também que as qualidades bioquímicas do solo foram influenciadas pelo poluente, resultando em uma diminuição dos números microbianos e das atividades enzimáticas realizadas por eles. Uma resposta da composição e função das comunidades microbianas ao estresse de longo prazo por metais pesados resultou não somente em uma perda significativa de diversidade, mas também que algumas funções especializadas como a degradação de pesticidas, realizadas por grupos específicos foram comprometidas (SINGH *et al.*, 2014). Também há relatos de mudanças da diversidade microbiana e na composição e funções da comunidade no solo (LORENZ *et al.*, 2006 e OLIVEIRA; PAMPULHA, 2006).

4. REABILITAÇÃO AMBIENTAL DA ÁREA IMPACTADA

O processo de reabilitação ambiental é uma das medidas mais aplicadas para restabelecer áreas impactadas por ações antrópicas e garantir o retorno dos serviços ecossistêmicos de um habitat de forma sustentável (YANG *et al.*, 2022). Esse processo visa restaurar a biodiversidade local incluindo as comunidades microbianas do solo, essenciais para o sucesso do processo de revegetação, uma vez que são cruciais para a estruturação do solo, estabilidade do carbono orgânico, a ciclagem biogeoquímicas de nutrientes e das interações biológica entre outros organismos do solo (YANG *et al.*, 2022).

A atividade de mineração é um processo de grande impacto ambiental, além de ocupar grandes áreas, também produz um substrato gerado no processo de refino de minérios de ferro chamado de rejeito (CHEN, Xiaolin *et al.*, 2022). Esses rejeitos proporcionam condições adversas para a vegetação pois afetam a microbiota do solo, alteram condições físico-químicas, como pH, densidade, baixa capacidade de retenção de água, baixo teor de carbono (C) e nitrogênio (N) e micronutrientes (CHEN, Xiaolin *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2018). Assim, pode comprometer os esforços de

reabilitação ambiental via revegetação direta, no caso de solos contaminados com rejeito de minério (CHEN, Xiaolin *et al.*, 2022).

Devido aos impactos do rejeito de minério no solo, causando condições adversas ao processo de reflorestamento e, para evitar a recontaminação do leito do Rio Paraopeba através da lixiviação, a mineradora Vale optou por retirar os rejeitos da área afetada. Esse processo fez parte do projeto piloto de reabilitação denominado Marco Zero que consiste na reconstituição das condições originais do ribeirão Ferro-Carvão e na revegetação com plantas nativas da região das matas ciliares. Somente na área do Marco Zero, 130 mil m³ de rejeitos foram retirados do solo (VALE, 2020). Esse projeto também contou com a reconstrução do canal do leito do ribeirão Ferro-Carvão, a deposição de terra vegetal fértil (topsoil) e o plantio de mudas de espécies nativas da região (VALE, 2020).

5. DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADOR BIOLÓGICO

Caracterizar a comunidade microbiana do solo permite avaliar a resposta dos solos aos diversos tipos de estresse e distúrbios, a fim de inferir a sustentabilidade do ecossistema (BANNING *et al.*, 2011). Isso ocorre porque grupos de microrganismos podem ser mais sensíveis às alterações bióticas e abióticas que um estresse pode causar, ao mesmo tempo que grupos de microrganismos têm a capacidade de restaurar o solo e remediar os impactos que o distúrbio causou, sobre a sensibilidade de um indicador (DORAN; PARKIN, 1996).

Isto posto, utilizar os microrganismos como indicadores biológicos tem muitas vantagens, entre eles: microrganismos são considerados o elemento mais ativo do ecossistema do solo e são mais suscetíveis ao estresse, sendo capazes de responder mais rapidamente do que as comunidades de plantas ou animais às mudanças das condições ambientais, podem fornecer uma indicação precoce da trajetória de recuperação, são extremamente abundantes e estão diretamente relacionados à fertilidade do solo, à degradação de poluentes, aos ciclos biogeoquímicos e a qualidade do solo em geral (TANG *et al.*, 2019; FENG *et al.*, 2018). Além disso, testes de diagnóstico microbiológico são mais fáceis, rápidos e relativamente mais baratos e requerem apenas uma pequena quantidade de amostra (TANG *et al.*, 2019; FENG *et*

al., 2018; SONG *et al.*, 2016, 2017; ZHANG, Wei *et al.*, 2016; BANNING *et al.*, 2011; ZHANG, Fu Ping *et al.*, 2010).

Levando em consideração a importância e as funções ecológicas que os microrganismos exercem no solo, sabe-se que solos com maior abundância ou atividade microbiana, possuem funções relativamente boas, ou seja, melhor qualidade do solo (ELSAS *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2019; ZHANG, Fu Ping *et al.*, 2010). Assim, a qualidade do solo pode ser definida como:

“A capacidade de um solo de funcionar nos limites do ecossistema, para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde vegetal e animal” (DORAN; PARKIN, 1994);

“A capacidade de um tipo específico de solo de funcionar, dentro dos limites naturais ou gerenciados do ecossistema, para sustentar a produtividade vegetal e animal, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar e apoiar a saúde humana e a habitação” (KARLEN *et al.*, 1997);

“A manutenção do funcionamento do sistema biológico que permeia o solo frente a alterações em seu uso, eliminando assim efeitos deletérios de seu manejo” (CARDOSO; ANDREOTE, 2018).

Os indicadores microbiológicos mais aplicados para analisar a qualidade do solo incluem abundância microbiana, diversidade e estrutura da comunidade e atividade funcional (TANG *et al.*, 2019; DORAN; ZEISS, 2000).

A estrutura da comunidade microbiana do solo pode ser conduzida por fatores edáficos simultaneamente que podem produzir efeitos positivos ou negativos na comunidade, tais como: o pH do solo, a quantidade, qualidade e disponibilidade de carbono no solo, bem como do nitrogênio, presença de água e ar no solo, textura e mineralogia do solo, com isso, a avaliação da estrutura da comunidade microbiana tende a refutar uma avaliação integrada de características do solo (BANNING *et al.*, 2011).

A atividade funcional pode ser acessada pela análise dos ciclos biogeoquímicos, ou seja, da ciclagem de nutrientes em que os microrganismos atuam no solo, como o ciclo do carbono, do nitrogênio, do enxofre e do fósforo por exemplo,

a relação C/N, controla significativamente a disponibilidade de nutrientes mediados por microrganismos e a ciclagem, genes funcionais podem ser analisados e quantificados permitindo avaliar as funções da microbiota nos ciclos biogeoquímicos do solo (TANG *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, a diversidade microbiana é considerada um dos indicadores biológicos mais robustos para análise da qualidade do solo. Na década de 1980 começou a ser considerada um bom indicador juntamente com o isolamento de organismos, densidade e atividade de populações microbianas isoladas de ambientes naturais (MARON; MOUGEL; RANJARD, 2011). Mas em 1990, o avanço das técnicas moleculares permitiu que a análise da diversidade microbiana de microrganismos não cultiváveis tivesse um aumento nos estudos de ecologia microbiana, e possibilitou identificar um número muito maior de espécies microbianas presente no solo do que as técnicas de isolamento permitiam, estudos mostram que apenas 1% das espécies de microrganismos no solo são cultiváveis (MARON; MOUGEL; RANJARD, 2011; MENDES *et al.*, 2009).

As avaliações da diversidade microbiana permitem obter indicativos sobre a variabilidade e variedade em termos de riqueza (número de espécies em uma área do solo) e equitabilidade (padrão de distribuição de indivíduos entre as espécies, sendo proporcional à abundância e diversidade) (ELSAS *et al.*, 2019). Quanto maior a diversidade, maior será a estabilidade do ecossistema, pois haverá uma maior probabilidade da presença de microrganismos quiescentes, ou seja, microrganismos que desempenham a mesmas funções do que outros microrganismos, porém, que necessitam de fatores físicos, químicos e biológicos diferentes para exercer esta função (MENDES *et al.*, 2009). Com isso, há o aumento da redundância funcional do solo e conseqüentemente há o aumento da resiliência do solo, uma vez que, na mudança das condições edafoclimáticas que favoreciam certo grupo que realizava determinada função, haverá outro grupo que, nessa condição, realizará esta mesma função, em suma, quanto maior a diversidade microbiana do solo maior a redundância funcional do mesmo (ELSAS *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2009; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Diversas técnicas moleculares têm sido aplicadas para análise da diversidade microbiana, como sequenciamento NGS (*Next-Generation Sequencing*) do

metagenoma e de *amplicons* de regiões de interesse, e técnicas de *fingerprinting*, como DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante), TGGE (eletroforese em gel com gradiente térmico), RFLP (polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição), t-RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminal), ARDRA (análise de restrição de rDNA amplificado) e SSCP (polimorfismo conformacional de fita simples) tem sido muito aplicadas para análise da diversidade microbiana do solo (BIRTEL et al., 2015; NEELAKANTA; SULTANA, 2013; MARON; MOUGEL; RANJARD, 2011; MENDES et al., 2009).

6. CICLOS BIOGEOQUÍMICOS SOB A INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA DO SOLO

O conhecimento dos processos biogeoquímicos que regulam as transformações e fluxos de elementos na biosfera é de grande importância, no solo esses processos desempenham a função essencial de disponibilizar os elementos de formas usuais para as diversas formas de vida (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A função chave dos microrganismos nesses ciclos biogeoquímicos é realizar a transformação dos compostos químicos em nutrientes disponíveis principalmente para as plantas (ELSAS *et al.*, 2019; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A microbiota do solo está envolvida em muitas transformações desses nutrientes, ciclando elementos essenciais que incluem a fixação de carbono (C) e nitrogênio (N) da atmosfera e a degradação (ou mineralização) de moléculas complexas contendo C, N, e outros elementos contidos em resíduos orgânicos (CARDOSO; ANDREOTE, 2018). Durante os ciclos biogeoquímicos, ajudam a fornecer às plantas, outros elementos essenciais como os macronutrientes P, K, S, Ca, e Mg, e micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, e Zn) (ELSAS *et al.*, 2019; CARDOSO; ANDREOTE, 2018; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As análises de marcadores de genes funcionais são amplamente utilizados para estudar a função da comunidade microbiana pela abundância, diversidade e caracterização de populações que conduzem os ciclos biogeoquímicos. A presença de genes funcionais pode refletir o potencial genético dos processos metabólicos específicos, as atividades do ciclo de nutrientes no solo e pode ser ligada às

características do solo e às taxas de processos biogeoquímicos (DONG *et al.*, 2020; LI, Wen Xing *et al.*, 2020; LEVY-BOOTH; PRESCOTT; GRAYSTON, 2014).

6.1. Ciclo do Carbono

O carbono é o elemento essencial para a vida e o mais abundante em toda estrutura celular, sendo então o elemento de maior demanda para os seres vivos, tanto para os microrganismos, como plantas e animais, ele está presente no solo é suscetível ao uso pelos organismos (CARDOSO; ANDREOTE, 2018). Os teores de C orgânico no solo estão relacionados à biosfera, sendo originada na fotossíntese, que será posteriormente assimilado e incorporado na matéria orgânica do solo (CARDOSO; ANDREOTE, 2018; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O ciclo do carbono ocorre em duas etapas que são regulados por processos de oxidação do C, determinando entrada e saída de C do solo. A etapa de fixação do C-CO₂ atmosférico é realizado por organismos fotossintéticos como as plantas, algas e bactérias autotróficas, que sintetizaram compostos hidrocarbonados de complexidade variável como carboidratos, celuloses, hemiceluloses, ligninas, ácidos graxos, proteínas, ácidos nucleicos e outros polímeros; e a etapa de regeneração que corresponde às diferentes etapas de decomposição das substâncias carbonadas por meio da atuação dos microrganismos do solo (ELSAS *et al.*, 2019; CARDOSO; ANDREOTE, 2018; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Alguns genes funcionais associados ao ciclo do carbono são descritos por DONG e colaboradores (2020) em seus estudos em solo de pastoreio, ao quantificar tanto os genes funcionais microbianos do solo para fixação (*rbcL*, *aclB*, *korA*, *acsA*, *acsE*, *acsB*, *accA*, *pccA*, *smtA*, *mct* e *frdA*), como para degradação de carbono (*gam*, *abfA*, *xyIA*, *exg*, *exoPG*, *mnp*, *IsoP*, *amyX*, *apu*, *cdaR*, *amyA*, *manA*, *CDH*, *naglu*, *chiA*, *exc*, *glx*, *lig* e *pox*). Eles observaram que o regime de pastejo afetou a variação temporal dos genes funcionais microbianos do solo, aumentando a quantidade dos genes responsáveis pela regulação da ciclagem de carbono, indicando que o pastejo razoável é benéfico para a ciclagem de nutrientes da pastagem.

6.2. Ciclo do Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento vital para qualquer organismo vivo, ele é essencial para a formação de biomoléculas, como proteínas e seus derivados (enzimas, peptídeos e aminoácidos) e ácidos nucleicos (DNA e RNA) (CARDOSO; ANDREOTE, 2018). O ciclo de transformação do nitrogênio é um processo realizado por microrganismos (Tabela 1), em sua maioria procaríotos que realizam a renovação do elemento nitrogênio através das fases de fixação biológica de N_2 , amonificação ou mineralização, imobilização de N, nitrificação, desnitrificação, redução dissimilatória de nitrato em amônio (DNRA) e oxidação anaeróbica de amônio (anammox) (HUANG *et al.*, 2021; CARDOSO; ANDREOTE, 2018; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Tabela 1. Esquema das etapas dos ciclos, suas respectivas conversões e os principais microrganismos responsáveis pelas principais etapas do ciclo do nitrogênio.

Etapas	Fórmula	Microrganismos
Fixação do Nitrogênio	$N_2 \rightarrow NH_3$	Bactérias diazotróficas (<i>Actinobacteria</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Cyanobacteria</i> e <i>Proteobacteria</i>).
Nitrificação	$NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$	AOB – Bactérias oxidantes de amônia AOA – Arquéias oxidantes de amônia
Desnitrificação	$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$	Bactérias, arqueias e alguns eucariotos

Fonte: Moreira & Siqueira (2002).

A fixação biológica de nitrogênio é um processo de entrada do nitrogênio atmosférico no solo, que envolve a redução do nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3), que ocorre pela ação de procaríotos que possuem um complexo enzimático altamente conservado que atuam nesta reação de redução chamado nitrogenase (CARDOSO; ANDREOTE, 2018; LEVY-BOOTH; PRESCOTT; GRAYSTON, 2014). São bactérias diazotróficas de vida-livre ou simbiotes, que vivem de modo simbiótico com outros organismos, como os rizóbios por exemplo que vivem nos nódulos de raízes de leguminosas, e cianobactérias (CARDOSO; ANDREOTE, 2018). A fixação de nitrogênio pode ser considerada como um indicador de qualidade do ecossistema

pois, em sistemas perturbados em estágios de reabilitação o N é um nutriente escasso, nos rejeitos de mina geralmente há uma deficiência de nitrogênio, ocasionando um aumento de microrganismos capazes de fixar nitrogênio (LI Yang *et al.*, 2016; NÓBREGA *et al.*, 2004).

O processo de amonificação, também conhecido como mineralização pode ser realizado por uma gama de microrganismos. Ele consiste em transformar formas orgânicas de N em formas inorgânicas (minerais), gerando principalmente o amônio, que poderá ser utilizado pelas plantas e microrganismos em um processo chamado de imobilização, onde o amônio será convertido novamente a N orgânico, e nos casos dos microrganismos irá compor a biomassa microbiana, ou o amônio poderá também ser submetido a transformações inorgânicas posteriores (CARDOSO; ANDREOTE, 2018; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A nitrificação é um processo realizado por um pequeno grupo de microrganismos, onde o amônio é oxidado e o nitrato (NO_3^-) é formado. Esse processo ocorre em duas etapas, a 1ª é realizada por microrganismos oxidantes de amônio (Bacteria e Archeae) que oxidam amônia em nitrito (NO_2^-) e a 2ª etapa é realizada por microrganismos oxidantes de nitrito, que oxidam NO_2^- a nitrato. A nitrificação só pode ocorrer em ambientes oxigenados pois demanda oxigênio, conseqüentemente é um processo que ocorre principalmente nas camadas superficiais do solo e em solos menos argilosos (CARDOSO; ANDREOTE, 2018).

O processo de desnitrificação é realizado por diversos microrganismos procariotos e eucariotos, sendo distribuída por várias subclasses taxonômicas, principalmente dentro das Proteobacteria (DEVOL, 2008). Esse processo consiste no retorno do nitrogênio para a atmosfera, é a saída do N do solo, que ocorre pela redução do nitrato a nitrogênio atmosférico, devido à utilização do nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) como aceptores finais de elétrons na respiração de microrganismos que vão produzir nitrogênio molecular (N_2) (MAUL *et al.*, 2019; CARDOSO; ANDREOTE, 2018). Também pode ser descrita como um tipo de respiração anaeróbica na qual microrganismos convertem o nitrogênio solúvel (NO_3^- ou NO_2^-) em formas gasosas (NO, N_2O e N_2) (XIAO *et al.*, 2021; DEVOL, 2008). As taxas relativas de reações de redução e as inter-relações entre doadores e aceptores de elétrons são determinadas pelas populações de bactérias

desnitrificantes, sendo assim, o processo de desnitrificação pode ser afetado pelas diferentes composições da comunidade bacteriana (MAUL *et al.*, 2019)

O processo de redução dissimilatória de nitrato em amônio (DNRA) é realizada por algumas espécies de bactérias anaeróbias obrigatórias como por exemplo *Clostridium*, anaeróbias facultativas como *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* e aeróbios como *Bacillus* e *Pseudomonas* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essas bactérias conservam energia e produzem mais amônio (NH_4^+) do que óxido nitroso (N_2O), reduzindo o nitrato (NO_3^-) em amônio (NH_4^+) (HUANG *et al.*, 2021; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os microrganismos que atuam nos processos de transformação de nitrogênio possuem genes funcionais e catalisados por enzimas codificadas por genes envolvidos no ciclo do N, diversas pesquisas estudam os genes envolvidos no ciclo do N a fim de identificar e caracterizar atividades microbianas. HUANG e colaboradores (2021) estudaram as enzimas nitrito redutase codificadas pelos genes *nirS* que estão envolvidas no processo de desnitrificação, a enzima codificada pelo *nrfA* envolvida no processo de DNRA, o gene *nifH* que codifica a nitrogenase redutase no processo de fixação de N_2 , enzimas codificadas pelo gene *amoA* (amônio monooxigenase) de bactérias e arqueias no processo de nitrificação.

Os genes envolvidos no ciclo do Nitrogênio são amplamente estudados, pois o nitrogênio tem papel fundamental no crescimento e viabilidade das plantas, bem como no retorno do N para a atmosfera (LI, Wen Xing *et al.*, 2020). Os genes relacionados ao processo de desnitrificação são os mais estudados, principalmente em sistemas agrícolas, isso porque, altas taxas de desnitrificação implicam na liberação de maiores quantidades de óxido nitroso (N_2O) na atmosfera (RAHMAN *et al.*, 2018). Os genes *nirK* e *nirS*, que codificam nitrito redutases, foram estudados por serem muito utilizados como marcadores moleculares para avaliar as respostas ecológicas das comunidades desnitrificantes no ambiente (XIAO *et al.*, 2021). Esses autores sugerem que esses genes distinguem dois grupos ecologicamente distintos de microrganismos desnitrificantes que diferem em suas respostas a gradientes ambientais. O estudo do impacto dos sistemas de cultivo agrícola na abundância de genes microbianos de desnitrificação mostram que os genes para nitrito redutase (Nir) diminuíram e para óxido nitroso redutase (Nos) aumentaram, indicando que o manejo

do sistema de cultivo pode afetar a composição da comunidade desnitrificante assim como as emissões de N_2 na atmosfera (MAUL *et al.*, 2019).

LI e colaboradores (2019) caracterizaram e quantificaram diversos genes funcionais do ciclo do N para avaliar a abundância da comunidade microbiana na ciclagem de N e sua resposta às diferentes estratégias de fertilização em solo ácido. Ao avaliar esses genes eles perceberam que, o potencial de captura e liberação de N foi melhorada pela regulação da população microbiana participante do ciclo do N através da aplicação de adubo orgânico.

A atividade funcional e a diversidade de genes funcionais dos ciclos biogeoquímicos de um solo contaminado com cobre remediado por fitoestabilização, juntamente com calcário dolomítico. Para o ciclo do nitrogênio foram estudados para avaliar a abundância dos genes relacionados ao processo de amonificação, DNRA, desnitrificação, nitrificação, fixação de N_2 e para o processo de anammox (XUE *et al.*, 2018). Esses autores observaram que após 6 anos do processo de fitorremediação, a disponibilidade de Cu e a toxicidade do solo diminuiu, aumentando a atividade microbiana e a abundância de genes funcionais envolvidos no ciclo do N.

O gene *narG*, que codifica a nitrato redutase ligada à membrana participa do processo de desnitrificação, sendo considerada um importante processo do solo, pois contribui para a ciclagem global do nitrogênio (CHÈNEBY *et al.*, 2003). Esse gene tem sido amplamente estudado em ecossistemas do solo, e diferentes grupos filogenéticos foram identificados como mediadores da desnitrificação, como Actinobacteria e Proteobacteria (SMITH *et al.*, 2007). Estudando o efeito de plantas pioneiras em duas comunidades bacterianas funcionais envolvidas no ciclo N em solo contaminado com níquel, o gene *narG* foi utilizado para avaliar a redução de nitrato, observaram que as plantas tiveram um efeito significativo na estrutura da comunidade microbiana de redução de nitrato, restaurando a atividade de desnitrificação no solo (HÉRY *et al.*, 2005).

O gene funcional *amoA* é responsável por codificar a amônia monooxigenase, um gene importante para a nitrificação e desempenha um papel importante na ciclagem do N, e é considerado por como um processo microbiano sensível para avaliar a contaminação do metal (WANG, Aihua *et al.*, 2023). O uso do gene *amoA*

para investigação da nitrificação em solos contaminados por rejeito de minério tem sido utilizado para avaliar como diferentes comunidades de plantas influenciam a comunidade de microrganismos funcionais na rizosfera relacionados a ciclagem de N e observaram que as plantas testadas estimularam a abundância e atividade do gene *amoA*, porém a rizosfera pouco influenciou essa comunidade (LI, Yang *et al.*, 2017). O gene *amoA* também foi utilizado para estudar a resposta das atividades microbianas e o potencial de oxidação da amônia em solo de mineração com antimônio, e concluíram que o antimônio e o pH se correlacionaram negativamente com as taxas de nitrificação do solo (WANG, Aihua *et al.*, 2023).

A atividade de mineração é um processo de grande impacto ambiental, o substrato gerado no processo de refino de minérios de ferro chamado de rejeito é um composto que contém metais pesados, que agem negativamente na comunidade microbiana do solo. Assim, quando há o rompimento de uma barragem, faz-se necessário traçar planos de reabilitação da área para que a mesma possa restabelecer seus serviços ecossistêmicos, sendo assim, capaz de restaurar a biodiversidade local incluindo as comunidades microbianas do solo. Como já bem elucidado, esses microrganismos apresentam papel crucial na manutenção e composição do solo e são responsáveis por diversos processos e relações ecológicas neste ecossistema, logo, caracterizar a comunidade microbiana do solo bem como estudar os processos biogeoquímicos que regulam as transformações e fluxos de elementos neste ecossistema nos permite avaliar a resposta dos mesmos aos diversos tipos de estresse e distúrbios, a fim de inferir a sustentabilidade do ecossistema, uma vez que solos com maior abundância ou atividade microbiana, possuem relativamente uma melhor qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M. T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 36, no. 5, p. 859–868, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.004>.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, vol. 26, no. 1, p. 1–20, 2014. DOI 10.1016/j.jksus.2013.05.001. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- AHMAD, M.; PATACZEK, L.; HILGER, T. H.; ZAHIR, Z. A.; HUSSAIN, A.; RASCHE, F.; SCHAFLEITNER, R.; SOLBERG, S. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, no. DEC, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02992>.
- ALVAREZ, A.; SAEZ, J. M.; DAVILA COSTA, J. S.; COLIN, V. L.; FUENTES, M. S.; CUOZZO, S. A.; BENIMELI, C. S.; POLTI, M. A.; AMOROSO, M. J. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. **Chemosphere**, vol. 166, p. 41–62, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.070>.
- BANNING, N. C.; GLEESON, D. B.; GRIGG, A. H.; GRANT, C. D.; ANDERSEN, G. L.; BRODIE, E. L.; MURPHY, D. V. Soil microbial community successional patterns during forest ecosystem restoration. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 77, no. 17, p. 6158–6164, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.00764-11>.
- BIRTEL, J.; WALSER, J. C.; PICHON, S.; BÜRGMANN, H.; MATTHEWS, B. Estimating bacterial diversity for ecological studies: Methods, metrics, and assumptions. **PLoS ONE**, vol. 10, no. 4, p. 1–23, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125356>.
- BOECHAT, C. L. **Biorremediação de solos contaminados por metais pesados em áreas de beneficiamento de minério de ouro**. 2014. 105 f. Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

BRASIL. Congresso. Comissão parlamentar de inquérito rompimento da barragem de brumadinho. vol. 2019, p. 2287, 2019.

<https://www.camara.leg.br/internet/comissoes/cpi/cpibruma/RelatorioFinal.pdf>

CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. B. M.; MARTINS, O. B.; VIEIRA, R. P.; ALMEIDA, R. V.; ALQUERES, S. M. C.; DE ALMEIDA, W. I. Archaea: Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, vol. 30, p. 71–77, 2003.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. [S. l.: s. n.], 2018. vol. 15. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1700>.

CETEM, C. D. T. M. **Rompimento de barragem de rejeitos de mineração de ferro em Itabirito (MG) provoca mortes**. 2016.

CHEN, X.; CHEN, H.; ZHAO, J.; XIN, Y.; LI, Y. Bacterial community structure and diversity in the rhizospheric soil of Robinia pseudoacacia and Juniperus sabina planted in iron tailings matrix. **Environmental Science and Pollution Research**, no. 2020, 2022a. DOI 10.1007/s11356-022-21669-x. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21669-x>.

COELHO, R. M. P.; VIEIRA, E. M.; PIO, F. P. B.; DE ALMEIDA, V. F.; SANTOS, R. E. Atlas das barragens de mineração em Minas Gerais. **Caderno de Geografia**, vol. 31, no. 1, p. 208–259, 2021. <https://doi.org/10.5752/p.2318-2962.2021v31nesp1p208>.

DESAI, C.; PARIKH, R. Y.; VAISHNAV, T.; SHOUCHE, Y. S.; MADAMWAR, D. Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes. **Research in Microbiology**, vol. 160, no. 1, p. 1–9, 2009. DOI 10.1016/j.resmic.2008.10.003. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2008.10.003>.

DEVOL, A. H. **Denitrification Including Anammox**. [S. l.: s. n.], 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372522-6.00006-2>.

DONG, S.; LI, Y.; GANJURJAV, H.; GAO, Q.; GAO, X.; ZHANG, J.; YAN, Y.; ZHANG, Y.; LIU, S.; HU, G.; WANG, X.; WU, H.; LI, S. Grazing promoted soil microbial functional genes for regulating C and N cycling in alpine meadow of the Qinghai-Tibetan Plateau. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, vol. 303, no. March, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107111>.

DORAN, J.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, vol. 15, p. 3–11, 2000. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3585-1_107.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining soil quality for a sustainable environment. SSSA Spec. Pub. No. 35. **Defining and assessing soil quality**, 1994. <http://dx.doi.org/10.2136/sssaspecpub35.c1>.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Quantitative indicators of soil quality: A minimum data set. **Methods for Assessing Soil Quality**, p. 25–37, 1996. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub49.c2>.

ELSAS, J. D. van; TREVORS, J. T.; ROSADO, A. S.; NANNIPIERI, P. **Modern Soil Microbiology Third Edition**. [S. l.: s. n.], 2019. vol. Three.

FEAM – FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Lista das Barragens de Mineração de Minas Gerais/ FEAM**. 2020. <http://www.feam.br/gestao-de-barragens/inventario-de-barragens>.

FENG, G.; XIE, T.; WANG, X.; BAI, J.; TANG, L.; ZHAO, H.; WEI, W.; WANG, M.; ZHAO, Y. Metagenomic analysis of microbial community and function involved in cd-contaminated soil. **BMC Microbiology**, vol. 18, no. 1, p. 1–13, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1152-5>.

GOŁEBIEWSKI, M.; DEJA-SIKORA, E.; CICHOSZ, M.; TRETYN, A.; WRÓBEL, B. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. **Microbial ecology**, vol. 67, no. 3, p. 635–647, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0344-7>.

HÉRY, M.; PHILIPPOT, L.; MÉRIAUX, E.; POLY, F.; LE ROUX, X.; NAVARRO, E. Nickel mine spoils revegetation attempts: effect of pioneer plants on two functional

bacterial communities involved in the N-cycle. **Environmental Microbiology**, vol. 7, no. 4, p. 486–498, 2005. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00705.x>.
<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.14622920.2005.00705.x>.

HUANG, F.; LIN, X.; HU, W.; ZENG, F.; HE, L.; YIN, K. Nitrogen cycling processes in sediments of the Pearl River Estuary: Spatial variations, controlling factors, and environmental implications. **Catena**, vol. 206, no. May, p. 105545, 2021. DOI 10.1016/j.catena.2021.105545. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105545>.

IBAMA. Impactos decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. **Laudo Técnico Preliminar**, 2015.
<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias%0Ambientais/laudotecnico-preliminar.pdf>.

JERBI, M.; LABIDI, S.; BAHRI, B. A.; LARUELLE, F.; TISSERANT, B.; BEN JEDDI, F.; LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A. Soil properties and climate affect arbuscular mycorrhizal fungi and soil microbial communities in Mediterranean rainfed cereal cropping systems. **Pedobiologia**, vol. 87–88, no. June, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2021.150748>.

KARLEN, D.L.; MAUSBACH, M.J.; DORAN, J.W.; CLINE, R.G.; HARRIS, R.F.; SCHUMAN, G.E.; SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation. **Soil Science Society of America journal**, vol. 61, 1997. <http://naldc.nal.usda.gov/catalog/16713>.

LACAZ, F. A. de C.; PORTO, M. F. de S.; PINHEIRO, T. M. M. Tragédias brasileiras contemporâneas: o caso do rompimento da barragem de rejeitos de Fundão/Samarco. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, vol. 42, p. 1–12, 2017. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0303-76572017000100302&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.

LEVY-BOOTH, D. J.; PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 75, p. 11–25, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.021>.

LI, W. X.; WANG, C.; ZHENG, M. M.; CAI, Z. J.; WANG, B. R.; SHEN, R. F.

Fertilization strategies affect soil properties and abundance of N-cycling functional genes in an acidic agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, vol. 156, no. November 2019, p. 103704, 2020. DOI 10.1016/j.apsoil.2020.103704.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103704>.

LI, X.; MENG, D.; LI, J.; YIN, H.; LIU, H.; LIU, X.; CHENG, C.; XIAO, Y.; LIU, Z.;

YAN, M. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. **Environmental Pollution**, vol. 231, p. 908–917, 2017. DOI 10.1016/j.envpol.2017.08.057.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.057>.

LI, Y.; JIA, Z.; SUN, Q.; CHENG, J.; YANG, Y.; ZHAN, J.; WANG, D. Plant-Mediated Changes in Soil N-Cycling Genes during Revegetation of Copper Mine Tailings.

Frontiers in Environmental Science, vol. 5, 2017. DOI 10.3389/fenvs.2017.00079.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2017.00079>.

LI, Y.; JIA, Z.; SUN, Q.; ZHAN, J.; YANG, Y.; WANG, D. Ecological restoration alters microbial communities in mine tailings profiles. **Scientific Reports**, vol. 6, p. 1–11,

2016. <https://doi.org/10.1038/srep25193>.

LIM, S. R.; SCHOENUNG, J. M. Human health and ecological toxicity potentials due to heavy metal content in waste electronic devices with flat panel displays. **Journal**

of Hazardous Materials, vol. 177, no. 1–3, p. 251–259, 2010. DOI

10.1016/j.jhazmat.2009.12.025. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.025>.

LIN, Y. T.; LIN, Y. F.; TSAI, I. J.; CHANG, E. H.; JIEN, S. H.; LIN, Y. J.; CHIU, C. Y.

Structure and Diversity of Soil Bacterial Communities in Offshore Islands. **Scientific Reports**, vol. 9, no. 1, p. 1–9, 2019. DOI 10.1038/s41598-019-41170-9.

<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41170-9>.

LORENZ, N.; HINTEMANN, T.; KRAMAREWA, T.; KATAYAMA, A.; YASUTA, T.;

MARSCHNER, P.; KANDELER, E. Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure. **Soil**

Biology and Biochemistry, vol. 38, no. 6, p. 1430–1437, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.10.020>.

MARON, P. A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Comptes Rendus - Biologies**, vol. 334, no. 5–6, p. 403–411, 2011. DOI 10.1016/j.crvi.2010.12.003.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.003>.

MAUL, J. E.; CAVIGELLI, M. A.; VINYARD, B.; BUYER, J. S. Cropping system history and crop rotation phase drive the abundance of soil denitrification genes nirK, nirS and nosZ in conventional and organic grain agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, vol. 273, no. November 2018, p. 95–106, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.11.022>.

MENDES, I. de C.; HUNGRIA, M.; JUNIOR, F. B. dos R.; FERNANDES, M. F.; MERCANTE, F. M.; ZILLI, J. É. Bioindicadores para Avaliação da Qualidade dos Solos Tropicais: utopia ou realidade? **Documentos**, 246, vol. 1, p. 32, 2009.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, vol. 1, no. 2, p. 74–99, 2010. .

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. **Editores UFLA**, p. 407–447, 2006.

NEELAKANTA, G.; SULTANA, H. The Use of Metagenomic Approaches to Analyze Changes in Microbial Communities. **Microbiology Insights**, vol. 6, p. MBI.S10819, 2013. <https://doi.org/10.4137/mbi.s10819>.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol. 28, no. 2, p. 269–279, 2004. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832004000200005>.

OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M. E. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 102, no. 3, p. 157–161, 2006. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.157>.

OLIVEIRA S. A.; DA COSTA, A. M.; TEIXEIRA, A. F. S.; GUIMARÃES, A.; DOS

SANTOS, J. V.; MOREIRA, F. M. S Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies.

Ecological Indicators, vol. 93, no. December 2017, p. 142–151, 2018. DOI 10.1016/j.ecolind.2018.04.073. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.073>.

PEREIRA, L. F.; CRUZ, G. de B.; GUIMARÃES, R. M. F. Impactos do rompimento da barragem de rejeitos de Brumadinho, Brasil: uma análise baseada nas mudanças de cobertura da terra. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, vol. 02, p. 122–129, 2019. <https://doi.org/10.24221/jeap.4.2.2019.2373.122-129>.

PIHLAP, E.; VUKO, M.; LUCAS, M.; STEFFENS, M.; SCHLOTTER, M.; VETTERLEIN, D.; ENDENICH, M.; KÖGEL-KNABNER, I. Initial soil formation in an agriculturally reclaimed open-cast mining area - the role of management and loess parent material. **Soil and Tillage Research**, vol. 191, no. April, p. 224–237, 2019. DOI 10.1016/j.still.2019.03.023. <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.03.023>.

PISA, G.; MAGNANI, G. S.; WEBER, H.; SOUZA, E. M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R. A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J. P.; PEDROSA, F. O.; CRUZ, L. M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 44, no. 12, p. 1215–1221, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500148>.

PRASAD, R.; ARANDA, E. **Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology**. [S. l.: s. n.], 2018.

<http://www.springer.com/series/15921%0Ahttp://link.springer.com/10.1007/978-3-030-02369-0>.

RAHMAN, M. M.; SHAN, J.; YANG, P.; SHANG, X.; XIA, Y.; YAN, X. Effects of long-term pig manure application on antibiotics, abundance of antibiotic resistance genes (ARGs), anammox and denitrification rates in paddy soils. **Environmental Pollution**, vol. 240, p. 368–377, 2018. DOI 10.1016/j.envpol.2018.04.135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.135>.

RIBEIRO, L. G. G.; REZENDE, E. N. Mina do Engenho: rompimento de barragem. Homicídio como crime ambiental: uma teratológica acepção de Direito Penal? **Revista Direito Ambiental e sociedade**, vol. 5, p. 7–27, 2015.

RODRIGUES, V. S.; ANDRADE, L. M.; TENÓRIO, J. A. S. Biodegradation of phenolic compounds in waste foundry sand: physical and chemical characterization of foundry sand and bacterial degradation kinetics. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, vol. 16, no. May, p. 100575, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100575>.

SILVA, M. A. da; FREITAS, C. M. de; XAVIER, D. R.; ROMÃO, A. R. Sobreposição de riscos e impactos no desastre da Vale em Brumadinho. **Ciência e Cultura**, vol. 72, no. 2, p. 21–28, 2020. <https://doi.org/10.21800/2317-66602020000200008>.

SINGH, B. K.; QUINCE, C.; MACDONALD, C. A.; KHACHANE, A.; THOMAS, N.; ALSOUD, W. A.; SØRENSEN, S. J.; HE, Z.; WHITE, D.; SINCLAIR, A.; CROOKS, B.; ZHOU, J.; CAMPBELL, C. D. Loss of microbial diversity in soils is coincident with reductions in some specialized functions. **Environmental Microbiology**, vol. 16, no. 8, p. 2408–2420, 2014. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12353>.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. de S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. **EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, p. 142, 1994.

SMITH, C. J.; NEDWELL, D. B.; DONG, L. F.; OSBORN, A. M. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 73, no. 11, p. 3612–3622, 2007. <https://doi.org/10.1128/AEM.02894-06>.

SONG, B.; ZHANG, C.; ZENG, G.; GONG, J.; CHANG, Y.; JIANG, Y. Antibacterial properties and mechanism of graphene oxide-silver nanocomposites as bactericidal agents for water disinfection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 604, p. 167–176, 2016. DOI 10.1016/j.abb.2016.04.018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.018>.

SUN, X.; ZHOU, Y.; TAN, Y.; WU, Z.; LU, P.; ZHANG, G.; YU, F. Restoration with pioneer plants changes soil properties and remodels the diversity and structure of bacterial communities in rhizosphere and bulk soil of copper mine tailings in Jiangxi Province, China. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 25, no. 22,

p. 22106–22119, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2244-3>.

TANG, J.; ZHANG, J.; REN, L.; ZHOU, Y.; GAO, J.; LUO, L.; YANG, Y.; PENG, Q.; HUANG, H.; CHEN, A. Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. **Journal of Environmental Management**, vol. 242, no. April, p. 121–130, 2019. DOI 10.1016/j.jenvman.2019.04.061. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.061>.

VALE. Relatório de Sustentabilidade 2019 - Mediacapital. **Media Capital**, 2020. <https://www.mediacapital.pt/p/11260/relatório-de-sustentabilidade-2019/>.

VERGILIO, C. dos S.; LACERDA, D.; OLIVEIRA, B. C. V. de; SARTORI, E.; CAMPOS, G. M.; PEREIRA, A. L. de S.; AGUIAR, D. B. de; SOUZA, T. da S.; ALMEIDA, M. G. de; THOMPSON, F.; REZENDE, C. E. de. Metal concentrations and biological effects from one of the largest mining disasters in the world (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62700-w>.

WANG, A.; LIU, S.; XIE, J.; OUYANG, W.; HE, M.; LIN, C.; LIU, X. Response of soil microbial activities and ammonia oxidation potential to environmental factors in a typical antimony mining area. **Journal of Environmental Sciences**, vol. 127, p. 767–779, 2023. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.07.003>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074222003552>.

WU, B.; HOU, S.; PENG, D.; WANG, Y.; WANG, C.; XU, F.; XU, H. Response of soil micro-ecology to different levels of cadmium in alkaline soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 166, no. May, p. 116–122, 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2018.09.076. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.076>.

XAVIER, D. **Nota tecnica_Avaliacao dos impactos sobre a saúde do desastre da mineração da Vale-Brumadinho**.pdf. 2019.

XIAO, X.; XIE, G.; YANG, Z.; HE, N.; YANG, D.; LIU, M. Variation in abundance, diversity, and composition of nirK and nirS containing denitrifying bacterial communities in a red paddy soil as affected by combined organic-chemical fertilization. **Applied Soil Ecology**, vol. 166, no. November 2020, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104001>.

XUE, K.; ZHOU, J.; VAN NOSTRAND, J.; MENCH, M.; BES, C.; GIAGNONI, L.; RENELLA, G. Functional activity and functional gene diversity of a Cu-contaminated soil remediated by aided phytostabilization using compost, dolomitic limestone and a mixed tree stand. **Environmental Pollution**, vol. 242, p. 229–238, 2018. DOI 10.1016/j.envpol.2018.06.057. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.057>.

YANG, F.; HUANG, M.; LI, C.; WU, X.; FANG, L. Vegetation restoration increases the diversity of bacterial communities in deep soils. **Applied Soil Ecology**, vol. 180, no. August, p. 104631, 2022. DOI 10.1016/j.apsoil.2022.104631. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104631>.

YIN, X.; PEÑUELAS, J.; XU, X.; SARDANS, J.; FANG, Y.; WIESMEIER, M.; CHEN, Y.; CHEN, X.; WANG, W. Effects of addition of nitrogen-enriched biochar on bacteria and fungi community structure and C, N, P, and Fe stoichiometry in subtropical paddy soils. **European Journal of Soil Biology**, vol. 106, no. August, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103351>.

ZHANG, F. P.; LI, C. F.; TONG, L. G.; YUE, L. X.; LI, P.; CIREN, Y. J.; CAO, C. G. Response of microbial characteristics to heavy metal pollution of mining soils in central Tibet, China. **Applied Soil Ecology**, vol. 45, no. 3, p. 144–151, 2010. DOI 10.1016/j.apsoil.2010.03.006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.03.006>.

ZHANG, W.; CHEN, L.; ZHANG, R.; LIN, K. High throughput sequencing analysis of the joint effects of BDE209-Pb on soil bacterial community structure. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 301, p. 1–7, 2016. DOI 10.1016/j.jhazmat.2015.08.037. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.037>.

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE MICROBIANA E ATIVIDADE FUNCIONAL NO SOLO EM REABILITAÇÃO DO RIBEIRÃO FERRO-CARVÃO AFETADO PELO ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE REJEITOS EM BRUMADINHO-MG.

Letícia de Souza Ferreira^a, Maria Catarina Megumi Kasuya^b, Cynthia Canêdo da Silva^{c*}.

^a Pós-graduação, Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (leticia.ferreira@ufv.br)

^b Ph. D., Professora, Departamento de microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (catarinakasuya@gmail.com)

^c Ph. D., Professora, Departamento de microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (ccanedo@ufv.br)

*Autor correspondente: e-mail: ccanedo@ufv.br Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Laboratório de Microbiologia Ambiental Aplicada (LAMAP) , Viçosa - MG, 36570-900, Tel.: +55 (31) 3612-5056

RESUMO

Minas Gerais possui aproximadamente 400 barragens que recebem rejeitos de mineração. Em janeiro de 2019, em Brumadinho, ocorreu o rompimento da barragem B1 da empresa Vale, um desastre de grande impacto ambiental e social no Brasil. A lama de rejeitos percorreu cerca de 10 km, sendo a última área afetada pelo rejeito, região do Ribeirão Ferro-Carvão, a primeira a ser recuperada pelo processo de remoção do rejeito e do uso da técnica de engenharia para reposição da camada superior do solo (*topsoil*), conhecido como projeto piloto Marco Zero, realizado pela empresa Vale. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a comunidade microbiana, bem como o papel que esta exerce, com foco nas funções relacionadas ao ciclo biogeoquímico do nitrogênio. A análise da estrutura e predição funcional da comunidade microbiana foi realizada utilizando os dados obtidos do sequenciamento rRNA 16S. Os resultados revelaram que a área em processo de reabilitação se encontra ainda diferente da área referência, mas que demonstra uma tendência de aproximação da área referência, e também entre os pontos da área em reabilitação. Dados da análise de LEfSe, indicaram a presença de microrganismos bioindicadores na área em reabilitação relacionados a solos contaminados com rejeito de minério e metais pesados, corroborados com as funções preditivas realizadas pelo FAPROTAX, relacionadas a degradação de hidrocarbonetos e compostos aromáticos, indicando a presença de comunidades remanescentes que realizam a função de biodegradação de poluentes que ainda podem estar no solo. Já na área de referência os microrganismos bioindicadores foram relacionados à ambientes florestais. A quantificação das comunidades microbianas foi realizada pela análise de PCR quantitativo (qPCR) dos genes rRNA 16S e *amoA* e *narG*, por meio da quantificação absoluta. Os resultados não apresentam um padrão claro de diferenciação entre as áreas. Entretanto, a presença dos genes funcionais relativos à nitrificação e desnitrificação foram essenciais para indicar a ocorrência do ciclo do nitrogênio. Em geral, os resultados demonstraram que a umidificação do solo em decorrência das chuvas foi um fator essencial para explicar as alterações da comunidade microbiana, e que, o monitoramento da área é importante para avaliar também o tempo como um influenciador do restabelecimento das funções ecológicas deste ecossistema, possibilitando um processo de reflorestamento com maiores taxas de sucesso.

Palavras-chave: rejeito de minério, diversidade microbiana, ciclos biogeoquímicos

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, acidentes envolvendo rompimento de barragens tem surtido efeitos catastróficos para o meio ambiente e para a população ao redor das atividades mineradoras. Em 2015, a barragem de Fundão da Mina de Germano no município de Mariana-MG rompeu liberando aproximadamente 43 milhões de m³ de rejeito de minério de ferro, causando grande degradação ambiental e foi considerado o maior desastre ambiental do Brasil, deixando 19 mortes e milhares de famílias desabrigadas (LIMA *et al.*, 2022; COELHO *et al.*, 2021). Logo após, em 2019 a barragem B1 da mina Córrego do Feijão, na cidade de Brumadinho, também em Minas Gerais se rompe liberando aproximadamente 12 milhões de m³ de rejeitos de minério deixando mais de 250 pessoas mortas e um rastro de degradação ambiental (THOMPSON *et al.*, 2020; XAVIER, 2019).

Ambas as barragens pertencem à mineradora Vale S/A que possui 133 barragens de minério de ferro no Brasil, sendo 80% delas em Minas Gerais. A Vale trabalha principalmente com barragens do tipo a montante e jusante, e o modelo de barragem utilizado em Brumadinho é do tipo a montante, o mesmo usado na barragem do Fundão em Mariana, que consiste na deposição sucessiva de rejeito acumulando-se verticalmente, sendo considerado o modelo mais barato quando comparado a outros modelos como a jusante por exemplo (SILVA *et al.*, 2020 KOSSOFF *et al.*, 2014). Esse modelo também ocupa menor área em relação às barragens de rejeitos a jusante, o que faz com que a licença para esse tipo de barragem seja facilmente obtida, contudo, é considerado o mais arriscado e propício a rompimento, pois a estabilidade das barragens de rejeitos diminui substancialmente quando as operações cessam (SILVA *et al.*, 2020).

Quando há o rompimento de uma barragem o impacto ambiental ocorre de forma direta com a retirada da vegetação, morte da biodiversidade animal do local, desestruturação do habitat e contaminação de solo e rios com a deposição do rejeito (KOSSOFF *et al.*, 2014). Assim, os processos de reabilitação dos locais afetados,

como por exemplo o reflorestamento, se fazem necessários para restabelecer o retorno dos serviços ecossistêmicos essenciais (HE *et al.*, 2022).

A microbiota tem papel fundamental na manutenção da estabilidade funcional e sustentabilidade de ecossistemas em programas de reabilitação ecológica, pois atuam na manutenção de processos biológicos como a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, armazenamento de carbono, agregação do solo e controle de patógenos (JIAO; CHEN; WEI, 2022; BAHRAM *et al.*, 2018; ZHANG, Hongchun *et al.*, 2017; ZILLI *et al.*, 2003). A caracterização da microbiota pode ser utilizada para viabilizar o processo de reabilitação da área como um indicador biológico, uma vez que os microrganismos tendem a responder aos distúrbios ambientais de forma mais rápida, por serem a base para um ecossistema saudável e para o sucesso de projetos de reabilitação ecológicas, por estarem intimamente ligados a fertilidade e resiliência do solo (DORAN; PARKIN, 1996). Desta forma, solos com maior abundância e atividade microbiana tendem a possuir funções relativamente boas e melhorar as taxas de sucesso dos processos de revegetação de áreas degradadas (ZILLI *et al.*, 2003). Por conseguinte, analisar a diversidade microbiana se torna uma mecanismo chave no monitoramento de áreas em reabilitação ambiental, uma vez que apresentam rápidas respostas às mudanças ambientais, ademais, algumas espécies de microrganismos podem ser utilizadas como bioindicadores por apresentarem nichos mais específicos (ZHANG, Hongchun *et al.*, 2017; ZILLI *et al.*, 2003).

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana do solo como parte do monitoramento das atividades de recuperação ambiental nas áreas do Marco Zero, essenciais para o processo de recuperação das áreas impactadas pelo rompimento da barragem de rejeitos, com o intuito de avaliar a resposta do solo às atividades implementadas pelo projeto piloto e conduzir novas ações de reabilitação de outras áreas afetadas pelo rejeito.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização da área de estudo

O local de estudo foi no Parque da Cachoeira, localizada aproximadamente 4,5 Km do centro de Brumadinho e 8,6 Km da Barragem B1 da Mina Córrego-Feijão. Foram utilizados dois locais de amostragem, uma região afetada pela deposição do rejeito e em processo de reabilitação denominada Marco Zero (20°09'17" Sul e 44°09'33" Oeste) e uma área próxima de mata nativa utilizada como referência (20°09'36" Sul e 44°09'13" Oeste) (Figura 1).

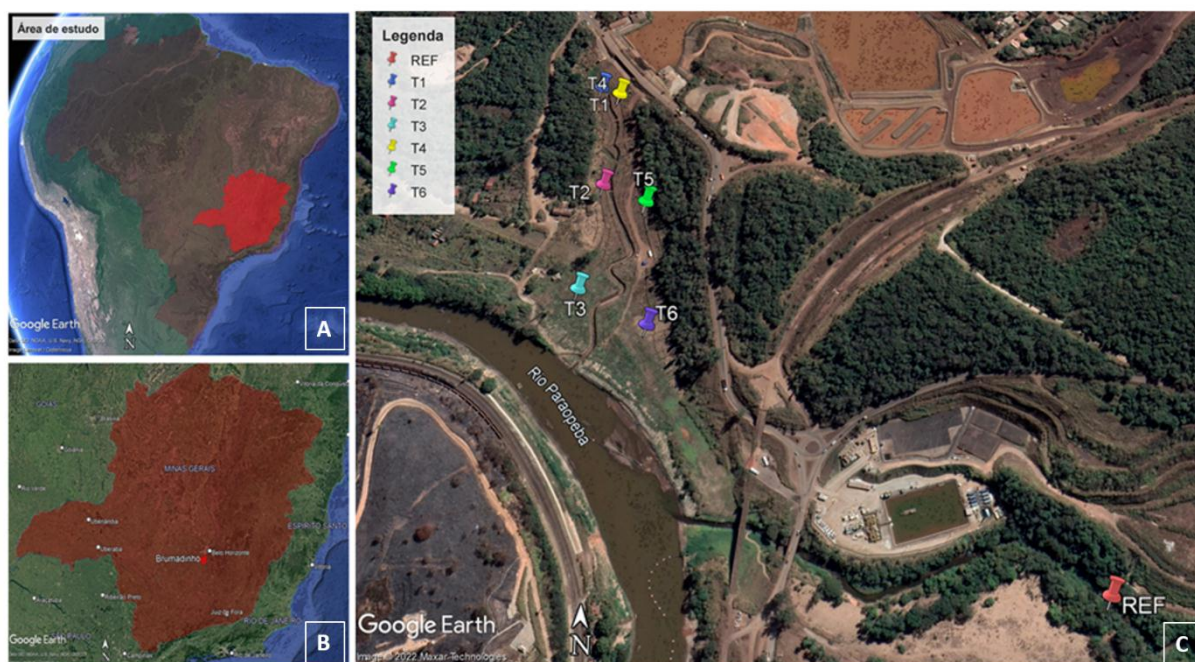


Figura 1. Mapa de localização da área de estudo. A) Localização do estado de Minas Gerais em vermelho dentro do Brasil; B) Localização do município de Brumadinho em vermelho dentro do estado de Minas Gerais. C) Localização dos Transectos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, nas cores azul, rosa, azul claro, amarelo, verde e roxo, respectivamente, pertencentes a área em reabilitação e da área de mata, utilizada como Referência, em vermelho.

Esta região afetada pelo rejeito foi a primeira a ser restaurada entre todas as áreas afetadas pelo derramamento provenientes do rompimento da barragem

pertencente à mineradora Vale. O projeto piloto de reabilitação denominado Marco Zero consiste na reconstituição das condições originais do ribeirão Ferro-Carvão e na revegetação com plantas nativas da região das matas ciliares; A implementação desse projeto ocorreu em 3 etapas: a primeira etapa consistiu na retirada de 130 mil m³ de rejeitos no trecho e reconstrução do canal do leito do ribeirão Ferro-Carvão, com deposição de terra vegetal fértil (*topsoil*) e hidrossemeadura de espécies herbáceas, na segunda etapa foi realizada o plantio de mudas de médio porte e na terceira etapa consistiu no plantio de mudas de espécies nativas da região (VALE, 2020) (Figura 2). O Ribeirão Ferro-Carvão deságua no rio Paraopeba, neste estágio inicial de revegetação se encontra inativo, pois está sendo descontaminado e seu curso pós-tratamento está sendo desviado para o Córrego Casa Branca. A área utilizada como referência é uma área de mata nativa, onde passa o córrego Casa Branca.



Figura 2. Registro da área do projeto de reabilitação da calha do Ribeirão Ferro-Carvão, denominada Marco Zero, em Brumadinho MG. Foto: arquivo Vale (2020).

2.2. Amostragem do solo

A amostragem do solo foi realizada na estação seca no mês de agosto de 2021 e na estação chuvosa em março de 2022. Para a área em reabilitação, denominada Marco Zero, foram coletadas as amostras em 6 transectos ao longo das margens esquerda e direita do Ribeirão Ferro-Carvão. Cada transecto (T) foi composto com 2 amostras compostas, chamadas de pontos, o ponto 1 perto do ribeirão sofreu mais intervenções das técnicas de engenharias na reconstrução do canal e o ponto 3 perto da floresta remanescente sofreu menos alterações no processo de reabilitação da área, as amostras foram coletadas em profundidade de 0 a 20 cm, totalizando 12 amostras da área do Marco Zero por coleta. As amostras na área de referência (R) foram coletadas nas margens do Córrego Casa-Branca (ponto 1) e mais adentro da floresta (ponto 3), na profundidade de 0 a 20 cm, totalizando 2 amostras por coleta.

2.3. Extração de DNA total das amostras

A extração de DNA total das amostras foi feita em triplicata com o kit *DNeasy PowerSoil Pro Kit* (QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante com modificações, foi realizado a adição de duas etapas de lise enzimática logo após a adição do primeiro reagente do kit, foi utilizado 100 mg mL⁻¹ de Lisozima e as amostras foram incubadas em banho maria a 37 °C por 30 min, com agitação a cada 10 min, em seguida foi colocado 10 mg mL⁻¹ de Proteinase K e 2% de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), as amostras foram incubadas a 60°C por 60 minutos com agitação a cada 10 min. Após as etapas adicionais de lise enzimáticas, seguiu-se a metodologia indicada pelo fabricante.

A qualidade do DNA foi verificada com a quantificação em *Nanodrop* (*Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies Inc., USA*) e por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com o agente intercalante *Gel Red* (*Biotium, USA*) e visualizado em transiluminador (*Applied Biosystems, USA*).

2.4. Sequenciamento de *Amplicon* e análises de dados

As amostras foram enviadas em triplicata para sequenciamento na empresa *Novogene Corporation Inc.* (en.novogene.com, Sacramento, USA) usando a plataforma *Illumina NovaSeq 6000*, e a região utilizada foi a V3-V4 do gene RNAr 16S para identificação taxonômica de bactérias.

O pacote DADA2 (CALLAHAN et al., 2016) no *software* R (R Core Team, 2021) foi utilizado para processar os dados brutos do sequenciamento, como a filtração das 72.617 leituras brutas (48.584 foram removidas e 24.033 restaram), sequências de baixa qualidade e quimeras foram removidas e a inferência das ASV (*Amplicon Sequence Variant*) foram realizadas a posteriori. O banco de dados SILVA versão 132 foi utilizado para atribuir a taxonomia filogenética. As análises multivariadas e de diversidades foram realizadas utilizando o *software* R (R Core Team, 2021) com o pacote *mctoolsr* (<https://github.com/leffj/mctoolsr>). A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada utilizando a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis, em nível de ASV, e as diferenças significativas entre as áreas foram testadas usando a Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) com o teste Adonis no pacote *Vegan* para o *software* R (R Core Team, 2021).

Para a análise de predição funcional foi utilizado o banco de dados *Functional Annotation of Prokaryotic Taxa - FAPROTAX* (LOUCA et al., 2016). A análise LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*) foi utilizada para definir bioindicadores das áreas estudadas em nível de ASV (*Amplicon Sequence Variant*), e as funções relativas à predição funcional (SEGATA et al., 2011).

2.6. PCR quantitativo (qPCR)

A abundância dos genes funcionais relativos aos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio (NarG – Nitrato redutase ligada a membrana e AmoA - Amônia monooxigenase), bem como o gene 16S rRNA foram analisadas por meio da quantificação por qPCR (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos pares de primers utilizados direcionados a genes taxonômicos e relativos ao ciclo de nitrogênio.

Gene de interesse	Identificação do primer	Sequência (5'-3')	pb	Função	Referência
RNAr 16S	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	491	Marcador taxonômico	MUYZER; DE WAAL; UITTERLIN DEN (1993); WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG			
AmoA	amoA - 1Fmod	CTGGGGTTTCTACTGGTGGTC	120	Nitrificação: oxida amônia a hidroxilamina	CRANE <i>et al.</i> (2018)
	GenAOBR	GCAGTGATCATCCAGTTGCG			
NarG	narG1960m2F	TAYGTSGGGCAGGARAACTG	110	Desnitrificação: redução do nitrato	
	narG2050m2R	CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGTT			

2.6.1. Preparo do produto de PCR

A partir da extração de um solo controle foi feito o PCR dos fragmentos de interesse para a clonagem, necessária para a confecção da curva padrão utilizada no PCR quantitativo. Para o PCR foi utilizado o Kit *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* nas concentrações: 1x *GoTaq® Flexi Buffer*, 6mM de $MgCl_2$, 10mM de dNTP mix, 0.4 μM de cada primer *forward* e *reverse*, 1.25u de *GoTaq® DNA Polymerase*, 1 μl do DNA *template* e água *nuclease-free* para o volume final de 50 μl , segundo recomendações do fabricante (*Promega Corporation, USA*). A ciclagem térmica utilizada foi: desnaturação inicial a 95°C por 5', 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20", anelamento a 60 °C por 50" e extensão a 72 °C por 30", a extensão final foi de 5' a 72 °C para os primers de amoA e narG e para 16S a ciclagem utilizada foi: desnaturação inicial a 95°C por 5', 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1', anelamento a 58 °C por 1' e extensão a 72°C por 30", a extensão final foi de 5' a 72 °C.

Os produtos de PCR foram verificados quanto sua qualidade em gel de agarose 2% corado com o agente intercalante *Gel Red* (*Biotium*, USA) e visualizado em transluminador (*Applied Biosystems*, USA). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega Corporation*, USA) e quantificados em *Qubit* (*Qubit Fluorometric Quantification*, *ThermoFisher Scientific*, USA).

2.6.2. Ligação Inseto-Vetor pGEM®-T Easy Vector

A partir da quantificação, os produtos de PCR purificados foram clonados em um vetor pGEM®-T Easy Vector (*Promega Corporation*, USA), seguindo o protocolo do fabricante.

2.6.3. Preparo de Células Ultracompetentes

A célula de *Escherichia coli* TOP10F foi plaqueada em meio Luria-Bertani (LB) ágar e incubada a 37 °C *overnight*. Colônias isoladas foram selecionadas e colocadas em 10 ml de meio LB líquido e deixadas para crescer a 37 °C em agitação a 150 rpm *overnight*, para fazer um pré-inóculo. Cinco mililitros deste pré-inóculo foram inoculados em 500 ml de LB líquido e incubadas a 37 °C com agitação a 150 rpm até atingir a densidade ótica (DO) de 0,3. As células foram colocadas 5 min no gelo e todo volume foi centrifugado a 1600 g por 10 min a 4°C. As células foram gentilmente ressuspensas em 100 ml de tampão Ca²⁺/glicerol (CaCl₂ 60mM; PIPES 10mM; Glicerol 15%, pH 7) esterilizado e gelado e centrifugadas novamente a 1600 g por 10 min a 4 °C. A lavagem com de tampão Ca²⁺/glicerol foi repetida 1 vez. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão Ca²⁺/glicerol gelado, incubados no gelo por 30 min e centrifugadas a 1600 g por 5 min a 4 °C. As células foram gentilmente ressuspensas em 12 ml de tampão Ca²⁺/glicerol gelado. As células foram aliqüotadas em microtubos e armazenadas a -80°C.

2.6.4. Transformação de Células Competentes por Choque Térmico.

As ligações inserto-vetor foram transformadas em células competentes de *Escherichia coli* TOP10F. A transformação foi feita pela técnica de choque térmico segundo o protocolo do kit *pGEM®-T Easy Vector* (Promega Corporation, USA) com modificações: 10 µl da ligação inserto-vetor foram adicionadas a 100 µl da célula ultra competente em um microtubo de 2 ml, o mesmo foi incubado a 42 °C por 45 s, e posteriormente colocado em gelo por 5 min, após esse período 750 µl de meio líquido Luria-Bertani suplementadas com 100 mg mL⁻¹ de ampicilina pré-aquecido a 37 °C foram adicionados ao microtubo, as células foram incubadas a 37 °C com agitação de 150 rpm por 1h30min e posteriormente centrifugadas a 8000 g por 5 min. O pellet foi ressuspenso em 500 µl de meio líquido Luria-Bertani suplementadas com 100 mg · mL⁻¹ de ampicilina. Foram plaqueados 100 µl das células em meio seletivo ágar Luria-Bertani suplementado com ampicilina (0,2 mM), X-Gal (40 µg mL⁻¹) e IPTG (100 µg · mL⁻¹), as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. As colônias recombinantes de coloração branca foram escolhidas e separadas, foram crescidas em meio líquido Luria-Bertani suplementadas com 100 mg mL⁻¹ de ampicilina e incubadas a 35 °C por 24 h.

2.6.5. Extração de DNA plasmidial de *Escherichia coli* - Mini prep

Para determinar se os plasmídeos receberam o inserto de interesse, foi realizado a extração plasmidial (Mini Prep) da cultura crescida por 24 h das colônias recombinantes. Para a obtenção do pellet, 5 ml da cultura foi centrifugada e nele foi adicionado 300 µl da solução I (Sacarose 50 mM; Tris-HCl pH 8,0 25 mM; EDTA pH 8,0 10 mM e H₂O q.s.p 10mL), e 1,5 µl de RNase (10mM), a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. Foram adicionados 300 µl da solução II (NaOH 0.2 N; SDS 1 % e H₂O q.s.p. 5 mL - feita na hora para evitar precipitação). As amostras foram homogeneizadas por inversão de 7 a 10 vezes e imediatamente foi adicionado 200 µL da Solução III (Acetato de Potássio 5 M; 11,5 mL de Ácido Acético Glacial e H₂O q.s.p 100 mL). A homogeneização foi feita novamente por inversão de 7 a 10 vezes. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 min; o sobrenadante foi

recuperado e transferido para um microtubo novo. Para a etapa de precipitação, 500 μL de isopropanol à temperatura ambiente foi adicionada e a mistura foi homogeneizada gentilmente; a precipitação ocorreu à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 40'; a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm por 15' e o sobrenadante foi descartado. Para a etapa de lavagem do DNA, 500 μL de etanol 70 % foi adicionado a mistura que posteriormente foi centrifugada a 13.000 rpm por 15'. O sobrenadante foi descartado e a etapa foi repetida com etanol 100 %; o DNA foi colocado para secar e após a secagem o mesmo foi ressuscitado em 30 μl de água milli-Q estéril; as amostras foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O produto da extração foi verificado por eletroforese em gel de agarose 2 % corado com o agente intercalante *Gel Red* (Biotium, USA) e visualizado em transiluminador (*Applied Biosystems*, USA). Para confirmar a presença dos insertos de interesse nos plasmídeos foi realizado um PCR convencional com os primers da região M13 presente no vetor: M13F (5'-TGTAACGACGGCC-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATG-3'), a ciclagem térmica utilizada foi: desnaturação inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5', 30 ciclos de desnaturação a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30", anelamento a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30" e extensão a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45", a extensão final foi de 45" a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6.6. Quantificação em qPCR

Para confecção da curva padrão os plasmídeos extraídos a partir do Mini Prep linearizados contendo os genes alvos foram diluídos em série 10^{10} - 10^6 cópias μl^{-1} para 16S e 10^5 - 10^1 cópia μl^{-1} para os genes funcionais (*narG* e *amoA*) e as curvas padrões foram montadas com o coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,996.

A reação de qPCR foi feita com 10 μl , sendo, 5 μl de *GoTaq@ qPCR Master Mix* e 3,2 μl de H_2O *nuclease free* (*Promega Corporation*, USA), 0,4 μl de cada *primer forward* e *reverse* (200 μM) e 1 μl de DNA (3ng μl^{-1}). Para a ciclagem térmica utilizou-se o padrão do equipamento *Eco™ Real-Time PCR System* (*Illumina Inc.*, USA), realizada nas seguintes condições: incubação IDG a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2', ativação da polimerase a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10', 40 ciclos de PCR $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10" e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30", curva de *Melt* a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15", $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15" e $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15".

2.6.7. Análises de dados PCR em tempo real

Os dados foram gerados pelo *software EcoStudy* do *equipamento Eco™ Real-Time PCR System (Illumina Inc., USA)* e os gráficos foram gerados utilizando o *software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA, graphpad.com)* e os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, p-valor de 0,05, utilizando o software estatístico Minitab (MINITAB, 2021).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Estrutura da comunidade microbiana do solo

O estudo da estrutura e diversidade da comunidade microbiana possibilita compreender como ocorre as interações entre a microbiota e as outras comunidades biológicas presentes naquele habitat, entender essa multifuncionalidade do solo é essencial para a manutenção de ecossistemas biológicos de forma sustentável (LI, Jiajia *et al.*, 2022).

A diversidade microbiana de um certo habitat nos ajuda a entender aspectos importantes sobre o padrão de distribuição das espécies dentro de um ecossistema e como a estrutura desta comunidade funciona neste ambiente em que está inserida. Essa diversidade pode ser medida por meio de índices matemáticos como o de *Shannon-Wiener*, o índice de *Simpson* e o índice de riqueza (ZILLI *et al.*, 2003) e são frequentemente relacionadas com indicadores da saúde dos sistemas ecológicos (MAGURRAN, 1988).

O índice de diversidade de *Shannon-Wiener* (H') é amplamente utilizado para mensurar a diversidade de uma comunidade biológica em um habitat, ele leva em consideração a riqueza e a abundância das espécies (MAGURRAN, 2004), quanto maior o valor do índice maior a diversidade da comunidade neste ambiente (LIMA *et*

al., 2022). YANG e colaboradores (2022) relatam que a diversidade da comunidade microbiana pode aumentar com a reabilitação da vegetação no habitat.

Os índices de *Shannon-Wiener* (H'), tanto das áreas de referência, quanto às áreas em processo de reabilitação apresentaram valores entre 5,5 a 7. Este índice foi semelhante aos valores encontrados para solos contaminados por rejeitos de mineração ($S = 4,7 - 7,5$) (LIMA *et al.*, 2022), solos de uma floresta de madeira dura ($S = 6 - 6,5$), um pouco menor do que o valor encontrado em solo de charneca seca em uma tundra ($S = 7,5$) (RIVERA-RIVERA; CUEVAS, 2020), e foi alto quando comparado a estudos em solo de reserva natural de mangue ($S = 3,02$) (YU *et al.*, 2014) e solo de floresta de coníferas da Noruega ($S = 3,5$) (RIVERA-RIVERA; CUEVAS, 2020).

A área em reabilitação apresentou diferença ($p < 0,05$) em relação à área em reabilitação apenas na estação seca (coleta 1) (Figura 3) (Tabela S1). Analisando a área afetada em relação aos pontos dos transectos, os pontos mais próximos ao ribeirão (ponto 1) apresentaram menor diversidade em detrimento ao ponto mais próximo à floresta (ponto 3). Tal resultado pode ser explicado pelo fato de os pontos próximos ao ribeirão terem sido mais afetado pelos processos mecânicos da reabilitação no local. Contudo, percebemos que essa diferença diminui na estação chuvosa (coleta 2), indicando que a umidade pode ter afetado a comunidade microbiana alterando assim, os índices de diversidade observados entre os pontos da área restaurada e também entre elas e a área de referência.

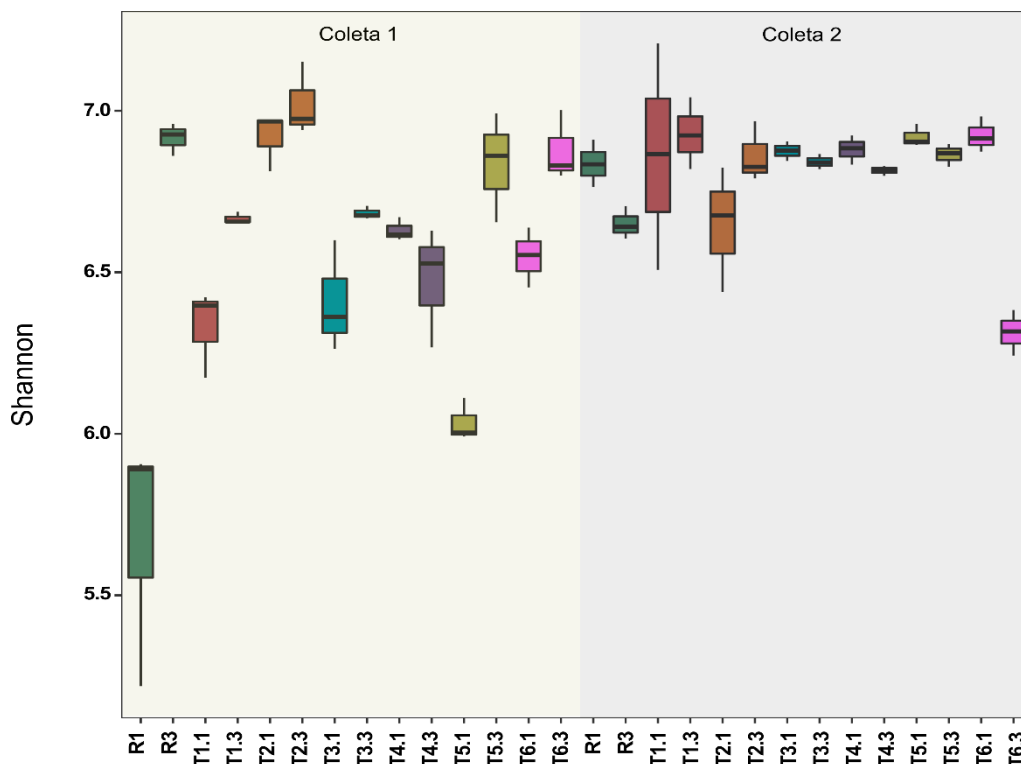


Figura 3. Índice de *Shannon-Wiener* da comunidade microbiana do solo das áreas estudadas: áreas de referência (R) em verde e Transectos (T) 1,2,3,4,5 e 6 em vermelho, laranja, azul, roxo, amarelo e rosa, respectivamente, da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, as mesmas cores representam a mesma área em ambas estações.

Os Índices de *Simpson*, tanto das áreas de referência, quanto das áreas em processo de reabilitação apresentaram valores entre 0,97 a 1,0, mostrando a ocorrência de dominância de espécies nas áreas estudadas. O índice de *Simpson* é um índice de dominância, que representa a probabilidade de dois indivíduos selecionados de forma aleatória pertençam a mesma espécie. Os valores variam de 0 a 1 e quanto maiores forem, maior será essa probabilidade e maior então a dominância entre as espécies na comunidade (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018; URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005). A mesma tendência do índice de *Shannon* foi observada para o índice de *Simpson*, na estação seca (coleta 1), os pontos mais próximos ao ribeirão (ponto 1) apresentaram menor índice em detrimento ao ponto mais próximo à floresta (ponto 3), porém na estação chuvosa (coleta 2), essa diferença diminuiu e os dados são apresentados de forma mais homogênea, indicando mais uma vez que a umidade pode ser um fator chave para as alterações das comunidades microbianas. Houve também diferença entre os valores da referência 1 e dos pontos

dos transectos mais próximos ao ribeirão ($p > 0.05$), que apresentou valor menor na estação seca (coleta 1) (Figura 4) (Tabela S1).

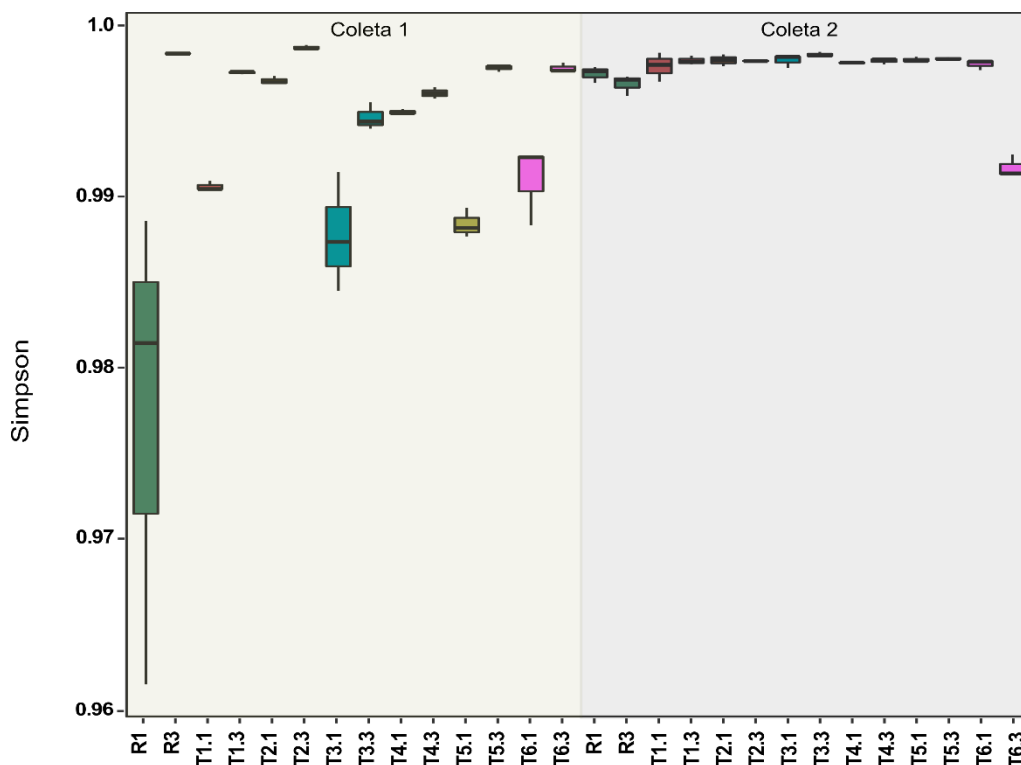


Figura 4. Índice de Simpson da comunidade microbiana do solo das áreas estudadas: áreas de referência (R) em verde e Transectos (T) 1,2,3,4,5 e 6 em vermelho, laranja, azul, roxo, amarelo e rosa, respectivamente, da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, as mesmas cores representam a mesma área em ambas estações.

A riqueza diz respeito ao número total de espécies observadas na comunidade da respectiva área, representada em unidades de espécie (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018; URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005). A riqueza encontrada para as áreas de referência foram de 777 a 1676, já as áreas em reabilitação apresentaram valores entre 1308 a 2025. Em um estudo também com áreas afetadas por rejeito de mineração, LIMA e colaboradores (2022) encontraram valores de 1169 e 634 para duas áreas afetadas e 1816 para a área de mata não afetada, este estudo foi realizado na área impactada pelo rompimento da barragem em Mariana - MG, contudo, tratamentos diferentes foram realizados nesta área, o plantio de mudas foi realizado sob o rejeito enquanto que, na região de Brumadinho o

rejeito foi retirado e um *topsoil* foi colocado, o que explicaria os valores maiores de riqueza.

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores observados para riqueza entre os pontos 1 e 3 dos transectos tanto na estação seca (coleta 1) quanto na chuvosa (coleta 2). Contudo, quando comparamos os valores dos pontos entre as coletas, apenas o transecto 2 apresentou diferença no ponto 1 da estação chuvosa ($p < 0,05$), tendo valor maior do que na estação seca. Em relação à referência, os pontos dos transectos 2, 3, 4 e 6 próximo ao ribeirão apresentaram diferença significativa em relação aos valores da referência 1, apresentando valores maiores na estação seca (Figura 5) (Tabela S1).

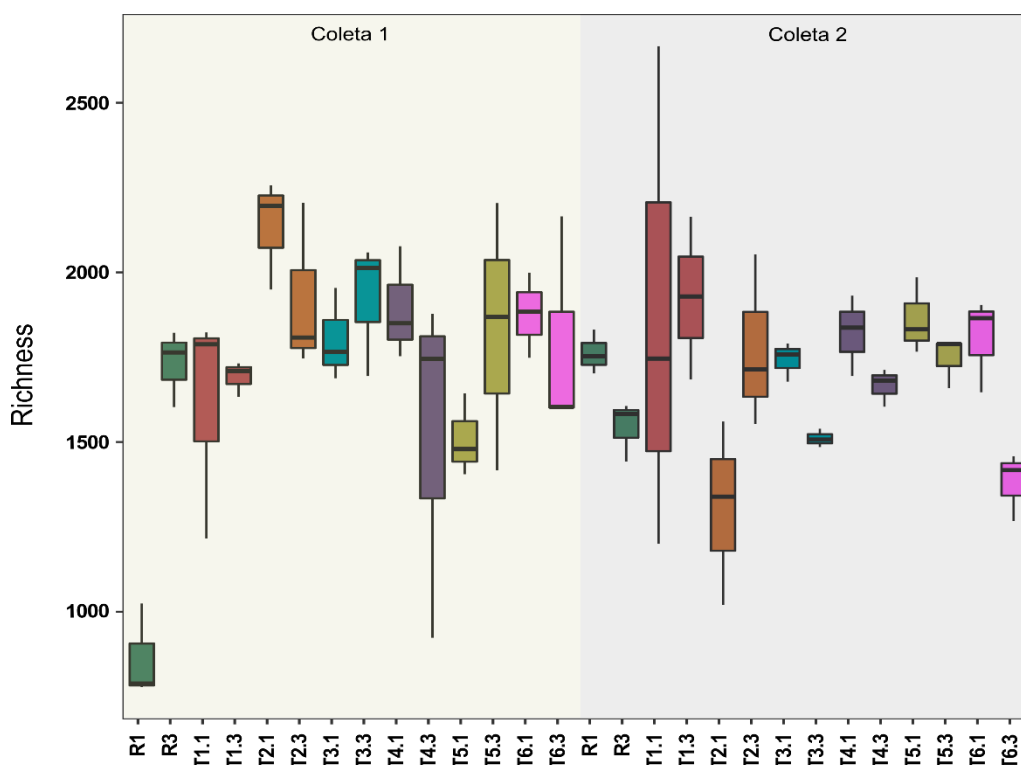


Figura 5. Riqueza estimada da comunidade microbiana do solo das áreas estudadas: áreas de referência (R) em verde e Transectos (T) 1,2,3,4,5 e 6 em vermelho, laranja, azul, roxo, amarelo e rosa, respectivamente, da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, as mesmas cores representam a mesma área em ambas estações.

A análise de PCoA foi realizada por meio da composição da comunidade bacteriana do solo a nível de ASV. No período seco, foi possível observar a formação

de dois agrupamentos distintos, as amostras da área de referência agruparam-se entre si, enquanto as amostras em reabilitação formaram outro agrupamento (Figura 6), sendo que esses dois agrupamentos mostraram-se dissimilares e estatisticamente diferentes ($p = 0,001$) pelo teste Adonis. Quando avaliamos as amostras em reabilitação, também foi possível observar que, de forma geral, as amostras referentes ao ponto 1 agruparam-se separadamente das amostras referentes ao ponto 3, mostrando uma dissimilaridade entre os pontos próximos ao ribeirão daqueles mais distantes. Na estação chuvosa (coleta 2) (Figura 7), ainda observamos o agrupamento das áreas de referência e que se mostra estatisticamente diferente ($p = 0,001$) dos pontos das áreas em reabilitação. Contudo há uma tendência de alguns transectos na área em reabilitação estarem mais próximos à área de referência, indicando mais uma vez que o tempo pode ser um fator essencial para o processo de recuperação da comunidade microbiana.

Também foi possível observar que os pontos próximos ao ribeirão (pontos 1) e os pontos mais distantes (pontos 3) estão menos dissimilares entre si na estação chuvosa (coleta 2), isso pode ser tanto um indicativo do tempo, quanto um efeito do processo de alagamento que ocorreu na área neste período, que pode ter causado uma homogeneização dos sedimentos depositados na área afetada.

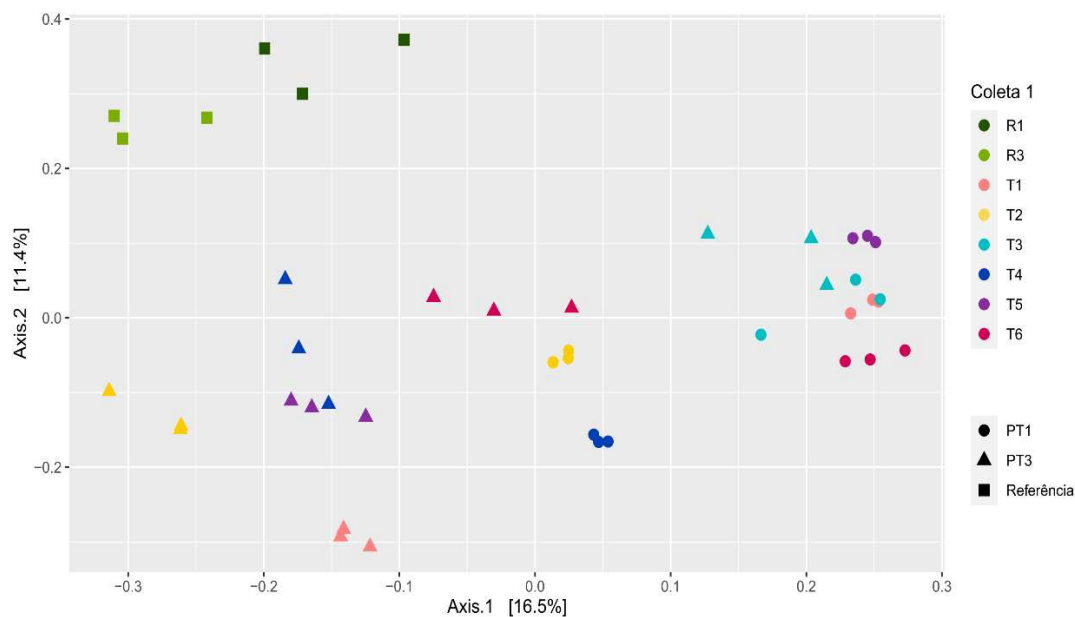


Figura 6. Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade microbiana do solo na estação seca das áreas estudadas: Transectos (T) 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representadas pelas cores rosa claro, amarelo, azul claro, azul, roxo e rosa, respectivamente, da área em reabilitação, círculos representam o ponto 1 mais perto ao ribeirão, triângulos representam o ponto 3 mais perto à floresta, quadrados representam as áreas de referência em tons de verde.

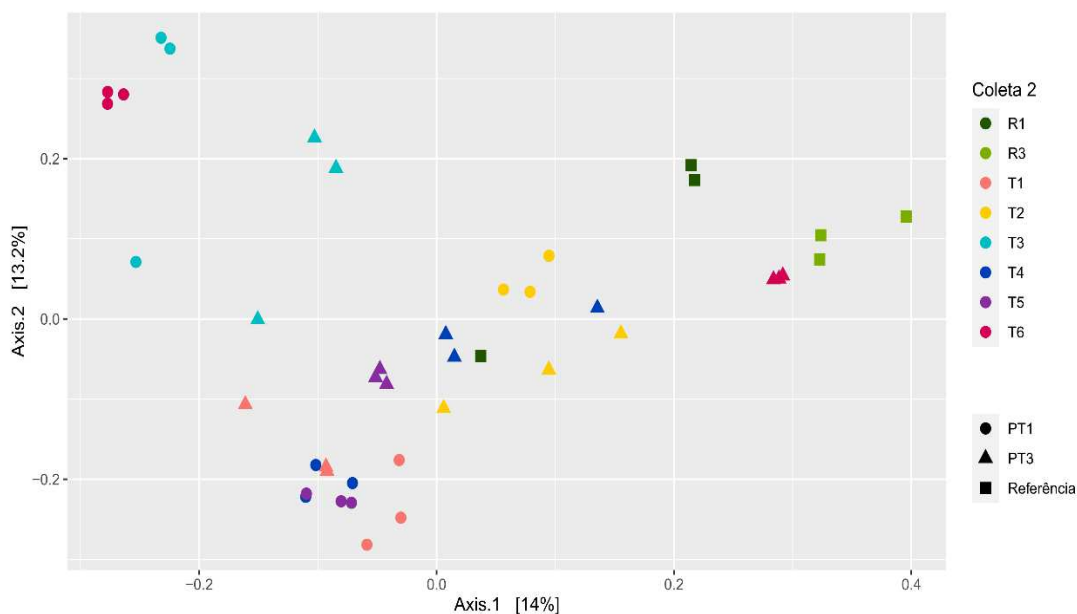


Figura 7. Análise de coordenada principal (PCoA) da comunidade microbiana do solo na estação chuvosa das áreas estudadas: Transectos (T) 1, 2, 3, 4, 5 e 6 representadas pelas cores rosa claro, amarelo, azul claro, azul, roxo e rosa, respectivamente, da área em reabilitação, círculos representam o ponto 1 mais perto ao ribeirão, triângulos representam o ponto 3 mais perto à floresta, quadrados representam as áreas de referência em tons de verde.

O sequenciamento resultou em 72.617 variantes de sequência de amplicon (ASVs), das quais 24.033 foram selecionadas após a etapa de filtragem das sequências. As ASVs de todas as amostras foram classificadas em 39 filios, sendo 35 pertencentes ao domínio Bacteria e 4 pertencentes ao domínio Archaea. Os 5 filios mais abundantes em todas as amostras foram: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, e Chloroflexi, representando de 86,1% e 84,7% da abundância total das amostras, nas coletas 1 e 2 respectivamente.

A média dos filios mais abundantes em relação às áreas em reabilitação na estação seca (coleta 1) foram: Proteobacteria (43,7%), Actinobacteria (22,3%), Acidobacteria (10,6%), Bacteroidetes (5,8%) e Chloroflexi (4,5%), para as áreas de referência: Proteobacteria (35,1%), Actinobacteria (21,9%), Acidobacteria (19,5%), Bacteroidetes (6,5%) e Chloroflexi (4%) (Figura 8).

Na estação chuvosa (coleta 2) a média dos filios mais abundantes em relação às áreas em reabilitação foram: Proteobacteria (42,4%), Actinobacteria (16,7%), Acidobacteria (12,3%), Bacteroidetes (3,7%) e Chloroflexi (7,5%), para as áreas de referência: Proteobacteria (47,2%), Actinobacteria (20,9%), Acidobacteria (13,1%), Bacteroidetes (2,2%) e Chloroflexi (5,8%) (Figura 9).

Observa-se que o filo Proteobacteria foi o mais abundante seguido de Actinobacteria e Acidobacteria em todas as amostras, o que é comum para amostras de solo, uma vez que são descritos pela literatura como os mais abundantes em diversos tipos de solo, incluindo solos contaminados por rejeitos e solos em processo de reabilitação (CHEN, Xiaolin *et al.*, 2022; MA *et al.*, 2022; WU, Bohan *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2018).

Proteobactérias são classificadas como bactérias gram-negativas, estritamente anaeróbios ou anaeróbios facultativos que participam de funções essenciais do solo e são descritas como bactérias que atuam na degradação de poluentes possuindo alta tolerância a áreas contaminadas por metais pesados participando ativamente do ciclo de carbono e do nitrogênio através da fixação de N em ambientes extremos, elas são favorecidas pela contaminação do solo por metais

pesados, sendo então dominantes neste tipo de solo (MA *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2022; e SUN *et al.* 2018).

Já as Actinobacteria são classificadas como bactérias gram-positivas de alta abundância em solos, estão presente em áreas de mineração, pois possuem a capacidade de produzir esporos, o que as torna mais resistentes a ambientes com algum tipo de estresse e que podem reduzir as concentrações de metais pesados através de seu metabolismo secundário, pois possuem um rico *pool* de enzimas metabólicas que as permitem se adaptarem e colonizarem habitats extremos (MA *et al.*, 2022; WU, Bohan *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2018).

Algumas bactérias pertencentes a este filo podem solubilizar fósforo sugerindo assim uma vantagem ecológica importante na relação planta-microrganismo podendo estar relacionado as espécies arbóreas de reabilitação de vegetação (CHEN *et al.*, 2022), e podem também estar associadas à defesa contra doenças do solo e melhoria da eficiência da nodulação radicular (SUN *et al.*, 2018).

As bactérias do filo Acidobacteria fazem parte de um grupo de decompositores presentes em ambientes oligotróficos, elas desempenham papéis importantes na degradação da biomassa vegetal lignocelulósica em vários ambientes ácidos e solos não revegetados e estão envolvidas na renovação de diversos polissacarídeos estruturais e de armazenamento, e na resiliência de ambientes deficientes de nutrientes (SUN *et al.*, 2018).

Os Bacterioidete também estão envolvidos na degradação de matéria orgânica e são considerados decompositores de rápido crescimento e ação rápida (SUN *et al.*, 2018). Este filo tem a característica de secretar conjuntos diversos de enzimas ativas de carboidratos (CAZymes), que conferem a ele a capacidade de prosperar em diversos habitats em especial os solos (LARSBRINK; MCKEE, 2020).Juntamente com as actinobactérias, as bactérias do filo Chloroflexi podem participar da melhoria do solo, pois possuem agrupamentos genéticos que os permitem desenvolver algumas estratégias para sobreviver em ambientes adversos (CHEN, Xiaolin *et al.*, 2022), além de desempenharem papel importante na respiração de açúcar, fermentação e fixação de dióxido de carbono (WU, Bohan *et al.*, 2022).

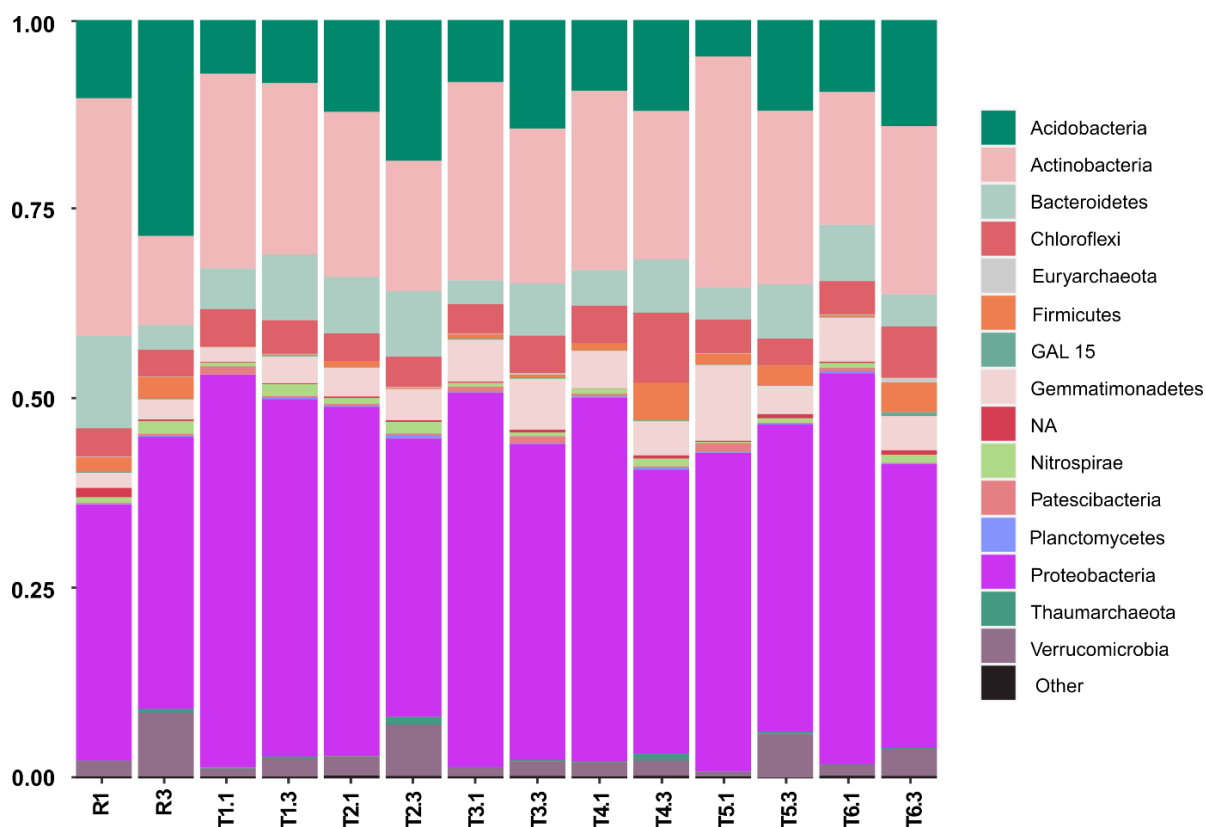


Figura 8. Média das abundâncias relativas em nível de filo para as diferentes áreas estudadas – Transectos (T) da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, e áreas de referência (R), em dois pontos: 1 perto ao ribeirão e 3 floresta à dentro, na estação seca.

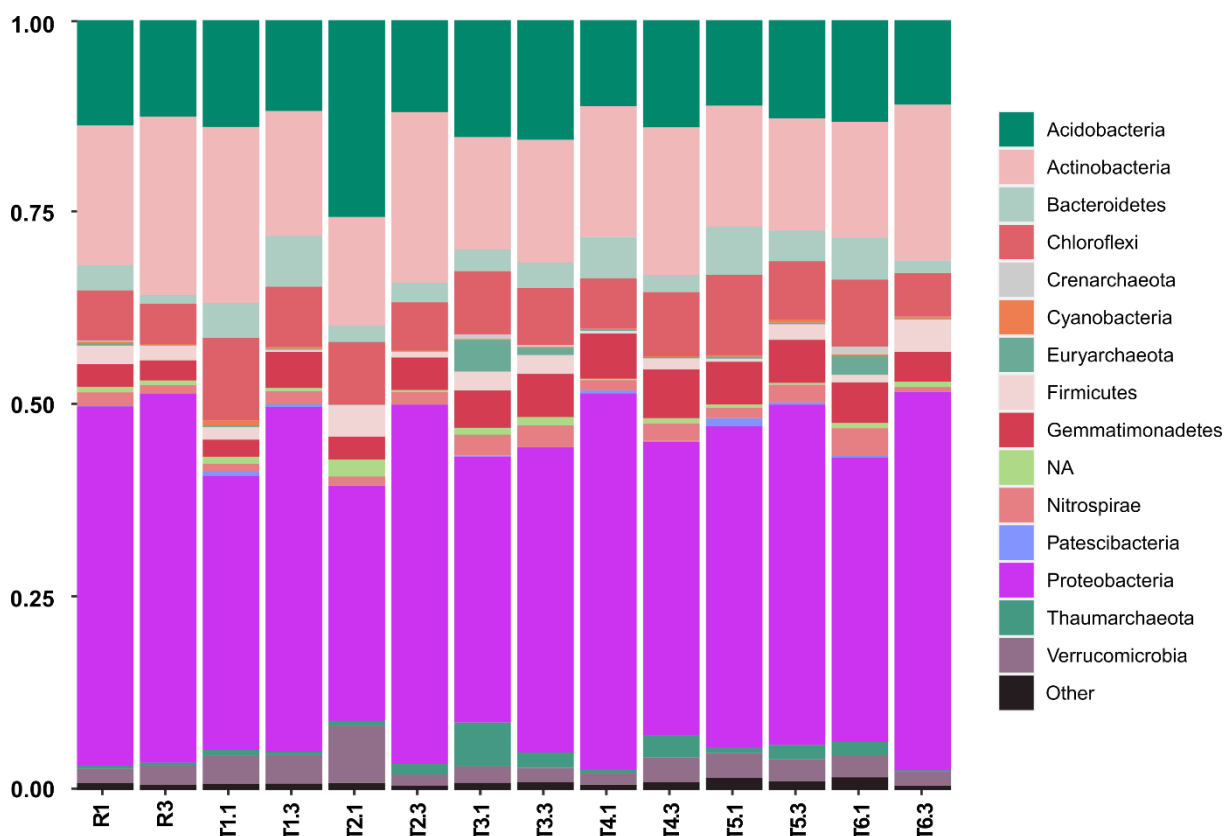


Figura 9. Média das abundâncias relativas em nível de filo para as diferentes áreas estudadas – Transectos (T) da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, e áreas de referência (R), em dois pontos: 1 perto ao ribeirão e 3 floresta à dentro, na estação chuvosa.

A análise em nível de gênero mostrou que as ASVs de todas as amostras foram classificadas em 622 gêneros sendo os 5 gêneros mais abundantes em todas as amostras: *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, *Reyranella*, *Streptomyces* e gêneros não identificados (NA).

A média dos gêneros mais abundantes em relação as áreas em reabilitação na estação seca foram: *Sphingomonas* (12,5%), *Bradyrhizobium* (3%), *Reyranella* (1,5%) e *Streptomyces* (2,2%), e para a área de referência: *Sphingomonas* (3,5%), *Bradyrhizobium* (2,6%), *Reyranella* (1,1%) e *Streptomyces* (1,3%) (Figura 10).

Na estação chuvosa, a média dos gêneros mais abundantes em relação as áreas em reabilitação foram: *Sphingomonas* (5,5%), *Bradyrhizobium* (3,3%),

Reyranella (1,3%) e *Streptomyces* (0,9%), e para a área de referência: *Sphingomonas* (2%), *Bradyrhizobium* (5,8%), *Reyranella* (1%) e *Streptomyces* (1,5%) (Figura 11).

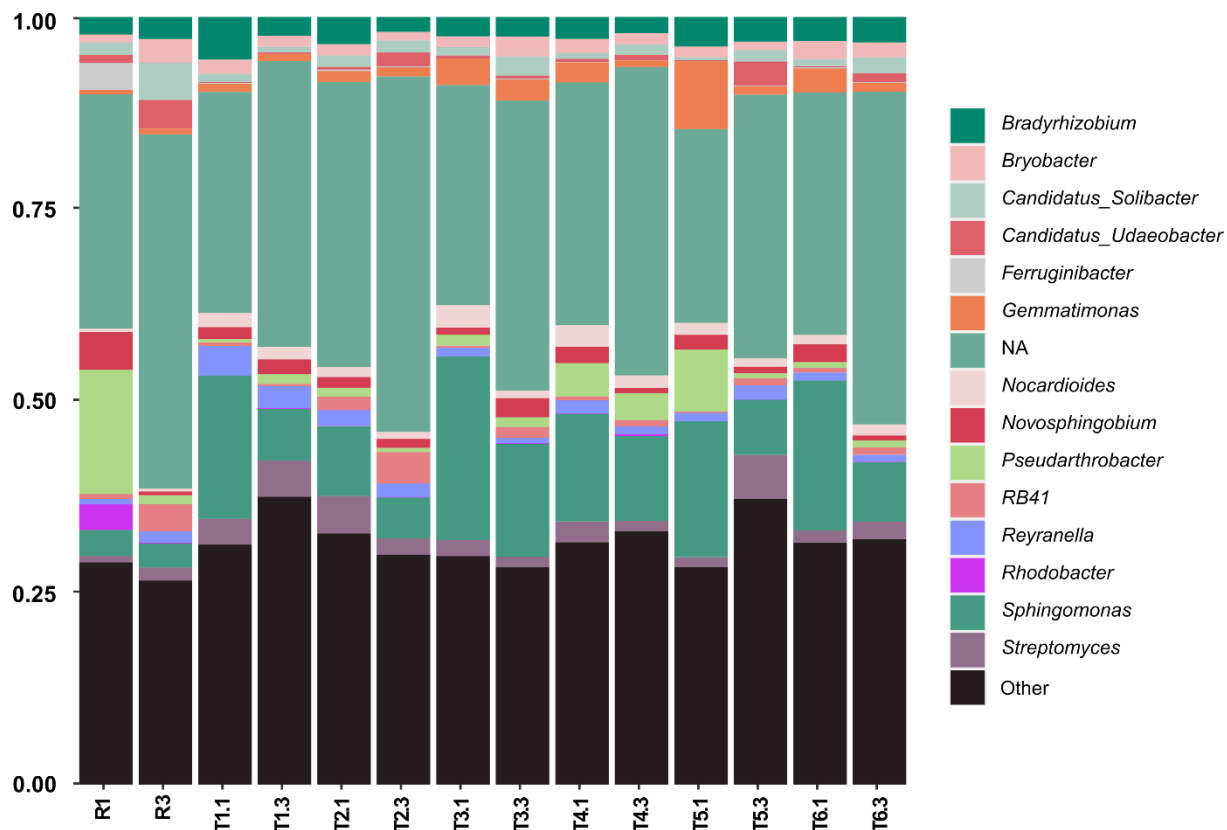


Figura 10. Média das abundâncias relativas em nível de gênero para as diferentes áreas estudadas – Transectos (T) da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, e áreas de referência (R), em dois pontos: 1 perto ao ribeirão e 3 floresta à dentro, na estação seca.

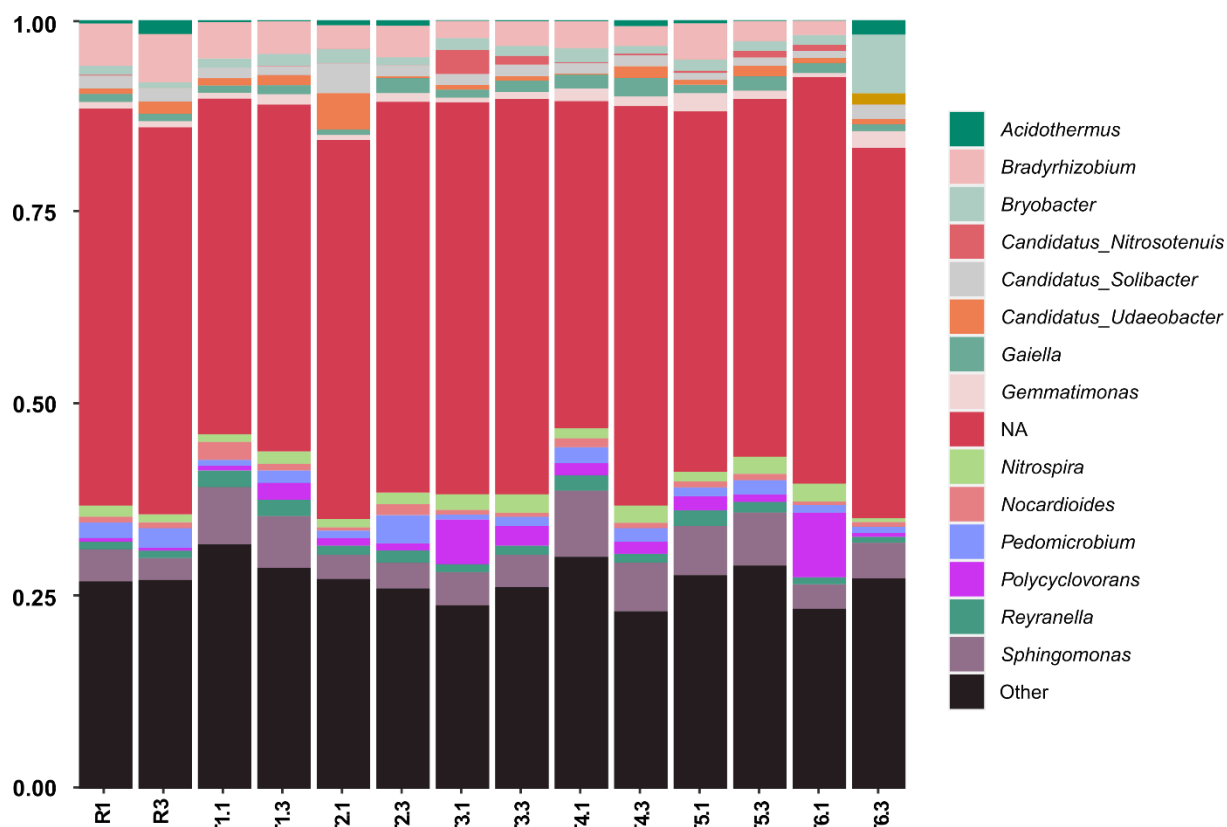


Figura 11. Média das abundâncias relativas em nível de gênero para as diferentes áreas estudadas – Transectos (T) da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, e áreas de referência (R), em dois pontos: 1 perto ao ribeirão e 3 floresta à dentro, na estação chuvosa.

Para detectar a abundância de táxons significativamente diferentes entre as áreas em reabilitação e entre as áreas de floresta utilizadas como referência, a análise LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*) foi aplicada. Esta análise permite avaliar quais os táxons são considerados bioindicadores para cada área. Na área em reabilitação foram encontradas um total de 29 ASVs bioindicadores, destes, 8 pertenceram ao gênero *Sphingomonas*, 7 foram gêneros não identificados e 2 foram pertencentes ao gênero *Nitrospira*, os demais tiveram 1 representante de cada gênero. Os gêneros indicadores foram: *Sphingomonas*, *Gemmatimonas*, *Tetrasphaera*, *Terrabacter*, *Reyranella* e *Nitrospira* (Figura 12).

O gênero *Sphingomonas* foi o mais abundante e o que obteve mais representantes para a área de reabilitação. Os representantes deste gênero são solubilizadoras de K que desempenham importantes papéis na ciclagem de nutrientes

do solo (SHI *et al.*, 2017), pois possuem genes envolvidos em promover o crescimento e nutrição de plantas, por possuírem nitrogenase, sendo então um gênero de bactérias fixadoras de N (CHEN, Xiaolin *et al.*, 2022). Esses microrganismos se adaptam e prosperam facilmente em ambientes contaminados por metais pesados, pois possuem genes que codificam enzimas envolvidas na resistência a metais pesados (ZHANG, Yihan; KINYUA, 2020). Possuem também alto poder de biodegradação de contaminantes como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) em diversos ambientes, incluindo solo (LIN *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2006), Além de apresentarem como antagonistas de fungos fitopatogênicos e secretam exopolissacarídeos gelanos altamente úteis (WHITE; SUTTON; RINGELBERG, 1996).

Assim como *Sphingomonas*, o gênero *Gemmatimonas* faz parte de um grupo que desempenha papéis dominantes na reciclagem de nutrientes nos solos, podem variar o uso metabólico de N ou C de acordo com suas necessidades, sendo então classificadas como bactérias fixadoras de N₂ (SHI *et al.*, 2017) e que podem participar do ciclo do carbono, pois contém centros de reação fotossintética (ZHANG, Hongchun *et al.*, 2017). É descrito como um gênero essencial na dissolução de fosfato e acúmulo de polifosfato, atuando na conversão do P inerte para o P disponível para as plantas (LU *et al.*, 2020; ZHANG, Hui *et al.*, 2003). Em um estudo sobre a estrutura da comunidade bacteriana após fertilização orgânica e inorgânica de longo prazo LI, Fang e colaboradores (2017) citaram que *Gemmatimonas* são abundantes em solos com matéria orgânica pirogênica, o que isso indicaria uma provável capacidade de decomposição de carbono poliaromático, e que sua presença no solo pode ser estimulada pela adubação fosfatada, neste mesmo estudo os autores indicam que as *Gemmatimonas* podem estar relacionadas ao crescimento de plantas e a supressão de doenças, pois são encontradas em alta abundância na rizosfera de plantações de trigos saudáveis. Este gênero pode ser utilizado como um bioindicador das limitações nutricionais da comunidade microbiana do solo, por participarem do metabolismo do N, C, P e na respiração do solo. Portanto a presença de *Gemmatimonas* no solo das áreas de reabilitação, indicam que esta área tem grande potencial para ciclagem de nutrientes (LU *et al.*, 2020).

Bactérias do gênero *Tetrasphaera*, pertencem a classe Actinobacteria e, apesar do escasso estudo deste gênero em amostras de solos, ela tem sido indicada

em vários estudos de sistemas de tratamento de águas residuais e lodo ativado como sendo um gênero importante para a remoção biológica de fósforo (PALATSI *et al.*, 2021; ZHANG, Yihan; KINYUA, 2020; FRIGON; WELLS, 2019; MARQUES *et al.*, 2017; FERRENTINO *et al.*, 2016). Elas absorvem Pi aerobicamente e armazenam-no intracelularmente e além disso, em condições anaeróbicas são versáteis na assimilação de diferentes substratos orgânicos como glicose e aminoácidos (PALATSI *et al.*, 2021; MARQUES *et al.*, 2017). FERRENTINO e colaboradores (2016) caracterizaram este gênero como organismos desnitrificantes acumuladores de fosfato (DPAOs), assim, são capazes de realizar a desnitrificação usando nitrato como aceptor de elétrons para a captação de fósforo, atuando então tanto na remoção de P quanto na remoção de nitrogênio total.

O gênero *Terrabacter* também pertence a Actinobacteria, e possui alta capacidade de metabolização e degradação de compostos orgânicos poluentes persistentes no solo, como dibenzofurano (HABE *et al.*, 2002), sulfadiazina (TAPPE *et al.*, 2015), resíduos toxicológicos de DDT (AISLABIE *et al.*, 1999), fluoreno (HABE *et al.*, 2005), fluoranteno (ZHOU *et al.*, 2006), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (LI, Xiaofei *et al.*, 2015), substâncias naturais como a queratina (MONTERO-BARRIENTOS *et al.*, 2005) e atuam na remoção de metais pesados através da biomineralização de carbonato (LI, Meng *et al.*, 2016).

Já o gênero *Reyranella* foi relatado em trabalhos que estudaram ambientes estressados ou impactados, como em solos com mineração de ferro (HONG *et al.*, 2015), rejeitos compostos de metais pesados (YAO *et al.*, 2022), rejeitos de mina de ouro (PARSANIA *et al.*, 2022), em águas subterrâneas (TANG, Shuting *et al.*, 2020), e em reservatórios de petróleo (SONG *et al.*, 2018). Estudo sobre a fisiologia e nicho ecológico da *Reyranella* ainda são escassos, entretanto, alguns estudos a descrevem como uma bactéria desnitrificante, capaz de reduzir nitrato e nitrito, diminuindo o teor de nitrogênio do solo além de ser capaz de degradar celulose (CHEN, Shu *et al.*, 2020; TANG, Shuting *et al.*, 2020; WU, Zhaojun *et al.*, 2020) e também por possuir alta capacidade de biodegradação de carbono (SONG *et al.*, 2018).

O gênero *Nitrospira*, filo Acidobacteria, são representados por bactérias aeróbicas e quimiolitotróficas, encontrados em diversos ambientes como água, solo e plantas, participam ativamente do ciclo do nitrogênio, pois são oxidantes de

nitrito (NOB) e também podem realizar a oxidação completa da amônia (comammox) (MEHRANI *et al.*, 2020). O processo de nitrificação convencional ocorre em duas etapas e necessita de dois grupos funcionais distintos, o processo de comammox realiza estas duas etapas em um único organismo, isso é uma recente descoberta, no entanto a atividade e a distribuição das bactérias pertencentes ao gênero *Nitrospira* que realizam esta função, ainda permanece desconhecida (XU *et al.*, 2020). As bactérias pertencentes a este gênero também são relatadas por serem resistentes a toxicidade de metais pesados, por se adaptarem facilmente a ambientes ácidos (WU, Bohan *et al.*, 2022) e por estarem associados à oxidação de ferro e enxofre, podendo ser um bioindicador do processo de oxidação biológica de rejeitos de mineração (LI, Yang *et al.*, 2016).

Observa-se, então, que a presença de *Sphingomonas*, *Gemmatimonas*, *Tetrasphaera*, *Terrabacter*, *Reyranella* e *Nitrospira* na área em reabilitação pode indicar uma comunidade capaz de realizar diversas funções relacionadas a biodegradação e ciclagem de nutrientes e matéria orgânica do solo, como aqueles depositados pelo rejeito de mineração presentes solo, principalmente quando levamos em consideração o alagamento da área na estação chuvosa que pode ter causado a sedimentação dos rejeitos ainda presentes no Rio Paraopeba e na estação de tratamento do Ribeirão Ferro-Carvão.

Já na área de referência os bioindicadores observados foram diferentes dos observados na área em recuperação, foram encontradas 61 ASVs bioindicadoras, destes 39 são gêneros não identificados, 3 pertencem ao gênero *Flavobacterium*, 2 pertencem a *Candidatus Udaeobacter*, 2 pertencem a *Candidatus Solibacter* e 2 pertencem a *Actinoplanes*, os demais tiveram 1 representante de cada gênero. Dentre os gêneros mais representativos seguido dos gêneros não identificados estão: *Nitrobacter*, *Phyllobacterium*, *Flavobacterium*, *Candidatus Udaeobacter* e *Candidatus Solibacter* (Figura 14), estes gêneros estão envolvidos principalmente com a ciclagem de matéria orgânica em solos florestais (WILLMS *et al.*, 2021; DAHAL *et al.*, 2020; LAF *et al.*, 2020; BAI *et al.*, 2015).

O gênero bioindicador de maior abundância na área de referência em relação a área em recuperação foi o *Nitrobacter*, que juntamente com *Nitrospira* fazem parte do grupo de oxidantes de nitrito (NOB), os quais são considerados os gêneros mais

funcionais dentre o grupo de oxidantes de nitrito (LIU *et al.*, 2022). O processo de nitrificação consiste em transformar a amônia em nitrato, esse processo é feito em duas etapas, na primeira ocorre a oxidação de amônia conduzidas por representantes de Bacteria (AOB) e Archaeae (AOA) oxidantes de amônia (AOB e AOA) e na segunda etapa o nitrito é oxidado a nitrato pelas bactérias que oxidam nitrito (NOB), este é um processo que ocorre em todos ecossistemas terrestres afim de regular a disponibilidade de N para as comunidades microbianas e para as plantas (SHEN *et al.*, 2022). Contudo, a abundância deste gênero no habitat pode inferir sobre a funcionalidade do sistema em relação ao ciclo biogeoquímico do nitrogênio em diversos tipos de solo, e *Nitrobacter* foi relatado em estudos como sendo o gênero dominante em nitrificação em solos florestais (LIU *et al.*, 2022; LAF *et al.*, 2020).

As bactérias do gênero *Phyllobacterium* presente como bioindicador da área de referência, são aeróbicas e Gram-negativas e estão diretamente interligado as plantas, diversos estudos apontam este gênero como pertencente ao grupo dos rizóbios, que tem como característica realizar associações simbióticas mutualísticas diretamente com leguminosas atuando no fornecimento de nutrientes para as mesmas, e um dos principais processos realizados pelos rizóbios é a fixação biológica de nitrogênio (DASGUPTA *et al.*, 2021; IKBAL *et al.*, 2020; COOPER; SCHERER, 2012). Este gênero vem sendo considerado bactérias probióticas que habitam uma planta alimentícia e medicinal chinesa chamada *Cordyceps militaris*, aumentando a qualidade da planta facilitando seu cultivo (ZHANG, Xiao-Mei *et al.*, 2021). Levando em consideração a interação planta-microrganismo que este gênero possui é esperado que ele esteja em maior abundancia na área de referência uma vez que a vegetação está mais estabelecida e estável nesta área.

Outro gênero bioindicador encontrado na área de referência foi *Flavobacterium*, estes são classificados como aeróbios, Gram-negativos, solubilizadores de fosfato e são associadas com uma rizosfera saudável (JOSHI *et al.*, 2021) são encontrados em solos de florestas e sedimentos, podem apresentarem a característica de degradar celulose (DAHALL *et al.*, 2020; KIM; YU, 2020) e hidrolisar uréia (DAHALL; KIM, 2018).

O gênero *Candidatus Udaeobacter*, pertencente ao filo Verrucomicrobia, é amplamente difundido em diversos tipos de solo, incluindo solos florestais, podem

mostrar preferências por solos com pH ácido (WILLMS *et al.*, 2021) e são descritos por alguns estudos como potencial gênero de resistência a múltiplos tipos de antibióticos, pois possuem genes de resistência e podem inclusive se beneficiar da liberação de antibióticos, além disso podem persistir a longo prazo no solo o que é explicado pela provável oxidação de H₂ para obtenção de energia (WILLMS *et al.*, 2020, 2021).

E o gênero *Candidatus Solibacter*, pertencente ao filo Actinobacteria, foi descrito também em habitats de solos florestais (WANG, Han *et al.*, 2018; GUI *et al.*, 2017; BAI *et al.*, 2015) que podem estar envolvidos no ciclo do carbono, pois possuem enzimas que degradam o carbono orgânico (GUI *et al.*, 2017), e apresentam correlações positivas com o metabolismo do enxofre (WANG *et al.*, 2018).

Os resultados dos gêneros bioindicadores foram interessantes, pois, apesar da composição taxonômica das comunidades observadas na área de referência e em recuperação terem sido semelhantes, observamos que os gêneros bioindicadores foram bem definidos em ambas as áreas. Na área em reabilitação, os microrganismos encontrados são relatados em solos contaminados com metais pesados, alguns estão relacionados a degradação de hidrocarbonetos e compostos aromáticos e outros são descritos como bioindicadores das limitações nutricionais da comunidade microbiana no solo. A presença desses grupos na área em reabilitação pode indicar comunidades remanescentes que realizam a função de biodegradação de poluentes que ainda podem estar no solo, principalmente quando levamos em consideração o alagamento da área na estação chuvosa que pode ter causado a sedimentação dos rejeitos ainda presentes no Rio Paraopeba e na estação de tratamento do Ribeirão Ferro-Carvão. Enquanto que na área referência os principais gêneros encontrados estão diretamente relacionados com os ciclos biogeoquímicos, crescimento de plantas e degradação de matéria orgânica, sendo relatados na literatura em solos florestais.

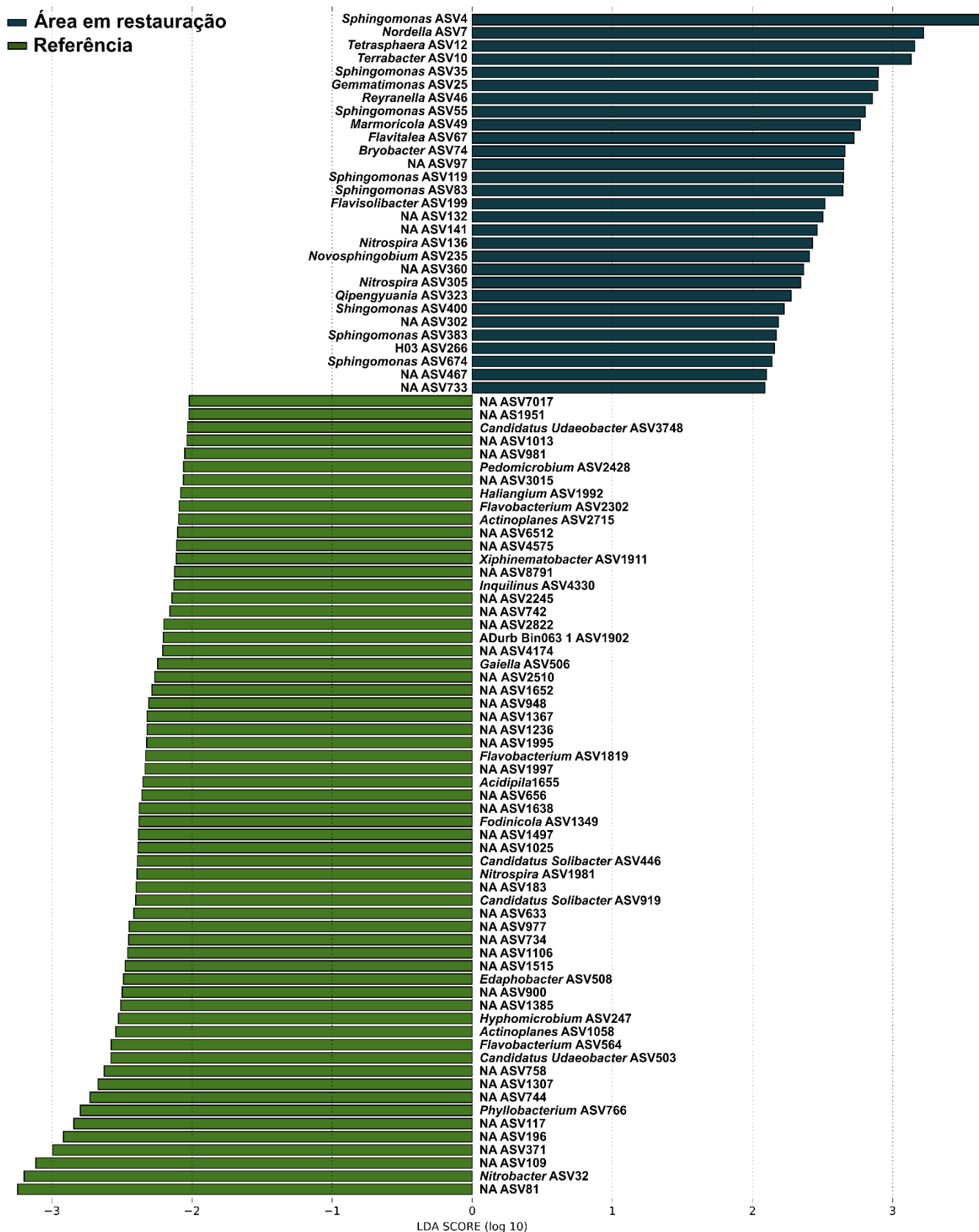


Figura 12. Análise LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*), utilizada para definir bioindicadores das áreas estudadas em nível de ASV (*Amplicon Sequence Variant*). A área em reabilitação representada em azul e a área referência representada em verde.

3.2. Predição funcional

A análise de predição funcional foi realizada utilizando o banco de dados FAPROTAX, para prever funções potenciais da comunidade microbiana presente nas áreas de estudo relacionadas aos ciclos biogeoquímicos do solo. Esse banco de dados mapeia táxons procarióticos para funções putativas usando informações baseadas em anotações funcionais de microrganismos cultivados (LOUCA *et.al.*, 2016).

A análise da função preditiva mostrou que as vias metabólicas envolvendo o metabolismo do nitrogênio foram afetadas significativamente pelo processo de reabilitação na estação seca, coleta 1 (Figura 13), a maioria das funções relacionadas ao ciclo do N foram maiores na área de referência, contudo, algumas funções como nitrificação, oxidação aeróbica de amônia, ureólise e fixação de N foram maiores nos transectos 1 e 2 da área em reabilitação. Já na estação chuvosa, coleta 2 (Figura 14), observou-se que houve um aumento do número de funções relacionadas ao ciclo do N nas áreas em reabilitação, principalmente no transecto 5, incluindo as funções relacionadas a desnitrificação.

Na área em reabilitação houve uma maior proporção de sequências filiadas a funções relacionadas a conversões de carbono como quimioheterotrofia, quimioheterotrofia aeróbica, quando comparado à área de referência, e a presença de funções relacionadas a degradação de hidrocarbonetos, degradação de hidrocarbonetos alifáticos, degradação de compostos aromáticos e degradação de hidrocarbonetos aromáticos, que não foram encontradas na área referência no período chuvoso. A quimioheterotrofia é o processo dominante relacionado à utilização de carbono nos solos (ZHANG, Xiaolin *et al.*, 2021). As funções relacionadas a quimioheterotrofia, quimioheterotrofia aeróbica como as mais abundantes para os microrganismos presentes em solos agrícolas e florestais (SANSUPA *et al.*, 2021).

Já as funções relacionadas a degradação de compostos inorgânicos podem ser correlacionadas à presença de microrganismos do gênero *Sphingomonas*, encontrada neste estudo como bioindicador da área em processo de reabilitação. Esse grupo são relatados em solos contaminados com minério, são heterotróficos

aeróbicos e neutrofílicos, mas algumas espécies foram relatadas em ambiente extremamente ácido e rico em metais como a *Sphingomonas echinoides*, podendo participarem dos processos de redução de Fe (III) (GAO *et al.*, 2019; WHITE; SUTTON; RINGELBERG, 1996). O gênero *Sphingomonas* também foi relatado em estudo em solos matriz com rejeito de ferro como gênero dominante de bactérias fixadoras de N, por ter atividade relativas a nitrogenase, e assim são ilustradas como promovedoras do crescimento de plantas e a absorção de nutrientes (CHEN, Xiaolin *et al.*, 2022).

Em relação às funções relacionadas ao ciclo do enxofre, a área em reabilitação apresentou mais sequências filiadas a função de degradação de compostos sulfúricos na estação seca (coleta 1) (Figura 13) em relação a área referência, já a oxidação fotoautotrófica anoxigênica do enxofre se apresentou maior na área de referência. Na estação chuvosa (coleta 2), a oxidação de compostos sulfúricos se apresentou maior na área de referência e a oxidação fotoautotrófica anoxigênica do enxofre se apresentou maior na área em reabilitação (Figura 14). Talvez isso se deva ao fato de que, no período da segunda coleta, estação chuvosa, houve um grande volume de chuva na área que resultou no alagamento e deposição de sedimento aluvionado na área restaurada, o que provavelmente alterou ou intensificou algumas funções desempenhadas pela comunidade microbiana para sanar as perturbações ocorridas na área afetada. O processo de oxidação fotoautotrófica anoxigênica do enxofre está envolvido na porção oxidativa do ciclo do enxofre responsável por disponibilizar sulfato assimilável para as plantas (DUTRA *et al.*, 2017).

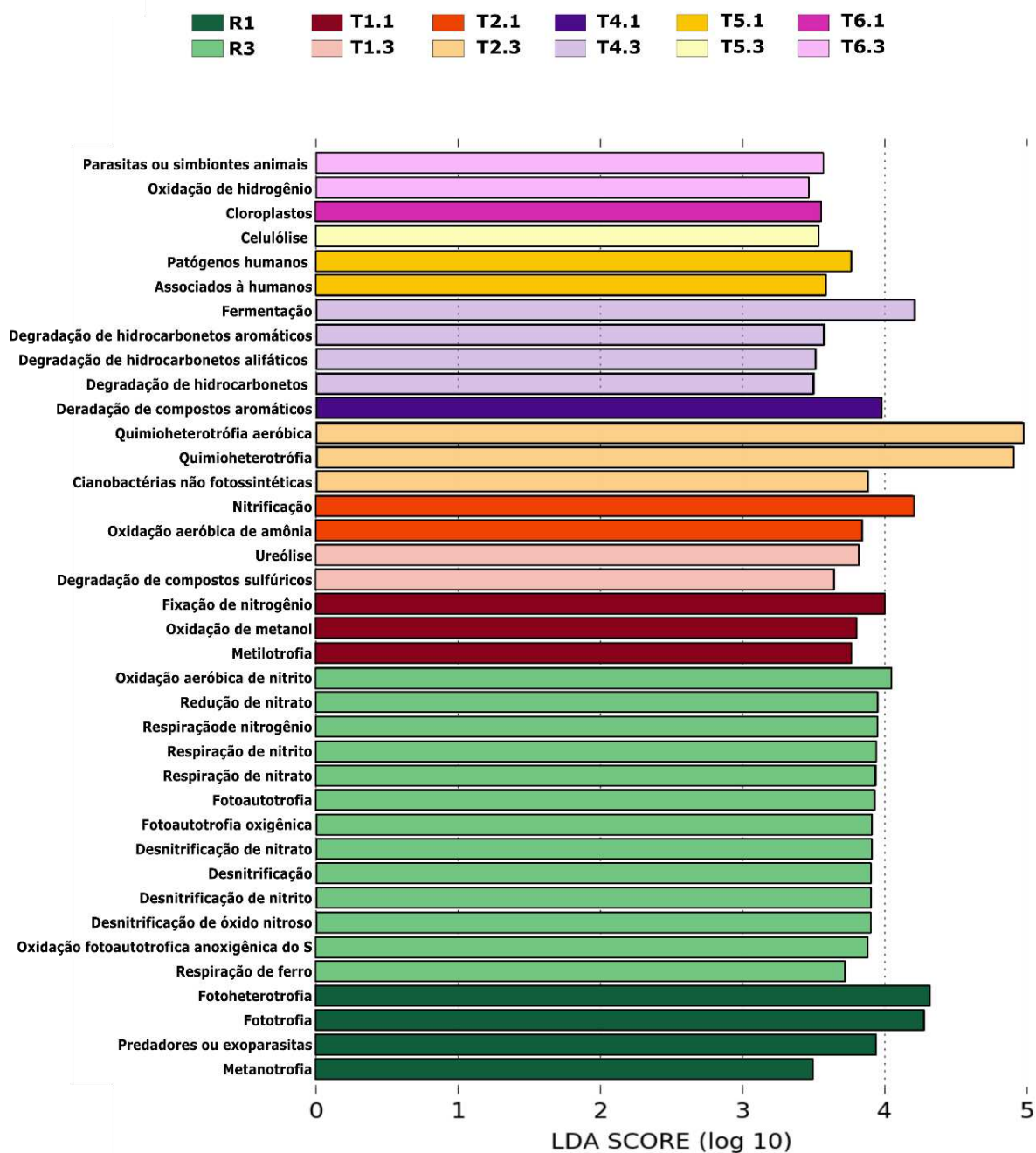


Figura 13. Análise LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*), utilizada para definir funções estatisticamente significativas para as áreas estudadas na estação seca (coleta 1). Lê-se as barras de baixo para cima. Tons de verde representam as referências, os tons de vermelho, laranja, roxo amarelo e rosa representam os transectos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Tons escuros representam os pontos 1 e tons claros os pontos 3.

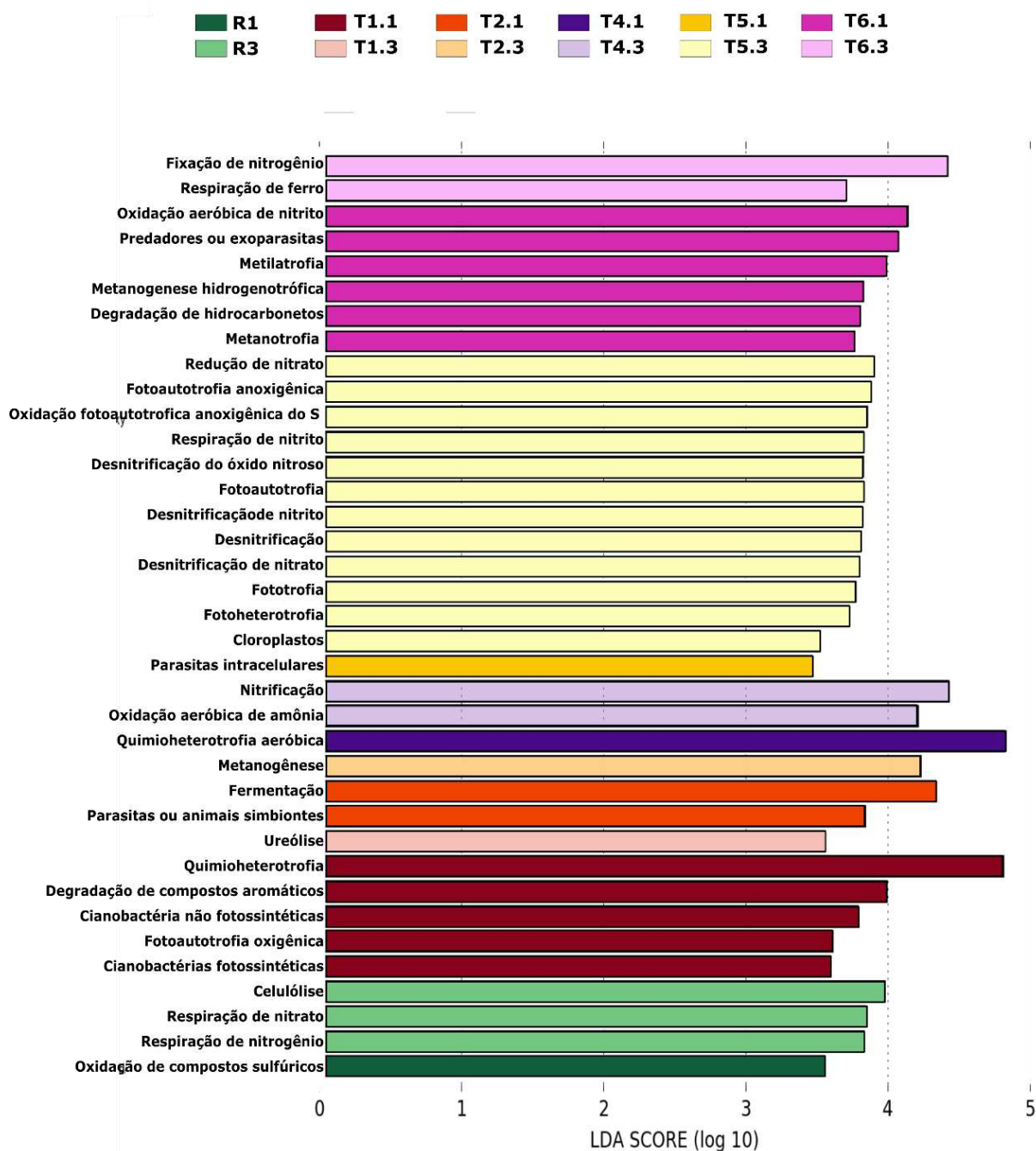


Figura 14. Análise LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*), utilizada para definir funções estatisticamente significativas para as áreas estudadas na estação chuvosa (coleta 2). Lê-se as barras de baixo para cima. Tons de verde representam as referências, os tons de vermelho, laranja, roxo amarelo e rosa representam os transectos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Tons escuros representam os pontos 1 e tons claros os pontos 3.

3.3. Quantificação de genes taxonômicos e funcionais

O PCR quantitativo (qPCR) foi utilizado para quantificar a comunidades bacteriana total através do gene rRNA 16S, e relacionadas ao ciclo do nitrogênio, permitindo quantificar as populações de bactérias desnitrificantes e nitrificantes por meio dos genes funcionais *narG* e *amoA*, respectivamente, na área em reabilitação e na área de Referência. No geral, foi observado que a abundância de bactérias totais não apresentou diferença ($p < 0,05$) entre as áreas em reabilitação e a referência (Figura 15).

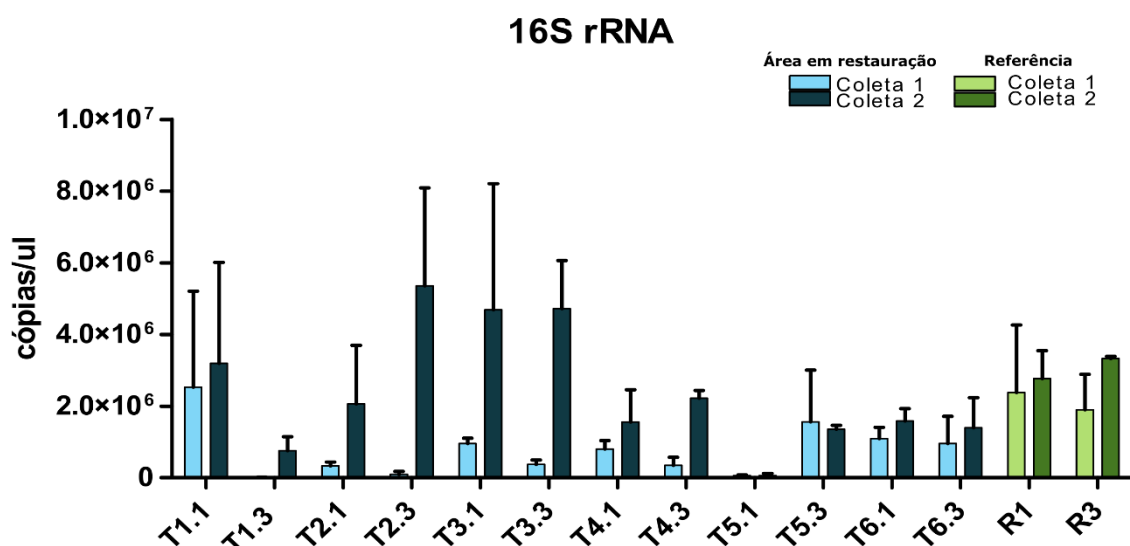


Figura 15. Quantificação do gene taxonômico RNAr 16S para as diferentes áreas estudadas – em azul, os Transectos (T) da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, em verde, a áreas de referência (R), em dois pontos: 1 - perto ao ribeirão e 3 - floresta à dentro. Cores claras apresentam a coleta 1, estação seca e cores escuras apresentam a coleta 2, estação chuvosa.

A quantificação da comunidade de bactérias nitrificantes que potencialmente participam do ciclo do nitrogênio através do gene *amoA* apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as áreas em reabilitação e referência, o potencial das comunidades que realizam a nitrificação foi maior na área em reabilitação na estação seca, menor na estação chuvosa (Figura 16). Já a quantificação da comunidade de

bactérias potencialmente desnitrificantes foi analisada através do gene *narG*, que apresentou diferença ($p > 0,05$) entre a área em reabilitação e a área de referência, apresentando valores menores na estação seca e maiores na estação chuvosa para a área em reabilitação (Figura 17) (Tabela S2), indicando que a área pode possuir uma comunidade que potencialmente pode realizar o processo de desnitrificação, e por serem em sua maioria anaeróbicos é esperado que as chuvas possam ter aumentado essa comunidade, por aumentarem o nível de humidade e anaerobiose no solo.

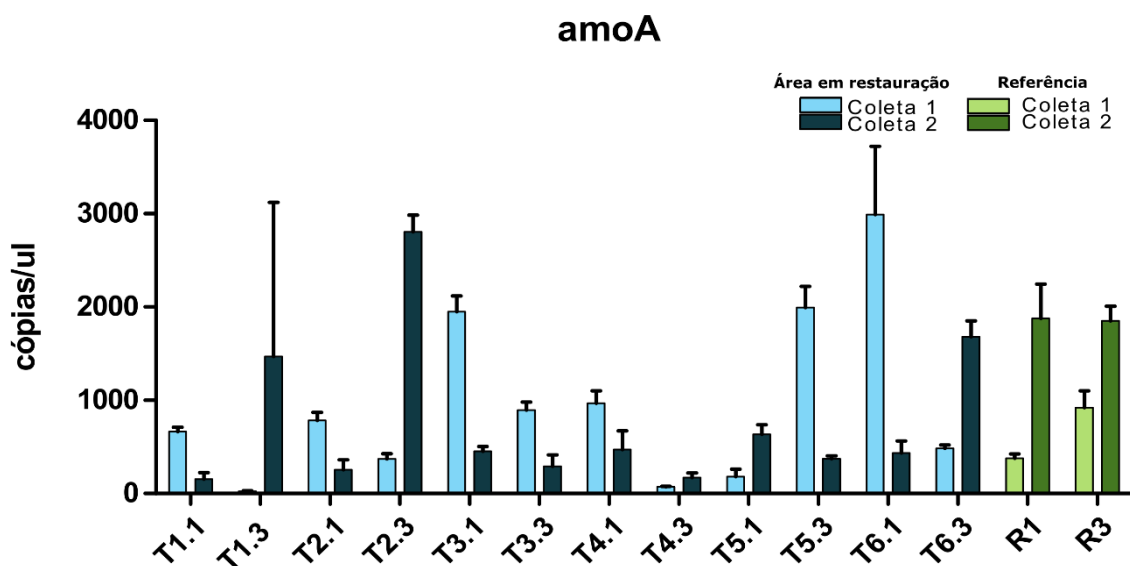


Figura 16. Quantificação do gene funcional *amoA* para as diferentes áreas estudadas – em azul, os Transectos (T) da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, em verde, a áreas de referência (R), em dois pontos: 1 - perto ao ribeirão e 3 - floresta à dentro. Cores claras apresentam a coleta 1, estação seca e cores escuras apresentam a coleta 2, estação chuvosa.

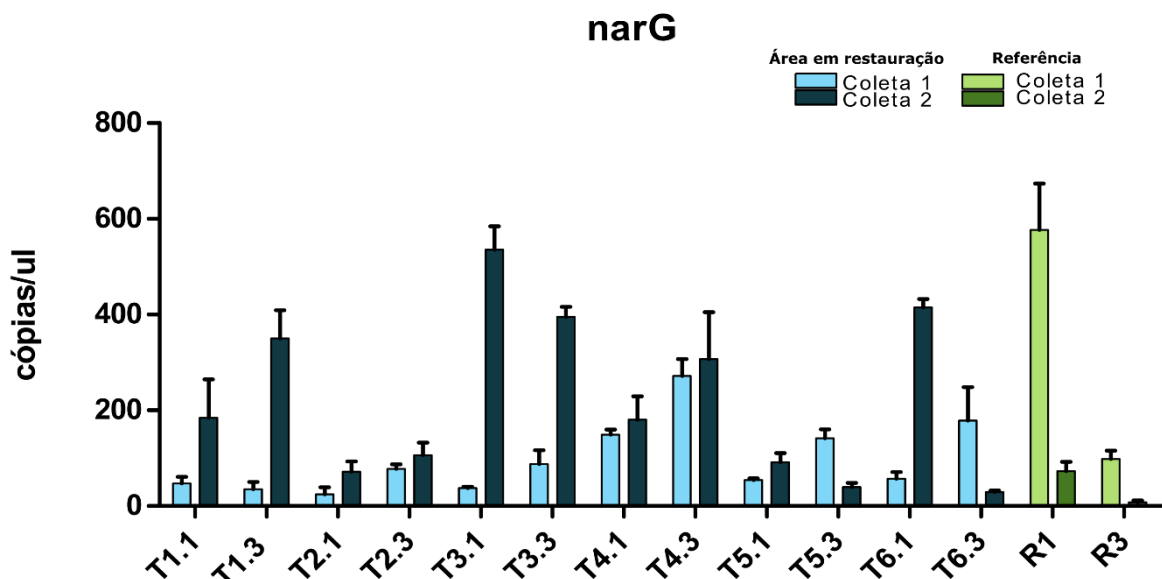


Figura 17. Quantificação do gene funcional *narG* para as diferentes áreas estudadas – em azul, os Transectos (T) da área em reabilitação (Marco Zero), em dois pontos: 1 mais perto ao ribeirão e 3 mais perto à floresta, em verde, a áreas de referência (R), em dois pontos: 1 - perto ao ribeirão e 3 - floresta à dentro. Cores claras apresentam a coleta 1, estação seca e cores escuras apresentam a coleta 2, estação chuvosa.

Estimar a abundância das comunidades funcionais do solo pela análise do potencial funcional do gene é importante para entender os papéis específicos dessas comunidades microbianas em processos biogeoquímicos (BAHRAM *et al.*, 2018) como o ciclo do nitrogênio, por exemplo. O processo de nitrificação mediado pelos microrganismos nitrificantes é responsável por regular a disponibilidade de N no solo, tanto para os demais organismos quanto para a liberação de N atmosférico, o gênero *Nitrospira* encontrada como um bioindicador da área em recuperação participa ativamente do ciclo do nitrogênio como uma bactéria nitrificante.

Já o processo de desnitrificação tem grande importância nas perdas de N principalmente pela emissão de óxido nitroso (N_2O), os gêneros *Tetrasphaera* e *Reyranella* também foram encontradas como bioindicadores da área em recuperação, sendo descritas como organismos desnitrificantes, porém *Tetrasphaera* pode atuar tanto na remoção de P do solo quanto na remoção de N total do solo para atmosfera.

Apesar da técnica de PCR quantitativo fornecer uma análise rápida e robusta da estrutura das comunidades microbianas pertencentes ao solo, algumas limitações

importantes devem ser pontuadas: as abundâncias estimadas dos diferentes grupos microbianos podem não ser iguais às verdadeiras porcentagens desses grupos nas amostras de solo, isso pode ocorrer devido a vários fatores, pode haver heterogeneidade de operons ribossômicos, que pode causar a amplificação de genes rRNA pertencentes a membros de um mesmo grupo alvo, e podem ocorrer viés de extração de DNA podendo favorecer alguns grupos específicos de bactérias (FIERER *et al.*, 2005).

4. CONCLUSÕES

De forma geral, a área em reabilitação se mostrou estatisticamente diferente da área referência em relação a análise de PCoA, quanto aos índices de diversidade, a área em reabilitação apresentou diferenças apenas na estação seca, indicando que o tempo de recuperação pode estar aproximando as áreas restauradas da referência, ou que as fortes chuvas que assolaram a região no início do período chuvoso homogeneizou a área estudada pela deposição de sedimento aluvionado.

Ao comparar somente os pontos da área em reabilitação, os índices de diversidade e a análise de PCoA revelaram que os pontos PT1 (perto da calha do ribeirão) e PT3 (pontos próximos à floresta) divergiram entre si no período de seca. PT1 apresentou menores índices de diversidade em relação à PT3, o que era esperado por essas áreas terem sofrido maior interferência dos processos de reabilitação. Já no período chuvoso, essa diferença diminuiu e os dados foram apresentados de forma mais homogênea, indicando a umidade como um potencial fator para as alterações das comunidades microbianas na própria área de reabilitação.

A presença de gêneros bioindicadores para área em processo de reabilitação, como, *Sphingomonas*, *Gemmatimonas*, *Terrabacter* e *Reyranella*, podem indicar a presença de comunidades remanescentes que realizam a função de biodegradação de poluentes que ainda podem estar no solo, pois, esses indicadores foram relacionados a solos mais impactados e/ou estressados, mostrando que estes microrganismos apesar de envolvidos com a ciclagem de nutrientes são mais relacionados com a remoção de poluentes e metais pesados. Enquanto que, os bioindicadores das amostras de referências se mostraram envolvidos com a ciclagem de nutrientes de ambientes mais equilibrados, como os florestais.

As estruturas da comunidade microbiana observadas pelo gene rRNA 16S e AmoA e NarG não apresentam um padrão claro de diferenciação entre as áreas em reabilitação e as referências, contudo, demonstram que as funções de nitrificação e desnitrificação ocorrem em ambas as áreas, sendo um indicativo da funcionalidade do ciclo do N nestes ambientes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As áreas em reabilitação do Ribeirão Ferro-Carvão afetadas com o rejeito de mineração apresentaram algumas semelhanças com as áreas referências, contudo, ainda é possível observar que a área ainda está em processo de estabilização das atividades microbiológicas, isto é um indicativo que o monitoramento da área é de extrema importância para estabelecer o sucesso do programa piloto de reabilitação, para que ela exiba uma comunidade cada vez mais semelhante a uma comunidade microbiana florestal, afim de, restaurar os serviços ecossistêmicos da área de forma efetiva.

A caracterização da comunidade microbiana da área afetada em seu estágio inicial de reabilitação nos permitiu observar a importância dos microrganismos no solo para o sucesso do projeto piloto Marco-Zero, e nos permitiu também avaliar possíveis indicadores que possam ser aplicados a novas áreas de monitoramento, bem como o acompanhamento dos ciclos biogeoquímicos que regulam as transformações e fluxos de elementos tanto no solo quanto na biosfera. Otimizando assim, os programas de monitoramentos futuros das demais áreas afetadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e FAPEMIG pelo suporte financeiro no desenvolvimento dessa pesquisa e a bolsa de estudos do primeiro autor desse trabalho. Agradecemos também, a Vale pelo apoio e suporte técnico para a realização das amostragens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISLABIE, J.; DAVIDSON, A. D.; BOUL, H. L.; FRANZMANN, P. D.; JARDINE, D. R. Isolation of *Terrabacter* sp. strain DDE-1, which metabolizes 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene when induced with biphenyl. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, no. 12, p. 5607–5611, 1999.

<https://doi.org/10.1128/aem.65.12.5607-5611.1999>.

BAHRAM, M.; HILDEBRAND, F.; FORSLUND, S. K.; ANDERSON, J. L.; SOUDZILOVSKAIA, N. A.; BODEGOM, P. M.; BENGTSSON-PALME, J.; ANSLAN, S.; COELHO, L. P.; HAREND, H.; HUERTA-CEPAS, J.; MEDEMA, M. H.; MALTZ, M. R.; MUNDRA, S.; OLSSON, P. A.; PENT, M.; PÖLME, S.; SUNAGAWA, S.; RYBERG, M.; ... BORK, P. Structure and function of the global topsoil microbiome. **Nature**, vol. 560, no. 7717, p. 233–237, 2018. DOI 10.1038/s41586-018-0386-6.

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386-6>.

BAI, X.; SHI, R.; YOU, Y.; SHENG, H.; HAN, S.; ZHANG, Y. [Bacterial community structure and diversity in soils of different forest ages and types in Bao-tianman forest, Henan Province, China]. **Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology**, vol. 26, no. 8, p. 2273—2281, 2015.

<http://europepmc.org/abstract/MED/26685588>.

CALLAHAN, B.J, MCMURDIE, P.J, ROSEN, M.J, HAN, A.W, JOHNSON, A.J.A, HOLMES, S.P. “DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.” **Nature Methods**, 13, 581-583, 2016. <https://doi: 10.1038/nmeth>.

CHEN, S.; QI, G.; MA, G.; ZHAO, X. Biochar amendment controlled bacterial wilt through changing soil chemical properties and microbial community. **Microbiological Research**, vol. 231, no. July 2019, p. 126373, 2020. DOI

10.1016/j.micres.2019.126373. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126373>.

CHEN, X.; CHEN, H.; ZHAO, J.; XIN, Y.; LI, Y. Bacterial community structure and diversity in the rhizospheric soil of *Robinia pseudoacacia* and *Juniperus sabina* planted in iron tailings matrix. **Environmental Science and Pollution Research**, no. 2020, 2022a. DOI 10.1007/s11356-022-21669-x. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21669-x>.

COELHO, R. M. P.; VIEIRA, E. M.; PIO, F. P. B.; DE ALMEIDA, V. F.; SANTOS, R. E. Atlas das barragens de mineração em Minas Gerais. **Caderno de Geografia**, vol. 31, no. 1, p. 208–259, 2021. <https://doi.org/10.5752/p.2318-2962.2021v31nesp1p208>.

COOPER, J. E.; SCHERER, H. W. Chapter 16 - Nitrogen Fixation. *In*: MARSCHNER, P. (ed.). **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)**. Third Edit. San Diego: Academic Press, 2012. p. 389–408. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00016-9>.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849052000169>.

CRANE, S. L.; VAN DORST, J.; HOSE, G. C.; KING, C. K.; FERRARI, B. C. Microfluidic qPCR Enables High Throughput Quantification of Microbial Functional Genes but Requires Strict Curation of Primers. **Frontiers in Environmental Science**, vol. 6, 2018. DOI 10.3389/fenvs.2018.00145.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2018.00145>.

DAHAL, R. H.; CHAUDHARY, D. K.; KIM, J.; KIM, D. Draft genome sequence of *Flavobacterium silvisoli* RD-2-33 isolated from forest soil. vol. 56, no. 1, p. 86–88, 2020.

DAHAL, R. H.; KIM, J. *Flavobacterium ureilyticum* sp. nov., a novel urea hydrolysing bacterium isolated from stream bank soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 111, no. 11, p. 2131–2139, 2018. DOI 10.1007/s10482-018-1105-x.
<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1105-x>.

DALY, A. J.; BAETENS, J. M.; DE BAETS, B. Ecological Diversity: Measuring the Unmeasurable. **Mathematics**, vol. 6, no. 7, 2018. DOI 10.3390/math6070119.
<https://www.mdpi.com/2227-7390/6/7/119>.

DASGUPTA, D.; KUMAR, K.; MIGLANI, R.; MISHRA, R.; PANDA, A. K.; BISHT, S. S. Chapter 1 - Microbial biofertilizers: Recent trends and future outlook. *In*: DE MANDAL, S.; PASSARI, A. K. (eds.). **Recent Advancement in Microbial Biotechnology**. [S. l.]: Academic Press, 2021. p. 1–26. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822098-6.00001-X>.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012822098600001X>.

DUTRA, A.; OLIVEIRA, N. De; QUÍMICO, E.; PH, D. Posterior Utilização Em Estudos De Lixiviação De Minério Isolation of Sulphur Oxidizing Bacteria for Further Using To Study the Leaching of Gold Ore. , p. 1–5, 2017. .

FERRENTINO, R.; LANGONE, M.; GANDOLFI, I.; BERTOLINI, V.; FRANZETTI, A.; ANDREOTTOLA, G. Shift in microbial community structure of anaerobic side-stream reactor in response to changes to anaerobic solid retention time and sludge interchange ratio. **Bioresource Technology**, vol. 221, p. 588–597, 2016. DOI 10.1016/j.biortech.2016.09.077. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.077>.

FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R. B. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 71, no. 7, p. 4117–4120, 2005. DOI 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005.

<https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>.

FRIGON, D.; WELLS, G. Microbial immigration in wastewater treatment systems: analytical considerations and process implications. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 57, p. 151–159, 2019. DOI 10.1016/j.copbio.2019.02.021. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.021>.

GAO, P.; SUN, X.; XIAO, E.; XU, Z.; LI, B.; SUN, W. Characterization of iron-metabolizing communities in soils contaminated by acid mine drainage from an abandoned coal mine in Southwest China. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 26, no. 10, p. 9585–9598, 2019. DOI 10.1007/s11356-019-04336-6. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04336-6>.

GUI, H.; PURAHONG, W.; HYDE, K. D.; XU, J.; MORTIMER, P. E. The arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* alters bacterial communities in subtropical forest soils during litter decomposition. **Frontiers in Microbiology**, vol. 8, no. JUN, p. 1–11, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01120>.

HABE, H.; CHUNG, J. S.; ISHIDA, A.; KASUGA, K.; IDE, K.; TAKEMURA, T.; NOJIRI, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. The fluorene catabolic linear plasmid in *Terrabacter* sp. strain DBF63 carries the β -keto adipate pathway genes, *pcaRHGBDCFIJ*, also found in proteobacteria. **Microbiology**, vol. 151, no. 11, p.

3713–3722, 2005. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28215-0>.

HABE, H.; IDE, K.; YOTSUMOTO, M.; TSUJI, H.; YOSHIDA, T.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Degradation characteristics of a dibenzofuran-degrader *Terrabacter* sp. strain DBF63 toward chlorinated dioxins in soil. **Chemosphere**, vol. 48, no. 2, p. 201–207, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00064-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00064-4).

HE, Z.; LIU, D.; SHI, Y.; WU, X.; DAI, Y.; SHANG, Y.; PENG, J.; CUI, Z. Broader environmental adaptation of rare rather than abundant bacteria in reforestation succession soil. **Science of The Total Environment**, vol. 828, p. 154364, 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154364>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969722014577>.

HONG, C.; SI, Y.; XING, Y.; LI, Y. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 10788–10799, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4186-3>.

IKBAL; PASSRICHA, N.; SAIFI, S. K.; SIKKA, V. K.; TUTEJA, N. Chapter 3 - Multilegume biofertilizer: a dream. *In*: SHARMA, V.; SALWAN, R.; AL-ANI, L. K. T. (eds.). **Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture**. [S. l.]: Academic Press, 2020. p. 35–45. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00003-1>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128184691000031>.

JIAO, S.; CHEN, W.; WEI, G. Core microbiota drive functional stability of soil microbiome in reforestation ecosystems. **Global Change Biology**, vol. 28, no. 3, p. 1038–1047, 2022. DOI <https://doi.org/10.1111/gcb.16024>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gcb.16024>.

JOSHI, S.; JAGGI, V.; GANGOLA, S.; SINGH, A.; SAH, V. K.; SAHGAL, M. Contrasting rhizosphere bacterial communities of healthy and wilted *Dalbergia sissoo* Roxb. forests. *Rhizosphere*, vol. 17, p. 100295, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100295>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S245221982030207X>.

KIM, H.; YU, S. M. *Flavobacterium nackdongense* sp. nov., a cellulose-degrading

bacterium isolated from sediment. **Archives of Microbiology**, vol. 202, no. 3, p. 591–595, 2020. DOI 10.1007/s00203-019-01770-5. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01770-5>.

KOSSOFF, D.; DUBBIN, W. E.; ALFREDSSON, M.; EDWARDS, S. J.; MACKLIN, M. G.; HUDSON-EDWARDS, K. A. Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. **Applied Geochemistry**, vol. 51, p. 229–245, 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.09.010>. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883292714002212>.

LAF, A.; FLORIO, A.; ANDRIANARISOA, K. S.; CREUZE, C.; SCHLOTER-HAI, B.; NDAW, S. M.; PERIOT, C.; SCHLOTER, M.; ZELLER, B. Biological inhibition of soil nitrification by forest tree species affects Nitrobacter populations. vol. 22, p. 1141–1153, 2020. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14905>.

LARSBRINK, J.; MCKEE, L. S. Chapter Two - Bacteroidetes bacteria in the soil: Glycan acquisition, enzyme secretion, and gliding motility. *In*: GADD, G. M.; SARIASLANI, S. (eds.). **Advances in Applied Microbiology**. [S. l.]: Academic Press, 2020. vol. 110, p. 63–98. DOI <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.11.001>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065216419300498>.

LI, F.; CHEN, L.; ZHANG, J.; YIN, J.; HUANG, S. Bacterial Community Structure after Long-term Organic and Inorganic Fertilization Reveals Important Associations between Soil Nutrients and Specific Taxa Involved in Nutrient Transformations. **Front. Microbiol.** vol. 8, no. February, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00187>.

LI, J.; YANG, L.; FAN, M.; SHANGGUAN, Z. Plantation vegetation restoration enhances the relationship between rhizosphere microbial diversity and soil multifunctionality. **Land Degradation & Development**, 2022. DOI <https://doi.org/10.1002/ldr.4414>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ldr.4414>.

LI, M.; CHENG, X.; GUO, H.; YANG, Z. Biomineralization of Carbonate by *Terrabacter Tumescens* for Heavy Metal Removal and Biogrouting Applications. **Journal of Environmental Engineering**, vol. 142, no. 9, 2016.

[https://doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0000970](https://doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0000970).

LI, X.; HOU, L.; LIU, M.; ZHENG, Y.; LI, Y.; LIN, X. Abundance and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation bacteria in urban roadside soils in Shanghai. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 99, no. 8, p. 3639–3649, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6299-x>.

LI, Y.; JIA, Z.; SUN, Q.; ZHAN, J.; YANG, Y.; WANG, D. Ecological restoration alters microbial communities in mine tailings profiles. **Scientific Reports**, vol. 6, no. 1, p. 25193, 2016. DOI 10.1038/srep25193. <https://doi.org/10.1038/srep25193>.

LIMA, H. S.; CAVALCANTE, J. P. C. M.; SILVA, L. C. F.; DA SILVA, M. de C. S.; DE PAULA, S. O.; KASUYA, M. C. M.; DA SILVA, C. C. Structure and putative function of a soil microbial community impacted by the deposition of tailings and subsequent revegetation after the rupture of the Fundao Dam. **Land Degradation & Development**, vol. 33, no. 8, p. 1235–1248, 2022. DOI <https://doi.org/10.1002/ldr.4215>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ldr.4215>.

LIN, J.; HE, F.; SU, B.; SUN, M.; OWENS, G.; CHEN, Z. The stabilizing mechanism of cadmium in contaminated soil using green synthesized iron oxide nanoparticles under long-term incubation. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 379, no. April, p. 120832, 2019. DOI 10.1016/j.jhazmat.2019.120832. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120832>.

LIU, S.; COYNE, M. S.; GROVE, J. H.; FLYTHE, M. D. Nitrite oxidizing bacteria , Nitrobacter and Nitrospira , are differently influenced by season , fertilizer , and tillage in long-term maize culture. **Applied Soil Ecology**, vol. 177, no. March, p. 104530, 2022. DOI 10.1016/j.apsoil.2022.104530. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104530>.

LOUCA, S., PARFREY, L.W., DOEBELI, M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. **Science**. 353:1272-1277, 2016. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaf4507>.

LU, H.; WU, Y.; LIANG, P.; SONG, Q.; ZHANG, H.; WU, J.; WU, W.; LIU, X.; DONG, C. Chemosphere Alkaline amendments improve the health of soils degraded by

metal contamination and acidification : Crop performance and soil bacterial community responses. **Chemosphere**, vol. 257, no. 1, p. 127309, 2020. DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.127309. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127309>.

MA, S.; QIAO, L.; LIU, X.; ZHANG, S.; ZHANG, L.; QIU, Z.; YU, C. Microbial community succession in soils under long-term heavy metal stress from community diversity-structure to KEGG function pathways. **Environmental Research**, vol. 214, no. P2, p. 113822, 2022. DOI 10.1016/j.envres.2022.113822. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113822>.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**, Wiley-Blackwell, p.264, 2004. ISBN: 978-1-118-68792-5

MAGURRAN, A. E. Why diversity? **Ecological Diversity and Its Measurement**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1988. p. 1–5. DOI 10.1007/978-94-015-7358-0_1. https://doi.org/10.1007/978-94-015-7358-0_1.

MARQUES, R.; SANTOS, J.; NGUYEN, H.; CARVALHO, G.; NORONHA, J. P.; NIELSEN, P. H.; REIS, M. A. M.; OEHMEN, A. Metabolism and ecological niche of Tetrasphaera and Ca. Accumulibacter in enhanced biological phosphorus removal. **Water Research**, vol. 122, p. 159–171, 2017. DOI 10.1016/j.watres.2017.04.072. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.072>.

MEHRANI, M.; SOBOTKA, D.; KOWAL, P.; CIESIELSKI, S. Bioresource Technology The occurrence and role of Nitrospira in nitrogen removal systems. vol. 303, no. January, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122936>.

MINITAB, L. Minitab. 2021. <https://www.minitab.com>.

MONTERO-BARRIENTOS, M.; RIVAS, R.; VELÁQUEZ, E.; MONTE, E.; ROIG, M. G. Terrabacter terrae sp. nov., a novel actinomycete isolated from in Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, vol. 55, no. 6, p. 2491–2495, 2005. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63768-0>.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain

reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, vol. 59, no. 3, p. 695–700, Mar. 1993.

<https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>.

PALATSI, J.; RIPOLL, F.; BENZAL, A.; PIJUAN, M.; ROMERO-GÜIZA, M. S. Enhancement of biological nutrient removal process with advanced process control tools in full-scale wastewater treatment plant. **Water Research**, vol. 200, p. 117212, 2021. DOI 10.1016/j.watres.2021.117212.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117212>.

PARSANIA, S.; MOHAMMADI, P.; SOUDI, M. R.; GHARAVI, S. A metagenomic approach to the molecular analysis of bacterial communities in tailings of a gold mine. **bioRxiv**, , p. 2022.06.01.494447, 1 Jan. 2022. DOI

10.1101/2022.06.01.494447.

<http://biorxiv.org/content/early/2022/06/03/2022.06.01.494447.abstract>.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. <https://www.R-project.org/>.

RIVERA-RIVERA, M. J.; CUEVAS, E. First Insights into the Resilience of the Soil Microbiome of a Tropical Dry Forest in Puerto Rico. *In*: BLUMENBERG, M.; SHAABAN, M.; ELGAML, A. (eds.). **Microorganisms**. Rijeka: IntechOpen, 2020. DOI 10.5772/intechopen.90395. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90395>.

SANSUPA, C.; WAHDAN, S. F. M.; HOSSEN, S.; DISAYATHANOOWAT, T.; WUBET, T.; PURAHONG, W. Can We Use Functional Annotation of Prokaryotic Taxa (FAPROTAX) to Assign the Ecological Functions of Soil Bacteria? **Applied Sciences**, vol. 11, no. 2, 2021. DOI 10.3390/app11020688.

<https://www.mdpi.com/2076-3417/11/2/688>.

SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Segata-LEfSe-gb-2011. **Genome Biology**, vol. 12, p. R60, 2011. .

SHEN, D.; QIAN, H.; LIU, Y.; ZHAO, S.; LUO, X. Nitrifier community assembly and species co-existence in forest and meadow soils across four sites in a temperate to

tropical region. **Applied Soil Ecology**, vol. 171, no. December 2021, p. 104342, 2022. DOI 10.1016/j.apsoil.2021.104342.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104342>.

SHI, P.; ZHANG, Y.; HU, Z.; MA, K.; WANG, H.; CHAI, T. The response of soil bacterial communities to mining subsidence in the west China aeolian sand area.

Applied Soil Ecology, vol. 121, no. September, p. 1–10, 2017. DOI

10.1016/j.apsoil.2017.09.020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.020>.

SILVA R., L. H.; ALCÂNTARA, E.; PARK, E.; NEGRI, R. G.; LIN, Y. N.; BERNARDO, N.; MENDES, T. S. G.; SOUZA FILHO, C. R. The 2019 Brumadinho tailings dam collapse: Possible cause and impacts of the worst human and environmental disaster in Brazil. **International Journal of Applied Earth Observation and**

Geoinformation, vol. 90, p. 102119, 2020. DOI

<https://doi.org/10.1016/j.jag.2020.102119>.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303243420300192>.

SONG, W.; WANG, J.; YAN, Y.; AN, L.; ZHANG, F.; WANG, L.; XU, Y.; TIAN, M.; NIE, Y.; WU, X. International Biodeterioration & Biodegradation Shifts of the indigenous microbial communities from reservoir production water in crude oil- and asphaltene-degrading microcosms. **International Biodeterioration and**

Biodegradation, vol. 132, no. December 2017, p. 18–29, 2018. DOI

10.1016/j.ibiod.2018.04.015. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.015>.

SUN, X.; ZHOU, Y.; TAN, Y.; WU, Z.; LU, P.; ZHANG, G.; YU, F. Restoration with pioneer plants changes soil properties and remodels the diversity and structure of bacterial communities in rhizosphere and bulk soil of copper mine tailings in Jiangxi Province, China. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 25, no. 22, p. 22106–22119, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2244-3>.

TANG, S.; ZHENG, C.; CHEN, M.; DU, W.; XU, X. Geobiochemistry characteristics of rare earth elements in soil and ground water : a case study in Baotou , China.

Scientific Reports, , p. 1–12, 2020. DOI 10.1038/s41598-020-68661-4.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68661-4>.

TAPPE, W.; HOFMANN, D.; DISKO, U.; KOEPPCHEN, S.; KUMMER, S.;

VERECKEN, H. A novel isolated Terrabacter-like bacterium can mineralize 2-aminopyrimidine, the principal metabolite of microbial sulfadiazine degradation. **Biodegradation**, vol. 26, no. 2, p. 139–150, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10532-015-9722-9>.

THOMPSON, F.; DE OLIVEIRA, B. C.; CORDEIRO, M. C.; MASI, B. P.; RANGEL, T. P.; PAZ, P.; FREITAS, T.; LOPES, G.; SILVA, B. S.; S. CABRAL, A.; SOARES, M.; LACERDA, D.; DOS SANTOS VERGILIO, C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; THOMPSON, C.; DE REZENDE, C. E. Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of The Total Environment**, vol. 705, p. 135914, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135914>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719359091>.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de anastrepha (Diptera: Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, vol. 34, no. 1, p. 33–39, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100005>.

VALE. Relatório de Sustentabilidade 2019 - Mediacapital. **Media Capital**, 2020. Available at: <https://www.mediacapital.pt/p/11260/relatório-de-sustentabilidade-2019/>.

WANG, H.; ZENG, Y.; GUO, C.; BAO, Y.; LU, G.; REINFELDER, J. R.; DANG, Z. Bacterial, archaeal, and fungal community responses to acid mine drainage-laden pollution in a rice paddy soil ecosystem. **Science of The Total Environment**, vol. 616–617, p. 107–116, 2018. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.224>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717329418>.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, vol. 173, no. 2, p. 697–703, Jan. 1991. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.

WHITE, D. C.; SUTTON, S. D.; RINGELBERG, D. B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 7, no. 3, p. 301–306, 1996. DOI [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80034-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80034-6). [6.https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166996800346](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166996800346).

WILLMS, I. M.; BOLZ, S. H.; YUAN, J.; KRAFFT, L.; SCHNEIDER, D.; SCHÖNING, I.; SCHRUMPF, M.; NACKE, H. The ubiquitous soil verrucomicrobial clade ‘Candidatus Udaeobacter’ shows preferences for acidic pH. **Environmental Microbiology Reports**, vol. 13, no. 6, p. 878–883, 2021. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13006>.

WILLMS, I. M.; RUDOLPH, A. Y.; GÖSCHEL, I.; BOLZ, S. H.; SCHNEIDER, D.; PENONE, C.; POEHLEIN, A.; SCHÖNING, I.; NACKE, H. Globally Abundant “Candidatus Udaeobacter” Benefits from Release of Antibiotics in Soil and Potentially Performs Trace Gas Scavenging. **mSphere**, vol. 5, no. 4, 2020. <https://doi.org/10.1128/msphere.00186-20>.

WU, B.; LUO, H.; WANG, X.; LIU, H.; PENG, H.; SHENG, M.; XU, F.; XU, H. Effects of environmental factors on soil bacterial community structure and diversity in different contaminated districts of Southwest China mine tailings. **Science of the Total Environment**, vol. 802, no. 24, p. 149899, 2022. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.149899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149899>.

WU, Z.; SUN, L.; LI, Y.; SUN, Q. Shifts in Vegetation-Associated Microbial Community in the Reclamation of Coal Mining Subsidence Land. **Environmental Engineering Science**. vol. 37, no. 12, p. 838–848, 2020. <https://doi.org/10.1089/ees.2019.0491>.

XAVIER, D. **Nota tecnica_Avaliacao dos impactos sobre a saude do desastre da mineracao da Vale-Brumadinho.pdf**. 2019.

XU, S.; WANG, B.; LI, Y.; JIANG, D.; ZHOU, Y.; DING, A.; ZONG, Y.; LING, X.; ZHANG, S.; LU, H. Ubiquity, diversity, and activity of comammox Nitrospira in agricultural soils. **Science of The Total Environment**, vol. 706, p. 135684, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135684>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719356797>.

YANG, F.; HUANG, M.; LI, C.; WU, X.; FANG, L. Vegetation restoration increases the diversity of bacterial communities in deep soils. **Applied Soil Ecology**, vol. 180, no. August, p. 104631, 2022. DOI 10.1016/j.apsoil.2022.104631. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104631>.

YAO, Y.; ZHANG, X.; HUANG, Z.; LI, H.; HUANG, J.; CORTI, G.; WU, Z. Science of the Total Environment A field study on the composition , structure , and function of endophytic bacterial community of Robinia pseudoacacia at a composite heavy metals tailing. **Science of the Total Environment**, vol. 850, no. April, p. 157874, 2022. DOI 10.1016/j.scitotenv.2022.157874.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157874>.

YU, Z.; YANG, J.; YU, X.; LIU, L.; TIAN, Y. Aboveground Vegetation Influences Belowground Microeukaryotic Community in a Mangrove Nature Reserve. **Wetlands**, vol. 34, no. 2, p. 393–401, 2014. DOI 10.1007/s13157-013-0506-x.

<https://doi.org/10.1007/s13157-013-0506-x>.

ZHANG, Hongchun; WANG, R.; CHEN, S.; QI, G.; HE, Z.; ZHAO, X. Microbial taxa and functional genes shift in degraded soil with bacterial wilt. **Nature Publishing Group**, no. November 2016, p. 1–11, 2017. DOI 10.1038/srep39911.

<http://dx.doi.org/10.1038/srep39911>.

ZHANG, Hui; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. accumulating micro-organism , the first cultured representative of the new bacterial phylum Printed in Great Britain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, p. 1155–1163, 2003.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02520-0>.

ZHANG, X.-M.; TANG, D.-X.; LI, Q.-Q.; WANG, Y.-B.; XU, Z.-H.; LI, W.-J.; YU, H. Complex microbial communities inhabiting natural Cordyceps militaris and the habitat soil and their predicted functions. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 114, no. 4, p. 465–477, 2021. DOI 10.1007/s10482-021-01534-6. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01534-6>.

ZHANG, X.; LI, X.; CHEN, X.; SUN, Y.; ZHAO, L.; HAN, T.; LI, T.; WENG, L.; LI, Y. A nitrogen supplement to regulate the degradation of petroleum hydrocarbons in soil microbial electrochemical remediation. **Chemical Engineering Journal**, vol. 426, p. 131202, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131202>.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894721027832>.

ZHANG, Y.; KINYUA, M. N. Identification and classification of the Tetrasphaera

genus in enhanced biological phosphorus removal process: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, vol. 19, no. 4, p. 699–715, 2020. DOI 10.1007/s11157-020-09549-7. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09549-7>.

ZHOU, H. W.; GUO, C. L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 262, no. 2, p. 148–157, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00379.x>.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; RIBEIRO XAVIER, G.; DA COSTA COUTINHO, H. L.; PRATA NEVES, M. C. DIVERSIDADE MICROBIANA COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO SOLO 1 A agricultura moderna é caracterizada pela busca constante do aumento da produtividade das culturas agrícolas por meio da utilização da mecanização , irrigação , adubação química e aplicação de. **Cadernos de Ciencia & Tecnología**, vol. 20, no. 3, p. 391–411, 2003.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Índices diversidade bacteriana Shannon e Simpson e de riqueza de cada área estudada, em diferentes coletas. Os valores são média \pm desvio padrão (n=3), médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

		Shannon		Simpson		Richness		
Coleta 1 (estação seca)	R	1	5,894 ^g	$\pm 0,405$	0,982 ^d	$\pm 0,01409$	777 ^c	± 137
		2	6,901 ^{ab}	$\pm 0,050$	0,998 ^a	$\pm 0,00002$	1665 ^{ab}	± 94
	T1	1	6,355 ^{ef}	$\pm 0,122$	0,990 ^{abc}	$\pm 0,00011$	1644 ^{abc}	± 275
		3	6,638 ^{abcde}	$\pm 0,018$	0,997 ^{ab}	$\pm 0,00002$	1598 ^{ab}	± 45
	T2	1	6,918 ^{ab}	$\pm 0,097$	0,997 ^{abc}	$\pm 0,00034$	2025 ^a	± 134
		3	6,929 ^a	$\pm 0,115$	0,998 ^a	$\pm 0,00016$	1709 ^{ab}	± 215
	T3	1	6,343 ^{def}	$\pm 0,174$	0,988 ^c	$\pm 0,00323$	1593 ^{ab}	± 126
		3	6,644 ^{abcde}	$\pm 0,017$	0,994 ^{acb}	$\pm 0,00094$	1836 ^{ab}	± 145
	T4	1	6,578 ^{abcde}	$\pm 0,030$	0,995 ^{abc}	$\pm 0,00030$	1708 ^{ab}	± 112
		3	6,470 ^{cde}	$\pm 0,163$	0,996 ^{abc}	$\pm 0,00040$	1614 ^{abc}	± 433
	T5	1	5,972 ^{fg}	$\pm 0,061$	0,988 ^{bc}	$\pm 0,00108$	1371 ^{abc}	± 97
		3	6,830 ^{abc}	$\pm 0,158$	0,997 ^{ab}	$\pm 0,00022$	1745 ^{ab}	± 319
T6	1	6,514 ^{bcde}	$\pm 0,096$	0,992 ^{abc}	$\pm 0,00261$	1741 ^{ab}	± 81	
	3	6,810 ^{abc}	$\pm 0,104$	0,997 ^{ab}	$\pm 0,00027$	1562 ^{ab}	± 261	
Coleta 2 (estação chuvosa)	R	1	6,808 ^{abc}	$\pm 0,067$	0,997 ^{abc}	$\pm 0,00040$	1676 ^{ab}	± 61
		2	6,636 ^{abcde}	$\pm 0,049$	0,997 ^{acb}	$\pm 0,00056$	1514 ^{abc}	± 75
	T1	1	6,837 ^{abc}	$\pm 0,326$	0,998 ^a	$\pm 0,00082$	1665 ^{ab}	± 624
		3	6,887 ^{ab}	$\pm 0,111$	0,998 ^a	$\pm 0,00029$	1805 ^{ab}	± 210
	T2	1	6,649 ^{abcde}	$\pm 0,186$	0,998 ^a	$\pm 0,00032$	1308 ^{bc}	± 249
		3	6,793 ^{abc}	$\pm 0,084$	0,998 ^a	$\pm 0,00004$	1627 ^{ab}	± 219
	T3	1	6,850 ^{abc}	$\pm 0,035$	0,998 ^a	$\pm 0,00039$	1667 ^{ab}	± 40
		3	6,821 ^{abc}	$\pm 0,023$	0,998 ^a	$\pm 0,00015$	1464 ^{abc}	± 25
	T4	1	6,847 ^{abc}	$\pm 0,041$	0,998 ^a	$\pm 0,00006$	1712 ^{ab}	± 93
		3	6,783 ^{abcd}	$\pm 0,014$	0,998 ^a	$\pm 0,00020$	1580 ^{ab}	± 36
	T5	1	6,857 ^{ab}	$\pm 0,037$	0,998 ^a	$\pm 0,00016$	1746 ^{ab}	± 92
		3	6,833 ^{abc}	$\pm 0,036$	0,998 ^a	$\pm 0,00010$	1701 ^{ab}	± 70
T6	1	6,878 ^{ab}	$\pm 0,062$	0,998 ^a	$\pm 0,00030$	1765 ^{ab}	± 123	
	3	6,299 ^{ef}	$\pm 0,064$	0,991 ^{abc}	$\pm 0,00072$	1367 ^{abc}	± 86	

Tabela Suplementar 2. Quantificações dos genes taxonômicos e funcionais de cada área estudada, em diferentes coletas. Os valores são média \pm desvio padrão (n=3), médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

		16S		amoA		narG		
Coleta 1 (estação seca)	R	1	2383077 ^{abc}	± 1880032	378 ^h	± 48	577 ^a	± 97
		2	1893956 ^{abc}	± 992142	923 ^{defgh}	± 180	99 ^{ghij}	± 17
	T1	1	2526883 ^{abc}	± 2680127	665 ^{gh}	± 46	47 ^{ij}	± 14
		3	15480 ^c	± 5676	24 ^h	± 6	35 ^{ij}	± 15
	T2	1	330745 ^c	± 102595	786 ^{fgh}	± 87	24 ^{ij}	± 15
		3	97456 ^c	± 83681	373 ^{gh}	± 56	77 ^{ghij}	± 10
	T3	1	950198 ^{bc}	± 150271	1947 ^{bc}	± 172	38 ^j	± 3
		3	373420 ^c	± 119517	895 ^{efgh}	± 88	88 ^{ghij}	± 28
	T4	1	807281 ^{bc}	± 232915	968 ^{defgh}	± 135	149 ^{fghi}	± 11
		3	348033 ^c	± 220597	72 ^h	± 5	271 ^{def}	± 36
	T5	1	457412 ^c	± 682915	180 ^h	± 81	54 ^{hij}	± 3
		3	2110915 ^{abc}	± 1540152	1994 ^{bc}	± 228	142 ^{ghi}	± 19
T6	1	1099733 ^{bc}	± 302717	2991 ^a	± 730	57 ^{ghij}	± 14	
	3	957873 ^{bc}	± 755269	485 ^{gh}	± 38	178 ^{fgh}	± 71	
Coleta 2 (estação chuvosa)	R	1	2772162 ^{abc}	± 775054	1879 ^{bcd}	± 364	73 ^{ghij}	± 19
		2	3329610 ^{abc}	± 59458	1852 ^{bcdef}	± 157	8 ^{ghij}	± 4
	T1	1	3196667 ^{abc}	± 2818544	156 ^h	± 71	184 ^{efg}	± 80
		3	758198 ^{bc}	± 385386	1469 ^{cdefg}	± 1652	351 ^{cd}	± 59
	T2	1	2058976 ^{abc}	± 1635512	256 ^h	± 104	72 ^{ghij}	± 22
		3	5352974 ^a	± 2737461	2806 ^{ab}	± 179	107 ^{ghij}	± 26
	T3	1	4690221 ^{ab}	± 3516400	454 ^{gh}	± 51	536 ^{ab}	± 49
		3	4724676 ^{ab}	± 1339858	290 ^h	± 126	395 ^{dc}	± 21
	T4	1	1555876 ^{abc}	± 900867	471 ^{gh}	± 199	181 ^{efgh}	± 49
		3	2218213 ^{abc}	± 218117	170 ^h	± 53	307 ^{cde}	± 98
	T5	1	61648 ^c	± 56535	634 ^{gh}	± 106	91 ^{ghij}	± 19
		3	1352798 ^{abc}	± 105905	374 ^h	± 32	40 ^{ij}	± 9
T6	1	1586265 ^{abc}	± 343897	436 ^{gh}	± 130	415 ^{bc}	± 17	
	3	1392698 ^{abc}	± 843505	1682 ^{cdef}	± 169	29 ^{ij}	± 3	