

PAULO WILSON GOULART

**DIVERSIDADE MICROBIANA E INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE SOLO
AFETADO PELO REJEITO DE MINERAÇÃO PROVENIENTE DO ROMPIMENTO
DA BARRAGEM B1 EM BRUMADINHO, MINAS GERAIS**

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

Coorientadores: Marliane de Cássia Soares da Silva;
Isabelle Gonçalves de Oliveira Prado

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

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

T

G694d
2024
Goulart, Paulo Wilson, 1987-
Diversidade microbiana e indicadores microbiológicos de
solo afetada pelo derramamento de rejeito de mineração :
proveniente do rompimento da barragem B1 em Brumadinho,
Minas Gerais / Paulo Wilson Goulart. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (101 f.): il.

Inclui apêndice.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.559>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Rizobactérias. 2. Indicadores biológicos. 3. DNA -
Análise. 4. Micro-organismos do solo. 5. Barragens de rejeitos -
Brumadinho (MG). 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. 579.334


PAULO WILSON GOULART

DIVERSIDADE MICROBIANA E INDICADORES MICROBIOLÓGICOS DE SOLO AFETADO PELO REJEITO DE MINERAÇÃO PROVENIENTE DO ROMPIMENTO DA BARRAGEM B1, EM BRUMADINHO, MINAS GERAIS


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: 17 de Junho de 2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 PAULO WILSON GOULART
Data: 03/09/2024 13:08:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Paulo Wilson Goulart
Autor

Documento assinado digitalmente
 CYNTHIA CANEDO DA SILVA
Data: 03/09/2024 16:39:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Cynthia Canêdo da Silva
Orientadora

Dedico este trabalho à minha família, minha esposa e a meus filhos que sempre estiveram comigo ao longo desta caminhada!

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Patrícia e a meu filho Daniel, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim nos momentos de dificuldades.

À minha irmã, Elisângela, que sempre insistiu para que eu nunca desistisse dos meus sonhos e projetos.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, Jéssica, Giarlã, Matheus e Patrícia, que me acolheram, me ensinaram e me acompanharam nos meus primeiros passos na ciência.

A meus colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental Aplicada, pelo companheirismo de sempre, especialmente minha amiga-irmã Lutécia, que sempre acreditou em mim e me tranquilizou nos momentos mais delicados.

Ao técnico Alex, que sempre acompanhou de perto meu trabalho, dando conselhos e orientações, sempre com otimismo.

À Isabelle pelas orientações e auxílio com a organização das atividades realizadas

Aos membros da banca, professor Juraci e Alex pela disponibilidade de apreciação deste trabalho e pelas grandiosas contribuições

À minha orientadora, Prof^a Cynthia, que com paciência e liderança, me orientou e confiou em mim durante todo o trabalho.

Ao Departamento de Microbiologia (DMB), por todo o suporte necessário para a realização das atividades.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Vale S.A., pela parceria e apoio financeiro, que permitiu a realização deste trabalho.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES (Código de Financiamento 001) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, minha enorme gratidão!

RESUMO

GOULART, Paulo Wilson, Universidade Federal de Viçosa, Junho de 2024. **Diversidade microbiana e indicadores microbiológicos de solo afetado pelo rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem B1, em Brumadinho, Minas Gerais.** Orientador: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadores: Marliane de Cássia Soares da Silva; Isabelle Gonçalves de Oliveira Prado

Em 2019, ocorreu em Brumadinho, MG, o rompimento da barragem de rejeitos de minério de ferro e desde então, muitos estudos têm sido realizados na área afetada para a reabilitação ambiental. Este trabalho teve como objetivo monitorar o processo de reabilitação ambiental de solo afetado pelo derramamento de rejeitos de mineração, utilizando os bioindicadores: Carbono da Biomassa Microbiana (CBM), Respiração Basal Microbiana, Coeficiente Metabólico, Atividade Enzimática e Diversidade Microbiana. Adicionalmente, foi feita uma prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, com potencial de uso no impulsionamento da restauração vegetal da área afetada. Para tanto, foram coletadas amostras de solo pertencentes a uma área afetada pelo rejeito, uma área de floresta não afetada (referência), e raízes de plantas da área afetada para isolamento de rizobactérias. Os resultados dos bioindicadores avaliados demonstraram diferenças estatísticas entre as áreas afetada e referência, em todas as coletas. O grupo referência teve melhor aproveitamento de carbono, maiores valores de CBM, atividade da urease, arilsulfatase e fosfatase alcalina, sugerindo uma relação desses indicadores com maior aporte de material orgânico. As análises da estrutura e diversidade microbiana identificaram espécies indicadoras com alto grau de associação a cada uma das áreas estudadas. Adicionalmente, uma análise integrada de todos os bioindicadores revelou uma aproximação entre as áreas afetada e referência, indicando uma possível recuperação ao longo do tempo estudado, evidenciando que os bioindicadores microbiológicos aplicados a este estudo foram promissores para monitorar o processo de reabilitação da área afetada. O isolamento de rizobactérias proporcionou a obtenção de 29 isolados, dos quais 19 foram promissores em pelo menos dois testes *in vitro* para solubilização de nutrientes e produção de fitormônios. Ensaio complementares *in vivo* serão necessários para a formulação de bioinoculantes a ser utilizada na produção de mudas de interesse em processos de recomposição vegetal de solos degradados.

Palavras-chave: Bioindicadores. Metataxonomia. Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Planta (PGPR). Reabilitação.

ABSTRACT

GOULART, Paulo Wilson, Federal University of Viçosa, June 2024. **Microbial diversity and microbiological indicators of soil affected by mining waste from the collapse of the B1 dam in Brumadinho, Minas Gerais.** Advisor: Cynthia Canêdo da Silva. Co-supervisors: Marliane de Cássia Soares da Silva; Isabelle Gonçalves de Oliveira Prado

In 2019, an iron ore tailings dam collapsed in Brumadinho, MG. Since then, numerous studies have been conducted in the affected area to facilitate environmental rehabilitation. This study aimed to monitor the environmental rehabilitation process of soil affected by the mining tailings spill, utilizing the following bioindicators: Microbial Biomass Carbon (MBC), Microbial Basal Respiration, Metabolic Coefficient, Enzymatic Activity, and Microbial Diversity. Additionally, a survey of plant growth-promoting rhizobacteria was conducted to assess their potential for enhancing plant restoration in the affected area. To achieve this, soil samples were collected from the impacted area, an unaffected forest area (reference), and plant roots from the affected area for rhizobacteria isolation. The results from the evaluated bioindicators showed significant statistical differences between the affected and reference areas across all collections. The reference group exhibited better carbon utilization, higher values of MBC, urease, arylsulfatase, and alkaline phosphatase activity, indicating a correlation between these indicators and increased organic material input. Analyses of microbial structure and diversity identified indicator species highly associated with each study area. Moreover, an integrated analysis of all bioindicators indicated similarity between the affected and reference areas, suggesting potential recovery over the study period. This underscores the promise of microbiological bioindicators in monitoring the rehabilitation process of affected areas. Isolation of rhizobacteria yielded 29 isolates, with 19 showing promise in at least two in vitro tests for nutrient solubilization and phytohormone production. Further complementary in vivo tests are necessary to formulate bioinoculants for use in seedling production aimed at rehabilitation degraded soils.

Keywords: Bioindicators. Metataxonomy. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Rehabilitation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	10
CAPÍTULO 1.....	12
REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Bacia hidrográfica do rio Paraopeba.....	12
1.2 O rompimento da barragem B1 em Brumadinho, Minas Gerais.....	12
1.3 Indicadores microbiológicos do solo.....	14
1.4 Diversidade microbiana do solo.....	18
1.5 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal.....	20
REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 2.....	36
INDICADORES MICROBIOLÓGICOS NO MONITORAMENTO DE SOLO AFETADO PELO REJEITO DE MINÉRIO.....	36
2.1 INTRODUÇÃO.....	37
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.2.1 Descrição da área de estudo e amostragem do solo.....	39
2.2.2 Respiração basal microbiana.....	40
2.2.3 Quantificação do carbono da biomassa microbiana (CBM).....	41
2.2.4 Análises enzimática do solo.....	43
2.2.5 Diversidade microbiana do solo.....	45
2.2.6 Análise Estatística.....	47
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.3.1 Respiração basal microbiana (RBM), carbono da biomassa microbiana (CBM) e qCO_2	47
2.3.2 Análise enzimática do solo.....	54
2.3.3 Análise da estrutura e diversidade microbiana do solo.....	58
2.4 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
CAPÍTULO 3.....	77
ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS DA ÁREA AFETADA PELO REJEITO DE MINERAÇÃO DE FERRO.....	77
3.1 INTRODUÇÃO.....	78
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3.2.1 Coleta de material.....	79
3.2.2 Isolamento de rizobactérias.....	80

3.2.3 Identificação taxonômica dos isolados e análise filogenética	80
3.2.4 Triagem <i>in vitro</i> dos isolados para PGPR	82
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.3.1 Isolamento e identificação taxonômica de rizobactérias.....	84
3.3.2 Triagem <i>in vitro</i> dos isolados para promoção de crescimento de plantas	86
3.4 CONCLUSÃO	91
4. CONCLUSÃO GERAL.....	92
REFERÊNCIAS	94
APÊNDICE A.....	98

INTRODUÇÃO GERAL

O estado de Minas Gerais possui a mineração, sobretudo de minério de ferro, como um dos principais recursos econômicos. A exploração do minério de ferro, muitas vezes, expõe os solos a situações de degradação ambiental devido à geração de rejeitos no processo de beneficiamento que, eventualmente, podem resultar em tragédias como a que ocorreu em 2019, com o rompimento da barragem B1, em Brumadinho, Minas Gerais.

Em 25 de janeiro de 2019, a cidade de Brumadinho, pertencente institucionalmente à região metropolitana de Belo Horizonte, foi impactada pelo rompimento da barragem B1 na mina Córrego do Feijão, que gerou impactos ambientais e sociais catastróficos, principalmente em relação à quantidade de vítimas fatais. Cerca de 11,7 milhões de m³ de rejeito de mineração e lama foi derramado ao longo do rio Paraopeba em direção ao rio São Francisco, afetando uma extensa área de cerca de 297,28 hectares.

Desde então, com a premissa de buscar ações preventivas, corretivas e de monitoramento da área afetada, pesquisas com amostras de solo, sedimentos, água, plantas e animais vem sendo realizadas na região com iniciativa, suporte e apoio da empresa Vale S.A (FURLAN et al., 2020; THOMPSON et al., 2020; PACHECO et al., 2021; PARENTE et al., 2021; SOUZA et al., 2021; TERAMOTO et al., 2021). Estes estudos têm permitido, dentre outros resultados, identificar alterações físico-químicas e microbiológicas em indicadores de qualidade do solo. No entanto, o estabelecimento de padrões de variação dos bioindicadores, que possam ser utilizados como referência, ainda não são bem definidos, levando a uma dificuldade de interpretação desses parâmetros. Sendo assim, é essencial o conhecimento do comportamento desses parâmetros microbiológicos ao longo do processo de reabilitação de uma área degradada para a melhor definição de quais e como usar os bioindicadores como atestadores de qualidade do solo.

Este estudo teve o objetivo de avaliar e monitorar cinco bioindicadores: carbono da biomassa, respiração microbiana, quociente metabólico, atividade enzimática e diversidade microbiana de áreas degradadas pelo rejeito de mineração de ferro em Brumadinho, MG. Adicionalmente, no âmbito dos processos de revegetação de áreas degradadas, existe uma demanda latente por novas técnicas de melhoramento do restabelecimento da vegetação em solos degradados. Assim,

diante desse cenário, conjuntamente aos estudos dos bioindicadores microbiológicos, foi feita uma prospecção de rizobactérias com potencial de promoção de crescimento vegetal, a partir de raízes de plantas nativas coletadas na área afetada pelo rejeito. Este estudo foi concebido para permitir gerar novos conhecimentos e ferramentas para subsidiar tomadas de decisões em práticas de recuperação/reabilitação de áreas degradadas, baseados na alta sensibilidade e rapidez de resposta dos indicadores microbiológicos do solo, associados a novas possibilidades de bioestimulação para um processo de revegetação mais eficiente.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Bacia hidrográfica do rio Paraopeba

A bacia hidrográfica do rio Paraopeba, cuja nascente se encontra no município de Cristiano Ottoni, está situada a sudeste do estado de Minas Gerais, correspondendo a uma área de mais de 12 mil quilômetros quadrados e representando 5,14% do território da bacia do rio São Francisco, segundo a Agência Nacional de Águas (CIBAPAR 2011). A bacia abrange 35 municípios com cerca de 1,4 milhões de habitantes que interagem direta e indiretamente com os seus afluentes, remetendo a uma importância social, econômica e cultural (CBH-Paraopeba, 2024). Do ponto de vista econômico, a bacia do rio Paraopeba contempla mais de 40 municípios sendo importante não só para as atividades agropecuárias destes, como também servindo ao abastecimento da população desses municípios, como o caso do sistema rio Manso responsável por 28% do abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte (CBH - rio das Velhas, 2015). No âmbito social e cultural, a bacia do rio Paraopeba constitui parte do patrimônio natural dos municípios sede, sendo parte integrante da identidade da região (CIBAPAR, 2011). Entre os municípios com sede na bacia, Brumadinho se encontra na posição central ao longo da bacia na altura dos rios Veloso, ribeirão Casa Branca e na calha principal do rio Paraopeba, sendo este último o principal rio que corta o município e um dos principais tributários do rio São Francisco (IGAM, 2005).

A cidade de Brumadinho, situada a 54 km de Belo Horizonte, possui como principal riqueza o minério de ferro, sendo sua economia fortemente ligada à mineração feita pela mineradora VALE S/A (ALMEIDA & CASTRO, 2023). Devido à forte presença da mineração na região, a bacia hidrográfica do rio Paraopeba demanda grande atenção e esforços no sentido de monitoramento e preservação, já que possui uma importância central para um grande número de municípios e se encontra em uma zona sensível do ponto de vista ambiental (CIBAPAR, 2011).

1.2 O rompimento da barragem B1 em Brumadinho, Minas Gerais

Em 25 de Janeiro de 2019 ocorreu o colapso da barragem de rejeitos B1 na mina Córrego do Feijão, sob responsabilidade da Vale S/A, no município de Brumadinho, em que foram lançados cerca de 12 milhões de metros cúbicos de rejeito e lama ao longo do vale, abaixo da barragem, chegando até a bacia hidrográfica do rio Paraopeba, vitimando 272 pessoas (THOMPSON et al., 2023). O rompimento da barragem culminou com o derramamento de rejeitos de mineração que afetou uma extensa área de preservação, atingindo o rio Paraopeba, principal rio que passa pelo município (ROTTA et al., 2020), cujas águas servem ao abastecimento não só de Brumadinho como, também, de outras cidades no entorno, incluindo parte da capital mineira (COSTA, 2024).

O rejeito de minério de ferro é proveniente do primeiro beneficiamento do minério bruto, em que são retiradas as impurezas, gerando enormes quantidades de lama, material arenoso e até resíduos químicos, que são normalmente concentrados em barragens, como a barragem B1, em Brumadinho (CARMO et al., 2020). Em processos de beneficiamento de ferro, depois da etapa de extração, o minério extraído é moído, peneirado e separado de uma fase de sílica por meio de flotação reversa, mas a composição química e mineralógica do rejeito gerado no processo depende do tipo de rocha processada, dos reagentes utilizados nos processos e da eficiência do processamento (CARMIGNANO et al. 2021). Inicialmente, o rejeito e lama proveniente da barragem seguiu atingindo estruturas da própria Vale S/A, áreas de florestas, áreas agrícolas e o riacho Ferro-Carvão, causando impactos severos nos ecossistemas aquáticos e terrestres, pela deposição do rejeito sobre o solo, assoreamento e turvação dos corpos d'água (SIQUEIRA et al., 2022).

A barragem B1 foi construída pelo método de levantamento de talude a montante, baseado no alteamento do corpo da barragem pelo acúmulo do próprio rejeito (ROTTA et al., 2020). Este método, mais barato, é considerado o método crítico do ponto de vista de segurança, pois o acúmulo de água e as características mineralógicas do rejeito podem levar a liquefação do material usado no alteamento, causando instabilidades na estrutura (GAMA et al, 2020). Estudos apontam que as propriedades do rejeito da mina Córrego do Feijão favoreceram a geração de instabilidades na estrutura da barragem devido a segregação em camadas, conferindo uma sedimentação de material mais denso, favorecendo a infiltração e liquefação da estrutura nas camadas superiores (ZHU et al, 2024). Segundo relatório técnico do Centro Internacional de Métodos Numéricos em Engenharia (UPC - Universidad

Politécnica de Catalunya), responsável pelo estudo e apontamento das possíveis causas do colapso da barragem, a pedido do Ministério Público Federal, a liquefação da estrutura e o consequente aumento da poropressão causaram redução da resistência ao cisalhamento, o que culminou com o colapso da barragem (CMNE, 2021).

Com o intuito de mitigar os efeitos ambientais e sociais decorrentes do derramamento do rejeito, em 4 de fevereiro de 2021 (cerca de dois anos após o rompimento!!!), foi homologado o acordo judicial para reparação integral dos danos causados pelo rompimento da barragem B1. A Vale S/A, o Governo de Minas Gerais, o Ministério Público Estadual e Federal e a Defensoria Pública do Estado acordaram o aporte de, aproximadamente, 37 bilhões de reais para o plano de recuperação, sendo este recurso destinados tanto às medidas reparatórias, de responsabilidade da Vale S/A, quanto para pagamentos emergenciais e ressarcimento de despesas do Estado (DPMG, 2021). O acordo, no entanto, não exclui a responsabilidade da empresa diante de ações específicas individuais e/ou coletivas, sendo um acordo direto com o poder público para um plano de recuperação dos danos coletivos (MPMG, 2022). Assim, mediados pela Defensoria Pública do Estado de Minas Gerais e mobilização popular, até dezembro de 2023 mais de 7 mil pessoas receberam indenizações extrajudiciais, motivados pelas demandas individuais frente aos impactos do desastre ambiental e social de Brumadinho (DPMG, 2024).

No âmbito das medidas reparadoras, implementadas pela Vale S/A, muitos estudos têm sido conduzidos na região, nos quais se busca caracterizar e monitorar as áreas afetadas, com o objetivo central de estabelecer estratégias de recuperação dessas áreas (VALE, 2022). Diante da necessidade de caracterização e de monitoramento dessas áreas, tem-se lançado mão de várias técnicas para atestar e monitorar a qualidade do solo visando aperfeiçoar os processos de recuperação dos ambientes atingidos direta e indiretamente pelo rejeito da barragem B1 (PRIMO et al, 2021).

1.3 Indicadores microbiológicos do solo

O solo é um complexo dinâmico e representa um ecossistema associado a sustentação da vida no planeta uma vez que envolve todos os ciclos biogeoquímicos.

Os solos abrigam populações microbianas extremamente diversas, as quais podem variar em tamanho e composição, ao longo do tempo e do espaço (LAUBER et al., 2009; WANG et al., 2019). Em face da importância e dinamicidade do microbioma do solo, em termos de serviços ecossistêmicos, uso de indicadores que reflitam o estado desses microrganismos tem sido amplamente considerado como um atestador da qualidade do solo (SCHLOTTER et al., 2018).

Os bioindicadores microbiológicos podem considerar um determinado organismo, a comunidade microbiana, ou mesmo parâmetros resultantes da ação dessa comunidade microbiana, como taxa de respiração, atividade metabólica, liberação de metabólitos, entre outros (ASTUDILLO-GARCÍA et al., 2019). Esses bioindicadores, especialmente os relacionados às atividades metabólicas, têm sido considerados altamente sensíveis, podendo detectar pequenas mudanças ambientais, e estão correlacionados com todos os indicadores de qualidade do solo, em termos biológicos, físicos e químicos (MA et al., 2022). Por causa da natureza integrativa e dinâmica dos indicadores microbiológicos do solo, se por um lado confere sensibilidade e rapidez em detectar variações no ambiente, por outro, representa uma dificuldade de interpretação de suas informações, fazendo com que a escolha de quais bioindicadores não seja uma tarefa trivial (NIELSEN & WINDING, 2002).

Os bioindicadores microbianos do solo mais utilizados são a medida do tamanho da comunidade microbiana ativa, a taxa de respiração microbiana, a atividade enzimática e, em menor grau, a diversidade microbiana (BHADURI et al., 2022). O carbono da biomassa (CBM) é um indicador chave na avaliação de perturbações no solo e tem se mostrado adequado em avaliação de efeito de borda em florestas (SANTOS et al., 2019) e em áreas agrícolas, para avaliar alterações na fertilidade do solo (MCGONIGLE & TURNER, 2017). A biomassa microbiana do solo compreende um conjunto lábil de formas de carbono e outros nutrientes, e engloba toda a biomassa de microrganismo presentes nas camadas do solo (DAS et al. 2023; PATOINE et al. 2022). Como os microrganismos desempenham papel crítico em todos os ciclos biogeoquímicos de nutrientes, a medida do tamanho dessa comunidade no solo, que se traduz na medida do CBM, é um indicador fundamental da saúde do solo, uma vez que a comunidade microbiana pode ser fonte ou sumidouro de nutrientes (SINGH et al. 1989).

Nesse sentido, a quantificação do CBM pode ser usada para parametrizar outros bioindicadores do solo baseados na atividade microbiana, e tem sido

amplamente utilizado em conjunto como atestadores de qualidade do solo (ROSS et al. 1982). Os níveis de CBM são sensíveis às propriedades do solo, à profundidade, à sazonalidade e ao uso do solo, o que afeta outros bioindicadores microbiológicos, levando à necessidade de uma avaliação integrada aos bioindicadores associados à atividade funcional da comunidade microbiana (LEPCHA & DEVI, 2020).

Associado ao CBM estão os indicadores derivados da atividade metabólica da comunidade microbiana. A respiração microbiana e sua razão pelo CBM, definida como quociente metabólico (qCO_2), tem sido utilizado como uma medida da relação entre carbono fixado na biomassa microbiana e o carbono, em forma de CO_2 , perdido pela respiração (CLAYTON et al., 2021). A respiração microbiana do solo, pode ser entendida como uma medida da atividade metabólica e, sua normalização em função do CBM, é uma métrica da eficiência de fixação de carbono no solo e do esforço energético da comunidade microbiana (ZHANG et al. 2016).

A medida da taxa de respiração tem sido utilizada em conjunto com outros bioindicadores em áreas de recuperação ambiental em que o solo tenha sido exposto a contaminantes. As taxas de respiração têm sido observadas em níveis mais altos, sugerindo maior atividade metabólica microbiana em estudos de caracterização microbiológica de áreas contaminadas por rejeitos de mineração de ferro (COUTO et al., 2021). A avaliação de atributos microbiológicos do solo em área de mineração demonstrou alta sensibilidade em apresentar diferenças nas fitofisionomias, influenciadas pela atividade de mineração de ferro, com alterações nos níveis de respiração microbiana, qCO_2 e atividade enzimática (SILVA et al., 2018). Ao analisar a relação entre o conteúdo de carbono no solo, disponível para a comunidade microbiana, e a resposta do tamanho desta comunidade pela razão qCO_2 , foi demonstrado que solos com qCO_2 mais altos podem apresentar algum tipo de estresse, explicando a atividade metabólica elevada e baixo aproveitamento do carbono (BARBOSA et al., 2017).

Os processos mediados pela microbiota do solo são catalisados por enzimas e têm um papel central do ponto de vista funcional, pois envolvem os ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (ALKORTA et al., 2003). A atividade enzimática é um revelador do estado metabólico da microbiota do solo, refletindo indiretamente alterações no solo com alta sensibilidade e rapidez de resposta (SOBUCKI al. 2021).

As fosfatases do solo atuam na clivagem de complexos de fosfatos, liberando o grupamento fosfato prontamente assimilável, processo indispensável na

biodisponibilização de fósforo (EIVAZI & TABATABAI, 1977). Estudos relacionados a atividade das fosfatases demonstram uma correlação positiva entre quantidade de carbono orgânico presente no solo e a atividade desta enzima. Uma maior quantidade de fósforo total, no entanto, não causa aumento da atividade das fosfatases, o que tem sido atribuído ao fato de que parte do fósforo total compõem o mineral primário e está excluído do ciclo do fósforo no solo como substrato para a enzima (MARGALERF et al. 2017).

Envolvida no ciclo biogeoquímico do enxofre, a arilsulfatase do solo representa o principal mecanismo microbiologicamente mediado de biodisponibilização desse nutriente, que ocorre por meio da clivagem de ligação éster de sulfato (WARMAN & WHALEN, 1994). Ao contrário das enzimas relacionadas aos ciclos do carbono, nitrogênio e fósforo, existem poucos estudos sobre a atuação da arilsulfatase nos solos, mas os poucos estudos mostram uma atividade enzimática em níveis relativamente baixos, entre 0,3 a 2,6 nmol do produto por g solo⁻¹ hora⁻¹ em comparação com outras enzimas presentes no solo (CHEN, e al., 2019). Estudos sobre proteólise e hidrólise de éster de sulfato pela comunidade microbiana do solo demonstraram que essa enzima é menos afetada pelo uso do solo do que pela variabilidade interanual (ROMILLAC et al., 2023), e possui alta sensibilidade às condições de microambiente, apresentando os valores de atividade mais baixos em condições de baixa humidade e temperaturas mais altas (LI & SARAH, 2003).

A β -glicosidase e a urease são as enzimas chaves nos processos biológicos dos ciclos biogeoquímicos, uma vez que são as enzimas relacionadas à decomposição e biodisponibilização de compostos de carbono e de nitrogênio (LIU et al., 2022). A β -glicosidase no solo atua em compostos de carbono clivando e liberando anéis aromáticos das cadeias, disponibilizando formas de carbono mais prontamente decomponíveis, sendo a ação desta enzima um dos reguladores da dinâmica da matéria orgânica do solo (DEBOSZ et al., 1999). Devido à grande demanda de nitrogênio para o estabelecimento da comunidade microbiana e, conseqüentemente, para uma maior atuação dessa comunidade na ciclagem de nutrientes por meio do aporte de enzimas extracelulares, existe estreita relação entre os ciclos do carbono e do nitrogênio, e da urease com as enzimas celulolíticas (LIU et al., 2022). A urease catalisa a reação de clivagem da ureia em CO₂ e amônia, promovendo assim a liberação da amônia, que é uma forma nitrogenada prontamente assimilável, tanto pelas plantas quanto pelos microrganismos (ZHAO et al., 2022).

Estudos comparativos sobre manejos ecológicos e convencionais, em agroecossistemas de café, utilizando como bioindicadores a atividade das enzimas β -glicosidasases, fosfatases e ureases, mostraram ser eficientes em revelar as diferenças de respostas do solo diante dos diferentes tipos de manejos (VANEGAS et al., 2018). Em campos de cultura de soja e milho, sob aplicação de formas de nitrogênio à base de ureia, a atividade enzimática do solo demonstrou ser pouco afetada. A falta de resposta enzimática à aplicação de ureia indica que alguma forma de nitrogênio orgânico pode ter uma importância maior na atividade microbiana (DAVIES et al., 2022). Nos ecossistemas naturais, a atividade enzimática, geralmente, se correlaciona positivamente com o aumento na área de contato entre a enzima e os substratos, o que permite a ocorrência da reação de catálise. Taxas altas de atividade enzimática nesses ambientes pode ser devida à maior abundância de substratos, no entanto, algumas enzimas não obedecem a esse *feedback* positivo, já que a atividade da fosfatase tem sido mostrado maior em baixa disponibilidade de fósforo, sendo inibida pela sua abundância (WANG et al., 2023). Por representar o aspecto funcional da comunidade microbiana no solo, a atividade enzimática tem sido utilizada em muitos estudos de solos contaminados como indicadores de resposta a diferentes manejos, com boa sensibilidade de resposta mostrando que, de forma conjunta com outros bioindicadores microbiológicos, seu uso é inquestionável quando se pretende caracterizar, monitorar e aferir a qualidade funcional do solo (LEE et al., 2020).

1.4 Diversidade microbiana do solo

Outro bioindicador que pode ser empregado como método de avaliação do solo é a diversidade microbiana. Mudanças na distribuição de grupos microbianos específicos podem ser usadas como indicador de alterações ambientais importantes, uma vez que os microrganismos do solo estão associados a funções ecológicas cruciais (SCHLOTTER et al., 2018). A biodiversidade do solo, referida como “uma maioria ignorada” devido a dificuldade de cultivo de microrganismos deste microbioma, tem ganhado destaque em virtude dos recentes estudos metagenômicos, que revelaram uma diversidade importante. Estima-se que em cada grama de solo pode haver mais de dez mil espécies diferentes, desempenhando inúmeras funções

ecossistêmicas, que colocam o microbioma do solo como central nas funções de suporte a vida na terra (NESME et al., 2016; SCHLOTTER et al., 2018).

Analisando a diversidade microbiana como um bioindicador para predição de variáveis físicas e químicas, Hermans et al. (2020) observaram que existe uma boa correlação preditiva entre estas variáveis e a diversidade microbiana, conseguindo prever, com precisão, entre 50 a 95% na atribuição de notas de qualidade do solo. Estudos sobre as relações entre carbono total do solo e indicadores, como a biomassa e riqueza de espécies, sugerem que as reduções no teor de carbono do solo, como resultado do aumento da aridez e reflexo das alterações climáticas, podem levar a diminuições concomitantes da biomassa microbiana e da diversidade (BASTIDA et al., 2021). Assim, no âmbito das mudanças climáticas, a diversidade microbiana tem se mostrado sensível a alterações de temperatura, sendo este último o principal fator controlador das respostas da diversidade alfa a perturbações no solo (ZHOU et al. 2020).

Sobre os efeitos da diversidade microbiana em microcosmos experimentais, ROMERO et al. (2023) demonstraram que simplificações sucessivas da comunidade microbiana afetaram fortemente a produção de biomassa seca de plantas, demonstrando que a biodiversidade microbiana é fundamental para o rendimento nos agroecossistemas e que, apesar de redundância funcional, a redução da diversidade microbiana no solo pode ser negativa na multifuncionalidade do ecossistema. Adicionalmente, estudos em área impactada por derramamento de rejeitos de mineração revelou que existe uma correlação positiva entre o processo de revegetação e o aumento da diversidade fúngica, indicando a possibilidade de uso da diversidade microbiana como um bom indicador de reabilitação de áreas degradadas (PRADO et al., 2019).

No entanto, a utilização da diversidade microbiana como bioindicador de qualidade do solo ainda é pouco explorada. Atualmente, a carência de genomas representativos, que permitam aplicação de estudos de ecologia reversa para predição de associações ecológicas importantes, e a laboriosidade desse tipo de análise, representam grandes limitações para o estabelecimento da diversidade microbiana como um bioindicador (WILHELM et al., 2023). Assim como para outros bioindicadores microbiológicos do solo, para a diversidade microbiana, há uma carência de referências de funções ecológicas vinculadas a grupos específicos para pelo menos um tipo de solo. Além disso, a falta de padronização de métodos de

extração e *pipeline* para tratamentos de dados minimamente tendenciosos, tem levado pesquisadores a vieses, não só na atribuição de genes funcionais a grupos específicos, como ao levantamento de novos genes e variação da distribuição espacial dos microrganismos (NESME et al., 2016).

1.5 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

As práticas de recuperação de áreas degradadas, ou mesmo a própria recuperação passiva em virtude da resiliência intrínseca do ambiente, sempre passam pela revegetação das áreas. A degradação dos solos, exerce grandes influências nas propriedades do solo, o que afeta diretamente a dinâmica da comunidade microbiana presente e suas associações (DIXIT et al., 2024). Estudos sobre a rizosfera e as rizobactérias têm revelado muitas dessas associações e mostrado sua importância. As rizobactérias são populações bacterianas recrutadas para colonizar a região mais próxima das raízes (SMITH et al., 2017), região sujeita a sofrer interferência direta da fisiologia das raízes, tais como liberação de substâncias orgânicas pela planta e absorção de nutrientes (VOCCIANTE et al., 2022). Estudos feitos a partir de isolamento de bactérias, bem como sua caracterização do ponto de vista metabólico, indicaram que esses microrganismos são capazes de desempenhar inúmeras funções de interesse para a planta, adquirindo desta, em contrapartida, substâncias orgânicas que são normalmente utilizadas como fonte de carbono e energia (WESTON et al; 2012). Devido a esses grupos microbianos desempenharem vários papéis que afetam direta e indiretamente o crescimento da planta, são assim comumente designados como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR).

Essas Rizobactérias, ou abreviadamente PGPR, são grupos bacterianos que, por meio de uma íntima relação com a planta, têm sido relatadas como importantes ou até mesmo essenciais a sobrevivência da planta com a qual está associada (OJUADERIE et al., 2019). São um grupo altamente diverso, embora para cada planta seja recrutado um conjunto de microrganismos mais específico para colonizar a rizosfera, refletindo seus papéis muito especializados para cada planta em cada situação e cada ambiente (CHAUHAN et al., 2015).

As PGPR têm sido relatadas em inúmeros estudos como tendo funções diretas como degradação de poluentes ou herbicidas, dessorção e solubilização de nutrientes, fixação de nutrientes e produção de fitormônios (VOCCIANTE et al., 2022), e indiretas como a antibiose ou a própria competição com possíveis fitopatógenos inibindo sua proliferação, o que pode ser considerado uma forma particular de controle biológico (BENEDUZI et al., 2012). Ao longo das últimas décadas tem sido considerado a manipulação desses microrganismos na forma de bioinoculantes como uma potencial estratégia para o atendimento a diversas demandas importantes da sociedade, sobretudo visando a redução do uso de fertilizantes ou insumos industrializados em geral, o que vem de encontro a uma emergente necessidade e interesse mundial para uma agricultura sustentável, com menor uso de fertilizantes de fontes minerais e maior inocuidade, do ponto de vista ambiental, das atividades de produção (VEJAN et al., 2016). Embora ainda existam poucos estudos sobre a utilização de PGPR em revegetação de áreas naturais degradadas, avanços vem ocorrendo concomitante a um melhor entendimento das interações planta-microrganismos que ocorrem na rizosfera, revelando mecanismos pelos quais esses microrganismos afetam o crescimento e estabelecimento das plantas, e como as plantas ativamente controlam essa comunidade microbiana tão fundamental à sua sobrevivência (MOHANTY et al. 2021).

E envolvimento de microrganismos com a disponibilização de nutrientes para plantas, tanto agronômicas, quanto em processos de revegetação, tem como um caso mais emblemático a fixação do nitrogênio. O nitrogênio (N) é o nutriente mais limitante para o crescimento das plantas, sendo que as plantas são incapazes de fixar o Nitrogênio atmosférico independentemente, pelo fato de estarem na forma de dinitrogênio, isto é, ligados covalentemente na forma de N_2 pela tripla ligação (LEE et al., 2014). Entre as formas de N mais facilmente assimiladas pelas plantas estão a amônia e o nitrato, mas estas duas formas de N são normalmente pouco abundantes na maioria dos tipos de solos (MOREAU et al., 2019). As bactérias fixadoras de N podem ser tanto de vida livre quanto simbiotes, ou seja, viverem interdependentes com as plantas formando estruturas bastante conhecidas chamadas de rizóbios (SANTOS et al., 2020). A atividade de fixação de N propriamente dita é uma atividade muito bem controlada pelas bactérias, já que é uma atividade extremamente dispendiosa energeticamente. Esta atividade é resultado de ação de enzimas especializadas, produto dos genes *nif*, que alterna entre a repressão da fixação e

desrepressão a depender de condições ambientais (POZA-CARRION, 2014). Estudos para a caracterização das proteínas Nif, produtos dos genes nif, em *Azotobacter vinelandii* revelaram um complexo sistema de proteínas componentes para a produção da Nitrogenase funcional, como NifA e a essencial NifB comum a todas as Nitrogenases funcionais envolvidas na fixação biológica de N (ARRAGAIN et al., 2017) mostrando um alto nível de especialização das bactérias capazes de realizar esse tipo de captação de N atmosférico. Adicionalmente, na cultura do milho foi demonstrado, por meio da busca pelos genes das proteínas Nifs usando sequenciamento e PCR quantitativo, a co-ocorrência natural de grupos distintos de rizobactérias fixadoras de nitrogênio (RENOUD et al., 2020), o que indica o exercício da função ecológica de fixação de N como importante para essa cultura, que tem uma dependência grande de N no seu ciclo de produção.

O uso de PGPR fixadores de nitrogênio em culturas agrícolas tem sido feito com uso de inoculantes nas sementes e também na cultura já em andamento em determinados estágios de desenvolvimento da planta, mas bons resultados têm sido relatados em inoculação de sementes, o que tem tornado uma prática comum em culturas como soja que é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil (EMBRAPA 2019). Num estudo para a avaliação dos efeitos de inoculantes líquidos comerciais na cultura na soja, que compreenderam tratamentos de inoculação com *Bradyrhizobium* spp. e co-inoculação com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense*, revelaram que a inoculação pode promover um aumento significativo da nodulação em até 57 %, promovendo fixação de N e conseqüentemente aumento de produtividade (HUNGRIA et al., 2015). Em outras culturas como batata doce, a inoculação com *Azotobacter* sp. (IBCB10) (CASTELLANOS et al., 2020) também demonstrou eficiência na nodulação e fixação de N, enfatizando não apenas o potencial de utilização como também a aplicação real, na forma de inoculantes, de bactérias fixadoras de N. No contexto de recuperação de área de minas, visando aumento do teor de N, o uso de inoculação de sementes com cepas de *Pseudomonas fluorescens* em associação com fertilizantes orgânicos e inorgânicos levou a uma rápida evolução do teor de N do solo, fornecendo bases científicas para o uso de microrganismos para recuperação de níveis de nutrientes no solo (WU et al., 2024).

O Fósforo (P) é um macronutriente, ou seja, requerido em grandes quantidades, que desempenha um papel central em quase todos os processos metabólicos nas plantas, sobretudo na fotossíntese e respiração (PLAXTON & TRAN,

2011). Alguns solos tropicais são fixadores de P, sendo que o P presente na grande maioria dos fertilizantes adicionados a eles fica adsorvido nas partículas minerais do solo, se encontram imobilizados na matéria orgânica, ou em precipitados de P, fazendo com que os teores de P residual, efetivamente disponível para as plantas seja, em muitos casos, muito baixos para atender às demandas das plantas (GRANADA et al., 2018). Vários estudos têm evidenciado o isolamento de rizobactérias com atividade na solubilização de fosfato por meio vários mecanismos como alteração do pH da rizosfera com produção de ácidos orgânicos e ou produção e fosfatases.

Em um estudo recente, trinta cepas isoladas de solo rizosférico coletados de regiões do sul do Paquistão e testadas para solubilização de fosfato, apresentaram atividades de solubilização que variaram entre 30 á 246 mg/ml, uma taxa de solubilização alta e associada a outras atividades relacionadas a promoção de crescimento de plantas como produção de AIA (BATOOL & IQBAL 2018). Uma análise *in vitro* e caracterização de uma cepa de *Serratia* sp. isolado de uma região de mangue, avaliada em meio de cultura para a atividade de solubilização de fosfato, apresentou uma boa eficiência de solubilização de fosfato a partir do fosfato tricálcio, cerca de 44,84 µg/ml, associada a uma acentuada diminuição do pH do meio, pela produção e liberação de ácidos orgânicos, assim como atividade de fosfatase ácida ótima de apenas 48 horas, demonstrando a capacidade de resposta deste microrganismos diante de uma fonte inacessível de fósforo em um curto período de tempo (BEHERA et al., 2017).

Do ponto de vista de teste de inóculos em experimento de campo, uma avaliação de inóculos de 4 espécies de bactérias solubilizadoras de fosfato na cultura do arroz, *Rahnella aquatilis* (KM977991), *Enterobacter* sp. (KM977992), *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* demonstrou que esses microrganismos tiveram uma quantificação de solubilização de fosfato acima de 254 µg/ml a partir de fosfato tricálcio, também associado a uma significativa produção de IAA, enfatizando a possibilidade do uso desses microrganismos como biofertilizantes na cultura do arroz (BAKHSHANDEH et al., 2015). Esses estudos demonstram um grande potencial no desenvolvimento e aplicação de inóculos de rizobactérias solubilizadoras de fosfato para a otimização da aquisição de fosfato pelas plantas, em vista as dificuldades relacionadas a indisponibilização desse nutriente nos solos, principalmente em solos degradados.

Com relação ao potássio (K), tem sido relatado também atividades de solubilização e biodisponibilização desse nutriente, um dos mais importantes nutrientes requeridos em grandes quantidades pela maioria das plantas (SANTOS et al., 2020). Os mecanismos pelos quais se dá essa solubilização envolve a produção de ácidos orgânicos que atuam nas partículas minerais nas quais o K se encontra adsorvido ou complexado (MEENA et al., 2014). Rizobactérias, como *Acidithiobacillus* spp., *Pseudomonas* spp e algumas espécie de *Bacillus* são frequentemente descritas por serem capazes de promover a solubilização de K por meio da liberação, pelo seu próprio metabolismo, de ácido oxálicos, ácido tartárico e ácido cítrico, que levam a dissociação do K na forma biodisponível das partículas minerais no solo nas quais se encontram adsorvidos (MEENA et al., 2014).

Um outro papel que pode ser exercido pelas rizobactérias com relação a disponibilização de nutrientes é a solubilização do zinco (Zn). Este nutriente, embora não seja um macronutrientes, é essencial para o desenvolvimento das plantas e normalmente é escasso na maioria dos solos brasileiros, sendo a pouca concentração existente, na maioria das vezes ocorrendo associados a formas minerais como zincita (ZnO), esfalerita (ZnFe), smithsonita (ZnCO₃), silicatos de zinco (ZnSiO₃), willemita (ZnSiO₄) e sulfeto de zinco (ZnS), formas estas indisponíveis (SHAH et al., 2021). Muitos estudos têm demonstrado essa capacidade de solubilização de Zn por rizobactérias por meio de acidólise por ácidos orgânicos, como evidenciado na cultura do milho num estudo de prospecção de microrganismos capazes de disponibilização de Zn, em que várias cepas de *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentaram alta eficiência de solubilização de Zn em condições de ensaio *in vitro* a partir de fontes de Zn indisponíveis como ZnO e ZnCO₃ (GOTETI et al., 2013).

Para o Ferro (Fe), tem sido relatado também uma grande atuação das rizobactérias na disponibilização desse nutriente. O Fe é um nutriente fundamental em diversos aspectos do metabolismo das plantas tendo em vista sua atuação como cofator enzimático para várias enzimas (FAHAD et al., 2015). Uma das categorias de compostos produzidos por rizobactérias são os compostos sideróforos, que são capazes de sequestrar o Fe presente no solo, sobretudo sua forma férrica Fe⁺³ mais indisponível, e disponibilizá-lo para as plantas (ZUO & ZHANG 2011). Vários microrganismos já foram relatados como produtores de sideróforos, por meio de isolamento de solo rizosférico e testes para produção de sideróforos. Com isso centenas de compostos com atividade de sideróforos já foram identificados como

sendo do grupo dos fenolatos, hidroxamatos, pioverdinas e carboxilatos (CHU et al., 2010).

Muitos gêneros de bactérias gram-negativas como *Enterobacter* e *Pseudomonas* são caracterizados como promotores de crescimento vegetal pela produção de compostos sideróforos através da inoculação direta em solos pobres em ferro (KUMAR et al., 2018). Esses compostos sideróforos produzidos pelas rizobactérias são quelantes de ferro, e são muito mais eficientes do que os sideróforos produzidos pelas próprias plantas ou mesmo por outros microrganismos associados a elas, mostrando um papel importante das rizobactérias para o aproveitamento desse nutriente e conseqüentemente, o bom desenvolvimento vegetal (FERREIRA et al., 2019).

Adicionalmente, microrganismos rizosféricos, desempenham um papel importante na produção de hormônios de crescimento vegetal, os chamados fitormônios, que influenciam diretamente na fisiologia da planta. Estes promovem desde o desenvolvimento de raízes, até o desenvolvimento do tecido vascular, crescimento de brotos e floração, o que tem relação direta com a capacidade de resistência, ou mesmo resiliência, da planta em diferentes condições de estresse (FAHAD et al., 2015). Vários estudos têm caracterizado bem as rizobactérias como grandes produtoras dessas substâncias e em adicional, substâncias antioxidantes protetoras de membrana de cloroplastos, e conseqüentemente, da fotossíntese, sob altas temperaturas (SARKER et al., 2018). Em tomate, foi evidenciado que a espécie *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9, por meio da produção de auxinas, importantes como promotores de crescimento e arquitetura vegetal, foi grande promotor de crescimento a partir de inoculação das sementes (BATISTA et al., 2021).

No trigo, um estudo a partir da inoculação de várias espécies de rizobactérias, avaliou a tolerância à ambiente salino e indicou uma acentuada atividade na metabolização ácido abscísico (ABA) diminuindo sua concentração, e na produção de fitormônios como citocininas e auxinas como sendo importantes nesse processo de tolerância ao estresse (MARTYNENKO et al., 2022). Uma outra substância considerada hormônio vegetal são as giberelinas, produzidas por várias espécies de rizobactérias como *Azospira* sp, e tem forte envolvimento na fisiologia da planta relacionada ao controle da divisão celular, alongamento de raízes e folhas, podendo ser relacionada com ao bom desenvolvimento do sistema radicular das plantas (GAO et al., 2022).

As interações planta-microrganismos são complexas e as vezes muito específicas, como no caso das simbioses em que há uma interdependência mútua entre os dois parceiros. Nesse sentido, estudos recentes têm apontado uma grande importância no IAA, ácido 4-cloro indol acético, na indução da nodulação em plantas de feijão, mostrando que esta substância produzida por rizobactérias, atua na formação da nodulação, estrutura conhecidamente fixadora de nitrogênio (SOUZA et al., 2015).

Sob certas condições de estresse, as plantas produzem etileno, que induz os sintomas de senescência, acentuando a deterioração da planta podendo levar inclusive a morte. Um mecanismo de ação relatado para rizobactérias envolve a produção e liberação da enzima ACC desaminase. Esta enzima é capaz de ligar ao precursor imediato do etileno, liberando amônia e α -cetobutirato (HONMA & SHIMOMURA, 1978), impedindo a síntese do etileno, e portanto, regulando os níveis dessa substância. Com isso, as plantas permanecem em condições vegetativas sendo um mecanismo importante de suporte promovido por rizobactérias (GAMALERO & GLICK 2015). Em estudo envolvendo a estimulação do crescimento de mudas de *Vallisneria natans* para recuperação de ambiente aquático, a inoculação de PGPR demonstrou ser uma técnica viável por garantir o melhor desenvolvimento das plantas pela liberação de AIA, sideróforos e atividade de ACC desaminase (LI et al., 2023), trazendo a possibilidade de uso de PGPR além do contexto agrícola.

Além dos fitormônios e antioxidantes protetores da fotossíntese, rizobactérias cianogênicas, capazes de produzirem Cianeto de Hidrogênio (HCN), tem se mostrado com bom potencial para o biocontrole, já que o Cianeto de Hidrogênio é tóxico para fitopatógenos, como demonstrado para cultura do girassol, em que espécies de *Pseudomonas* foram capazes de produzir e liberar quantidades significativas de HCN, inibindo o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* causador da podridão do caule (REETHA et al., 2014). Isso evidencia um dos mecanismos indiretos de ação das rizobactérias na promoção do crescimento das plantas juntamente com a própria competição que esses microrganismos benéficos exercem sobre outros microrganismos potencialmente prejudiciais (SHAH et al., 2021).

A colonização da rizosfera por rizobactérias, além do potencial de beneficiar as plantas em vários aspectos relacionados a disponibilidade de nutrientes, por mecanismos considerados diretos, e por antagonizar a sobrevivência e proliferação de patógenos, seja pela produção de substâncias antibióticas ou pela competição por

nutrientes, pode também de forma direta atuar na degradação de compostos tóxicos presente no solo, que teriam potencial para inibir de algum modo o crescimento vegetal (SINGHA et al., 2018).

A rizorremediação tem atraído muitos pesquisadores como uma estratégia promissora na degradação de poluentes em solos. O conhecimento acumulado de como as plantas recrutam suas rizobactérias, e a descoberta crescente de grupos microbianos capazes de metabolizar compostos tóxicos tem sido fundamentais na escolha do método a ser utilizado, que pode ser a adoção de plantas capazes de recrutar microrganismos com esta função ou mesmo a bioaugmentação com microrganismos específicos a esta finalidade (SEGURA & RAMOS 2013).

A remoção de nutrientes em ambientes aquáticos também tem sido visada com uso da manipulação de interações planta-microrganismo, uma vez que esses ambientes eutrofizados representam um sério problema (JIANG et al. 2019). Num estudo desse tipo, uma combinação de plantas e espécies microbianas de *Bacillus* sp. e *Microbacterium* sp. demonstrou ser eficientes em remover nitrogênio amoniacal e fósforo de reservatórios naturais de água eutrofizada acelerando o processo de reestabelecimento das condições naturais desse ambiente (LI et al. 2011).

Adicionalmente, estudos têm demonstrado atividades de degradação de compostos aromáticos por *Azospirillum*, em que este microrganismo pode utilizar benzoato, salicilato, gentisato e naftaleno como fontes de carbono para seu crescimento (POZDNYAKOVA et al., 2022). Associado a degradação de compostos poluentes ambientais está a capacidade desses microrganismos em lidar metabolicamente com poluentes derivados hidrocarbonetos de petróleo ou mesmo o óleo cru por meio da produção de biosurfactantes (ZHANG et al, 2021). Num estudo para avaliar a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em uma área contaminada por óleo diesel utilizando rizobactérias, demonstrou que os níveis de naftaleno, acenafteno, benzoantraceno e benzopireno reduziram acentuadamente após 120 dias após a inoculação de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*, com alta produção de biosurfactante, o que permitiu a metabolização desses compostos (SAMPAIO et al., 2019).

Adicionalmente, estudos tem mostrado a capacidade de microrganismos em lidar com concentrações altas de resíduos de pesticidas organoclorados, muitas vezes suportando o crescimento vegetal nessas circunstâncias e ou metabolizando ativamente esses compostos por cometabolismo (SHAHID et al., 2021). Esse contexto

evidencia a importância dos microrganismos rizosféricos do ponto de vista ambiental, não só suportando o crescimento vegetal (SUPREETH, 2022), o que pode ser pensando em termos de recuperação de áreas degradadas pela introdução de plantas em ambientes hostis, como também na descontaminação ativa de solos afetadas por contaminação, seja por pesticidas, petróleo ou outros.

REFERÊNCIAS

- ALKORTA, I. et al. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on Environmental Health*, v. 18, n. 1, 2003.
- ALMEIDA, E.; CASTRO, L.S. Avaliação do desastre de Brumadinho no desempenho econômico de Minas Gerais. *Nova Economia*, v. 33, n. 2, p. 1-23, abr./jun. 2023.
- ARRAGAIN, S. et al. Diversity and Functional Analysis of the FeMo-Cofactor Maturase NifB. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1947, 2017.
- BAKSHANDEH, E. et al. Evaluation of phosphate-solubilizing bacteria on the growth and grain yield of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in northern Iran. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, p. 1371-1382, 2015.
- BASTIDA, F. et al. Soil microbial diversity–biomass relationships are driven by soil carbon content across global biomes. *The ISME Journal*, v. 15, p. 2081-2091, 2021.
- BATISTA, B. D. et al. The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *Archives of Microbiology*, v. 203, p. 3869-3882, 2021.
- BATOOL, H.; IQBAL, A. Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 26, p. 1400-1410, 2019.
- BEHERA, B.C. et al. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 169-178, jun. 2017.
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, p. 1044-1051, 2012.
- BHADURI, D. et al. A review on effective soil health bio-indicators for ecosystem restoration and sustainability. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.

- CARMIGNANO, O.R. et al. Iron Ore Tailings: Characterization and Applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 32, n. 10, 2021.
- CARMO, F.F.; LANCHOTTI, A.O.; KAMINO, L.H.Y. Mining Waste Challenges: Environmental Risks of Gigatons of Mud, Dust and Sediment in Megadiverse Regions in Brazil. *Sustainability*, v. 12, p. 8466, 2020.
- CASTELLANOS, L. L. L. et al. Effect of the inoculation of nitrogen-fixing rhizobacteria in the sweet potato crop (*Ipomoea batatas* Lam.). *Horticulture International Journal*, v. 4, n. 1, p. 35-40, 2020.
- CBH-rio das Velhas. A Bacia do Velhas e as preocupações que a tragédia em Brumadinho levantou há cinco anos. Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio das Velhas, 2024. Disponível em: [https://cbhvelhas.org.br/novidades/a-bacia-do-velhas-e-as-preocupacoes-que-a-tragedia-em-brumadinho-levantou-ha-cinco-anos/#:~:text=Segundo%20a%20Copasa%20\(Companhia%20de,Horizonte%20e%2048%25%20da%20RMBH](https://cbhvelhas.org.br/novidades/a-bacia-do-velhas-e-as-preocupacoes-que-a-tragedia-em-brumadinho-levantou-ha-cinco-anos/#:~:text=Segundo%20a%20Copasa%20(Companhia%20de,Horizonte%20e%2048%25%20da%20RMBH). Acesso em: 25 jun. 2024.
- CBH-Paraopeba. Comitê da Bacia Hidrográfica do rio Paraopeba. Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Paraopeba, 2024. Disponível em: <https://cbhsaofrancisco.org.br/comites-de-afluentes/cbh-do-rio-paraopeba-sf3-minas-gerais/>. Acesso em: 17 jan. 2024.
- CHAUHAN, A. et al. Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 294-304, 2017.
- CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D.; SELVAKUMAR, G.; SUNDARAM, S. Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, v. 95, p. 38-53, 2015.
- CHEN, H. et al. Controls on soil arylsulfatase activity at a regional scale. *European Journal of Soil Biology*, v. 90, p. 9-14, jan./fev. 2019.
- CHU, B. C. et al. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host: A bird's eye view. *BioMetals*, v. 23, n. 4, p. 601-611, 2010.
- CIBAPAR. Consórcio intermunicipal da bacia hidrográfica do rio Paraopeba. *Espacios*, v. 32, n. 4, p. 25, 2011.
- CIMNE. Centro Internacional de Métodos Numéricos em Engenharia (UPC - Universidad Politécnica de Catalunya). Análise computacional da ruptura da Barragem

I na Mina do Córrego do Feijão, em Brumadinho. 2021. Disponível em: <https://www.conjur.com.br/uploads/2023/09>. Acesso em: 23 jan. 2024.

CLAYTON, J.; LEMANSKI, K.; BONKOWSKI, M. Shifts in soil microbial stoichiometry and metabolic quotient provide evidence for a critical tipping point at 1% soil organic carbon in an agricultural post-mining chronosequence. *Biology and Fertility of Soils*, v. 57, p. 435-446, 2021.

COSTA, T.V.O. Conheça Brumadinho Minas Gerais. Secretaria Municipal de Turismo e Cultura da Prefeitura Municipal de Brumadinho, 2015.

COUTO, F. R. et al. Physical, chemical and microbiological characterization of the soils contaminated by iron ore tailing mud after Fundão Dam disaster in Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 158, p. 103811, 2021.

DAS, S. et al. Soil microbial biomass carbon stock and its relation with climatic and other environmental factors in forest ecosystems: A review. *Science of the Total Environment*, v. 43, n. 6, p. 933-945, dez. 2023.

DAVIES, B.; COULTER, J. A.; PAGLIARI, P. H. Soil enzyme activity behavior after urea nitrogen application. *Plants (Basel)*, v. 11, n. 17, p. 2247, 2022.

DE SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.

DEBOSZ, K.; RASMUSSEN, P. H.; PEDERSEN, A. R. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. *Applied Soil Ecology*, v. 13, n. 3, p. 209-218, 1999.

DIXIT, M. et al. Changes in soil microbial diversity under present land degradation scenario. *Total Environment Advances*, v. 10, p. 200104, 2024.

DPMG. Aviso de pauta: Balanço de 3 anos do Acordo Judicial de Reparação – Brumadinho. Defensoria Pública de Minas Gerais, 2021. Disponível em: <https://defensoria.mg.def.br/aviso-de-pauta-balanco-de-3-anos-do-acordo-judicial-de-reparacao-brumadinho/>. Acesso em: 25 jan. 2024.

DPMG. Cinco anos após desastre de Brumadinho, indenizações extrajudiciais viabilizadas pela DPMG passam de R\$ 1,3 bilhão. Defensoria Pública de Minas Gerais, 2024. Disponível em: <https://defensoria.mg.def.br/cinco-anos-apos-desastre-de-brumadinho-indenizacoes-extrajudiciais-viabilizadas-pela-dpmg-passam-de-r-13-bilhao/>. Acesso em: 12 fev. 2024.

- FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Ameliorating Soil Acidity of Tropical Oxisols by Liming For Sustainable Crop Production. *Advances in Agronomy*, v. 99, p. 345-431, 2008.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World reference base for soil resources 2014: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Rome, Italy: FAO, 2015. 192 p.
- FENG, H. et al. Molecular mechanism of molybdenum storage and release in the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. *Nature Communications*, v. 12, p. 2380, 2021.
- FERNANDES, M. C. et al. Loss of soil (bio)diversity and its social cost: a case study on the collapse of tailing dam B1 in Brumadinho, Brazil. *Integrative Environmental Assessment and Management*, v. 16, n. 5, p. 666-677, 2020.
- FRANCO, D. V. et al. Estudo do comportamento térmico da lama do rompimento da Barragem de Brumadinho (MG) por calorimetria exploratória diferencial (DSC). *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 21, n. 21, p. 29-34, 2022.
- FRANCO, D. V.; COSTA, T. V. O.; RODRIGUES, M. S. Estudo do comportamento térmico da lama do rompimento da barragem de Brumadinho (MG). *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, v. 11, n. 2, p. 147-153, 2022.
- GASKIN, J. F. et al. Phosphate-solubilizing bacteria and their ability to increase phosphorus uptake and plant growth of *Allium ampeloprasum* (leek). *Applied Soil Ecology*, v. 184, p. 104663, 2022.
- HENG, G. J. et al. Temporal changes in the soil microbial community structure of restored wetland grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 168, p. 108648, 2022.
- HOEFEL, D. et al. Technology to assess the restoration of soil microbial health after natural attenuation of iron ore tailings. *Environmental Pollution*, v. 281, p. 116777, 2021.
- HOU, D. et al. Health risk assessment of heavy metals in soils and vegetables from wastewater irrigated area, Beijing-Tianjin-Hebei region, China. *Journal of Environmental Science (China)*, v. 89, p. 25-36, 2020.
- HUANG, L. et al. Soil microbial community and enzymatic activities under cadmium pollution: responses to straw incorporation and effects on plant growth. *Science of the Total Environment*, v. 794, p. 148646, 2021.

- JHA, P. N. et al. Rhizobacteria: a biological approach towards sustainable agriculture. *Green and Sustainable Chemistry*, v. 2, n. 4, p. 110-121, 2012.
- KAMPHAUS, L. M. et al. The chemical composition and environmental risk of Fe oxide-coprecipitated metals associated with iron ore tailings. *Environmental Pollution*, v. 274, p. 116537, 2021.
- KAZBERUK, M.; KOSIOR-KOZIK, A. Arylsulfatase activity in urban soils under different plant communities. *Plant Soil*, v. 432, p. 177-189, 2018.
- KUPFER, M. Evaluation of the Ecotoxicological impact of the Brumadinho Tailings Dam Rupture. PhD Thesis, Vienna University, 2021.
- LANCHOTTI, A. O. et al. Heavy metal and As contamination in a Brazilian water reservoir following the collapse of the Brumadinho tailings dam. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 32, p. 43918-43934, 2021.
- LIU, W. et al. Response of soil enzyme activity and microbial community composition in different altitudinal forest soils in the Qinling Mountains, China. *Microbial Ecology*, v. 72, p. 234-244, 2016.
- MARSCHNER, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3. ed. London, UK: Academic Press, 2012. 672 p.
- MAZUCHELI, J. et al. Assessment of total, bioavailable and labile contents of iron ore tailings contamination in an area impacted by a dam rupture. *Journal of Hazardous Materials*, v. 414, p. 125445, 2021.
- MENDES, P. E. M. et al. Impact of iron ore tailings on the bacterial community structure in an affected stream in Brumadinho, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 710, p. 136314, 2020.
- MIRANDA, L. M. et al. Ecological and molecular methods for tracking the impacts of pollutants in soil: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 11702-11719, 2020.
- MUKHERJEE, A.; TRIPATHI, B. R. Iron ore tailings: characterization and applications. *Environmental Pollution*, v. 252, p. 490-500, 2020.
- NASCIMENTO, E. F.; PEREIRA, D. S. S.; COSTA, A. B. Análise das perdas de metais em solos contaminados após a ruptura da barragem de Brumadinho. *Geoderma*, v. 343, p. 141-152, 2019.
- NAWAZ, A.; SHAHID, M.; MUNIR, I.; ALAM, S. Soil health indicators and crop productivity improvement using rhizobacterial inoculants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 22, p. 100-114, 2022.

- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for testing of chemicals: soil microorganism: nitrogen transformation test. Paris, France: OECD, 2000.
- OLIVEIRA, P. J. et al. Recovery of iron oxide and metals from tailings of the Feijão Dam in Brumadinho, Brazil. *Minerals*, v. 10, n. 6, p. 509, 2020.
- PERES, T. B.; DOS SANTOS, L. H.; FERNANDES, L. R. Análise das condições de transporte ferroviário no Brasil após o desastre de Brumadinho. *Revista Transportes*, v. 33, n. 2, p. 61-78, 2023.
- PEREIRA, A. P. A. et al. Iron ore tailings: characterisation and applications. *Minerals*, v. 10, n. 6, p. 509, 2020.
- PEREIRA, D. S. S. et al. Impactos ambientais do rompimento da barragem de rejeitos da Vale S.A. em Brumadinho, MG: uma análise espacial. *Boletim de Geografia*, v. 36, n. 1, p. 3-18, 2021.
- PEREIRA, M. G.; GIARETTA, A. et al. Análise espacial e temporal do desastre de Brumadinho. *Geociências*, v. 40, n. 3, p. 499-511, 2021.
- RAMOS, A. C. et al. Efeito do pH e do teor de matéria orgânica na absorção de metais pesados em solos impactados pelo rompimento da barragem de Brumadinho. *Científica*, v. 48, n. 3, p. 298-307, 2020.
- RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. *Plant and Soil*, v. 349, p. 31-40, 2011.
- ROCHA, E. S.; MARTINS, L. P. As implicações econômicas e sociais da tragédia de Brumadinho: uma abordagem regional. *Revista Brasileira de Economia Regional, Urbana e do Trabalho*, v. 8, n. 1, p. 29-51, 2020.
- RODRIGUES, M. S.; ANDRADE, R. M.; FERREIRA, L. C. Análise econômica das atividades turísticas em Brumadinho: antes e depois do desastre. *Turismo: Visão e Ação*, v. 21, n. 3, p. 412-431, 2022.
- RODRIGUES, M. S.; ANDRADE, R. M.; FERREIRA, L. C. Impacto econômico do rompimento da barragem de Brumadinho no setor agropecuário. *Revista de Economia Agrícola*, v. 65, n. 2, p. 151-171, 2023.
- SANTANA, E. A. et al. Effects of iron ore tailings on the distribution of heavy metals in soil and water bodies in Brumadinho, Minas Gerais. *Environmental Pollution*, v. 274, p. 116538, 2021.
- SANTOS, G. et al. Impact of iron ore tailings on the soil microbial diversity in Brumadinho, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 710, p. 136314, 2020.

- SANTOS, S. L. et al. Metagenomic analysis of microbial communities in soils contaminated by heavy metals in Brumadinho, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 718, p. 137381, 2020.
- SEEFELDT, L. C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, D. R. Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry*, v. 78, p. 701-722, 2009.
- SILVA, A. A. et al. Impact of iron ore tailings on microbial communities in the soils of Brumadinho, Brazil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 402, p. 123471, 2020.
- SILVA, C. F. et al. Diversity and functional potential of soil bacterial communities in response to iron ore tailings. *Science of the Total Environment*, v. 713, p. 136667, 2020.
- SILVA, G. S. et al. Impacto do desastre de Brumadinho no turismo da região: uma análise temporal. *Turismo e Sociedade*, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2021.
- SILVA, M. G. M. et al. Impacto do rompimento da barragem de rejeitos em Brumadinho na saúde pública: uma revisão sistemática. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 23, p. e200010, 2020.
- SILVA, P. R. et al. Changes in soil microbial diversity due to heavy metal contamination in Brumadinho, Brazil. *Environmental Pollution*, v. 264, p. 114726, 2020.
- SILVEIRA, M. P. et al. Ecotoxicological effects of iron ore tailings from Brumadinho dam rupture on freshwater ecosystems. *Environmental Pollution*, v. 260, p. 113931, 2020.
- SINGH, B. K. et al. Phosphate-solubilizing bacteria from subtropical soil and their effect on the growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology*, v. 135, p. 134-145, 2019.
- SNYDER, C. S. et al. Influence of soil pH on microbial community structure and function in soils. *Microbial Ecology*, v. 72, p. 710-721, 2016.
- SOBRAL, M. et al. Health risk assessment of heavy metals in vegetables grown in soils contaminated by iron ore tailings from Brumadinho dam collapse. *Science of the Total Environment*, v. 738, p. 139539, 2020.
- SOEPRAPTO, H. et al. Phosphate solubilizing bacteria isolated from a volcanic ash soil and their effects on the growth and P uptake of maize (*Zea mays* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, p. 1616-1623, 2008.
- SOUZA, J. R. et al. Avaliação da qualidade da água e do solo na região de Brumadinho após o rompimento da barragem de rejeitos. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2021.

- STEVENS, J. B. et al. Mining tailings and their potential impacts on the environment: A review. *Science of the Total Environment*, v. 838, p. 155637, 2022.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Projeto Maná. Disponível em: <https://www.ufmg.br/noticias/projeto-mana-analisa-dados-sobre-o-rompimento-da-barragem-da-vale-em-brumadinho-e-suas-consequencias-ambientais-e-sociais/>. Acesso em: 11 fev. 2024.
- VALE S. A. Monitoramento das águas do Rio Paraopeba. Vale S.A., 2023. Disponível em: <https://www.vale.com/monitoramento-das-aguas-do-rio-paraopeba>. Acesso em: 8 jan. 2024.
- VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 19, p. 703-707, 1987.
- VIDAL, M. S. et al. Impacts of mining and tailings dam accidents on the environment: A review. *Environmental Pollution*, v. 281, p. 116706, 2021.
- WANG, S. et al. Distribution and fractionation of heavy metals in soil contaminated by iron ore tailings. *Environmental Pollution*, v. 270, p. 116080, 2021.
- WATSON, R. T. et al. Soil microbial community and enzyme activity response to iron ore tailings in Brumadinho, Brazil. *Journal of Environmental Science (China)*, v. 111, p. 12-21, 2021.
- XAVIER, D. A. et al. Response of soil microbial biomass to the addition of organic matter in a contaminated area by iron ore tailings. *Science of the Total Environment*, v. 747, p. 141108, 2020.
- XIA, F. et al. Soil enzyme activities in response to heavy metal contamination and organic amendments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 139, p. 182-190, 2017.
- YAO, M. et al. Plant growth promoting rhizobacteria: mechanisms and applications in agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, v. 120, p. 1-15, 2016.
- ZHANG, F.; WANG, X.; WANG, H. Effects of iron ore tailings on the growth and yield of Chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.) in greenhouse conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 8, p. 8152-8159, 2019.
- ZHANG, L. et al. Soil microbial community and enzyme activities in response to iron ore tailings in Brumadinho, Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 758, p. 143766, 2021.

CAPÍTULO 2

INDICADORES MICROBIOLÓGICOS NO MONITORAMENTO DE SOLO AFETADO PELO REJEITO DE MINÉRIO

2.1 INTRODUÇÃO

O microbioma do solo desempenha papel crucial em toda a dinâmica dos ciclos biogeoquímicos no planeta, e seu reflexo está na manutenção da estrutura do solo, no fluxo de matéria e energia e, portanto, nas funções de suporte à vida. Nesse sentido, a aferição de parâmetros associados a composição e função da comunidade microbiana são bioindicadores da qualidade do solo e têm papel importante na verificação de sua integridade, uma vez que a existência de um solo saudável pressupõe, necessariamente, uma comunidade microbiana multifuncional.

Os principais bioindicadores usados na aferição das funções do solo estão associados a funções ecológicas da microbiota, como tamanho da comunidade microbiana, atividade metabólica e taxa de respiração, e até mesmo a diversidade microbiana. Em solos agrícolas tem sido produzido uma ampla gama de estudos envolvendo tais bioindicadores, uma vez que se trata de interesse econômico aferir e monitorar a saúde e a fertilidade desses solos (BHADURI et al., 2022). No entanto, existe uma carência de uso de bioindicadores no estudo de solos e ecossistemas naturais, já que envolve demandas específicas, principalmente de órgãos públicos e/ou empresas em projetos de recuperação ambiental (CHOIX et al., 2023; HOLLSTEIN et al. 2023). Com o rompimento da barragem B1 em Brumadinho, o rejeito de minério de ferro foi derramando por uma extensa área de preservação ambiental, afetando fortemente os ecossistemas dos solos e das águas locais. No âmbito do acordo firmado pela Vale S.A. com os órgãos públicos responsáveis, foi determinado a remoção do rejeito e a implementação de projetos de reabilitação ambiental das áreas afetadas, criando assim uma demanda por estudos de caracterização e monitoramento do solo afetado (DPMG, 2024).

Bioindicadores microbiológicos da saúde do solo, por serem associados a uma microbiota ativa, são dinâmicos e isso confere rapidez de resposta e sensibilidade às perturbações ambientais. Variações na composição da microbiota do solo podem ocorrer sazonalmente, em virtude das mudanças das condições ambientais, como umidade e temperatura, mas a diferenciação por longo prazo dessas condições, causadas por algum tipo de estresse ambiental como contaminação, pode provocar mudanças mais profundas na composição e diversidade dessa comunidade microbiana (SMITH, et al., 1997). Não obstante, existe uma

dificuldade latente em estabelecer parâmetros e associações verdadeiras entre a ocorrência de grupos microbianos e funções específicas na ciclagem de nutrientes, assim como na manutenção da estrutura do solo e no estabelecimento de técnicas no levantamento de genes funcionais (LIAO et al., 2023; NANNIPIERI et al. 2017).

Parâmetros como o tamanho da comunidade microbiana, medido por meio da quantificação do carbono da biomassa microbiana do solo, e a atividade metabólica, quantificada por meio de análises do perfil de atividade enzimática, são bons indicadores da funcionalidade do solo, visto que são justamente a medida da atividade microbiana na ciclagem de nutrientes (SCHLOTTER et al. 2018).

Embora seja desafiador caracterizar a diversidade microbiana do solo do ponto de vista apenas funcional, em virtude do caráter de redundância funcional dos grupos microbianos, a análise da ocorrência de grupos em ambientes específicos pode ser usada para inferir sobre a saúde do solo. Estudos tem mostrado uma maior eficiência da ciclagem de nutrientes no solo em consonância com uma maior diversidade microbiana, indicando relação positiva entre saúde do solo e microbiota mais diversa (ZHANG et al., 2023). O estudo da composição da microbiota do solo, em áreas de recuperação ambiental, tem sido direcionado a avaliar a estrutura da comunidade microbiana comparativamente a referências locais e em momentos sequenciais, com objetivos de monitorar as alterações da diversidade ao longo do tempo (PRADO et al, 2019). Adicionalmente, a ocorrência de alguns grupos pode ser relacionada a certas funções ecológicas específicas, fazendo da diversidade microbiana um tipo de bioindicador das funções ecológicas no solo.

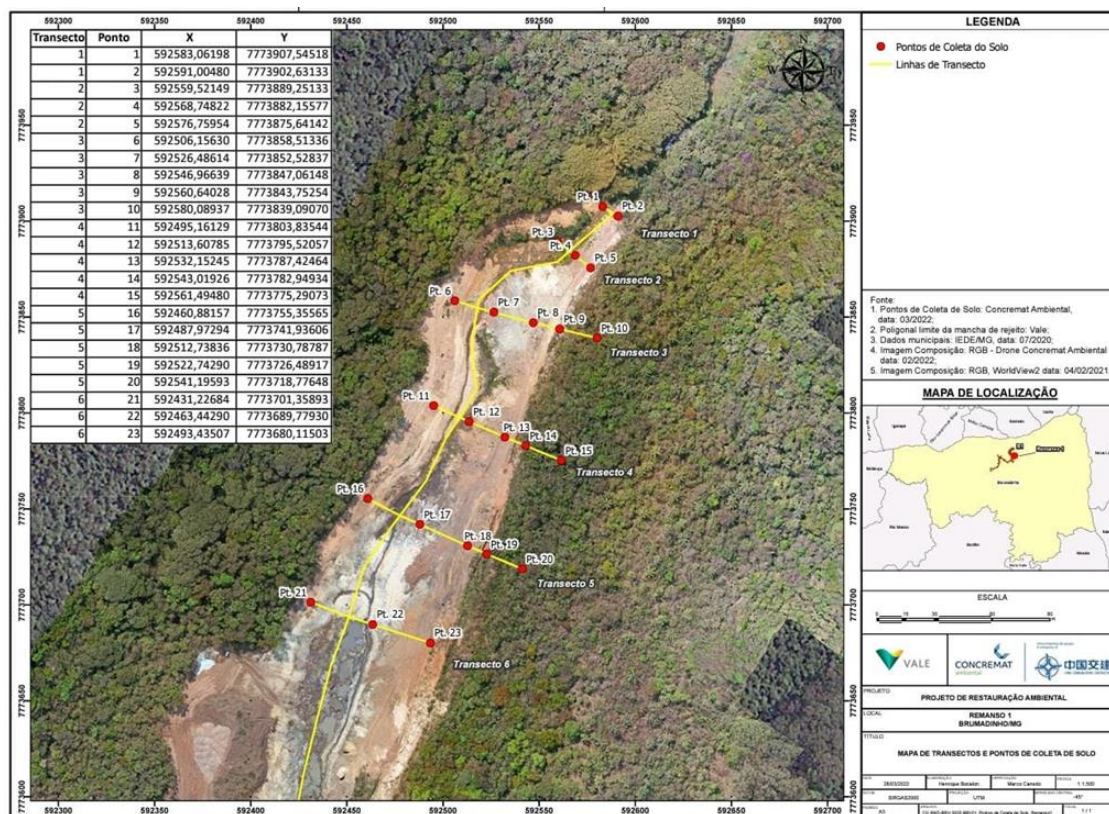
Assim, do ponto de vista da funcionalidade, o estudo dos bioindicadores microbiológicos é uma ferramenta poderosa para a averiguação e o monitoramento da saúde do solo ao longo do tempo. Assim, propomos a hipótese de que, a contaminação do solo por rejeitos de mineração de ferro altera a microbiota do mesmo, promovendo o favorecimento, tanto de grupos microbianos com atividade biológica sobre os contaminantes, como também grupos atuantes em funções ecológicas associadas à resiliência do ambiente, refletindo alterações específicas em bioindicadores microbiológicos do solo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Descrição da área de estudo e amostragem do solo

As amostras foram coletadas na região de Remanso 1B, afetada pelo rejeito de minério de ferro liberado no rompimento da barragem B1 da Mina Corrêgo do Feijão em Brumadinho, MG. Em cada ponto de amostragem, foram escavadas 4 covas na profundidade de 0-20 cm, e o solo foi misturado para obtenção de uma amostra composta. As amostras de solo foram peneiradas em peneiras de 2 mm e armazenadas em sacos plásticos, sendo as amostras destinadas às análises biológicas, transportadas em caixas térmicas contendo gelo e armazenadas sob refrigeração a 10 °C. O delineamento da amostragem ocorreu em dois grupos: área afetada, composto por 15 amostras da área efetivamente afetada pelo derramamento de rejeito, cuja cobertura vegetal foi suprimida, com solo majoritariamente franco-argilo-arenosa e pH médio em torno de 5,8; grupo referência, composto por 6 pontos amostrados em área de mata, não afetada pelo rejeito, com com pH médio próximo a 5, e solo argilo-arenoso e argiloso adjacente ao grupo área afetada, servindo assim como uma referência local.

Figura 1 - Pontos amostrados na área Remanso 1B, Brumadinho – MG, com suas respectivas coordenadas geográficas.



2.2.2 Respiração basal microbiana

A Respiração basal microbiana do solo (RBM) foi determinada a partir do método proposto por Jenkinson & Powlson (1976) e Alef & Nannipieri (1995), em que 100 g de solo de cada amostra foi colocado em um recipiente com vedação hermética. Um pequeno recipiente contendo 25 mL de NaOH 1M foi adicionado dentro do recipiente que contém o solo para reagir com o CO₂ evoluído na respiração, e o conjunto incubado no escuro à temperatura ambiente por 15 dias. Depois da etapa da incubação, foi procedido a titulação do NaOH remanescente utilizando-se HCl 0,25 M. Para tanto, duas alíquotas de 5,0 mL de NaOH foram retiradas do recipiente, transferidas para frascos *Erlenmeyers* de 125 mL, e adicionado 5,0 mL da solução de BaCl (0,5 M). Três gotas de fenolftaleína 1 % foram utilizadas como indicador na titulação. Cada amostra foi analisada em triplicatas técnicas, e o volume de HCL 0,25 M gastos na titulação, inseridos na seguinte equação:

$$mg \text{ de } CO_2 = \frac{(VB - VA) \times 22 \times C \times fc \times FA \times SW}{dwt \times t}$$

Sendo:

SW é o peso seco do solo em gramas (100 g de solo)

- t é o tempo de incubação em horas
- VB é o volume, em mL, de ácido clorídrico gasto na titulação da solução controle (branco);
- VA é o volume, em mL, de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra;
- 22 é equivalente-grama do CO₂. 22 é a metade do peso molecular de CO₂ (peso molecular = 44). Isso porque são necessários dois mols de NaOH (1M) na captura de uma molécula de CO₂
- dwt é o peso seco de 1 g de amostra de solo úmido

Desse modo, os resultados foram expressos como uma taxa de respiração (mg de C-CO₂*Kg de solo⁻¹*h⁻¹)

2.2.3 Quantificação do carbono da biomassa microbiana (CBM)

As análises para CBM foram feitas conforme Tedesco (1995). Assim, três réplicas de 10 g de cada amostra de solo foram transferidas cada uma para uma placa de Petri, e irradiadas por micro-ondas, e mais 10 g de solo de cada amostra, acondicionado em frasco Erlenmeyer de 125 mL e mantidos em refrigeração, por 24 h. Na etapa da irradiação das amostras contidas nas placas de Petri, a potência do micro-ondas foi devidamente aferida utilizando-se 1000 g de água de acordo com a equação:

$$P = Cp.K.\Delta T.m/t$$

Em que:

- ΔT é a temperatura final menos temperatura inicial (°C), variação da temperatura de 1000 g de água, em 2 minutos de exposição;
- P é a potência real do equipamento, em W;
- K é 4,184, fator de correção de cal J mL⁻¹ °K⁻¹ para watts (J s⁻¹);
- m equivale à massa de 1000 g de água;
- t é o tempo de 120 s de exposição da água no micro-ondas;
- Cp é 1 J m⁻¹ °K⁻¹, capacidade da água de receber calor.

Assim, foi possível calcular o tempo de irradiação de acordo com a equação:

$$t = r.m/P$$

Em que:

- t é o tempo de exposição das amostras ao micro-ondas;
- P é a potência real do aparelho, em W;
- r é 800 J.g^{-1} de solo, quantidade de energia necessária para a exposição;
- m é o peso total das amostras a serem irradiadas, em g.

Após a irradiação, o solo seguiu para a etapa da extração, onde então foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, e adicionado de 40 mL de solução extratora (K_2SO_4 0,5 M, com pH ajustado para entre 6,5 – 6,8) em cada amostra (irradiados e não irradiados). O 'branco' foi constituído apenas da solução extratora acondicionada em um Erlenmeyer. Em seguida, todas as amostras foram agitadas por 30 min a 120 rpm e, após a agitação, os frascos contendo cada amostra foram deixados em descanso por mais 30 minutos, para a total sedimentação, sendo filtrados em papel filtro de filtração lenta na etapa seguinte. Em 5 mL do extrato filtrado foi adicionado 1 mL de solução de dicromato de potássio ($0,066 \text{ mol.L}^{-1}$), 5 mL de ácido sulfúrico 98% e 25 mL de água destilada, seguido pela titulação com sulfato ferroso amoniacal ($0,03 \text{ mol.L}^{-1}$), usando uma solução de Ferroin (fenantrolina $14,85 \text{ g/L}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $12,71 \text{ g/L}$) como indicador.

Os valores de CBM em mg de C*Kg de solo⁻¹ foram obtidos submentendo os volumes de sulfato ferroso amoniacal utilizados na titulação das amostras na equação:

$$C_{I,NI} = \frac{(Vb - Vam)(\text{molaridade do sulfato ferroso})(3)(1000)(\text{volume extrator})}{(* \text{ volume do extrato})(\text{massa seca do solo})}$$

Onde:

- Vb = volume do branco (mL)
- Vam = volume da amostra (mL)
- 3 = resultado da relação entre o número de mols de Cr_2O_7 que reagem com o Fe^{2+} (1/6), multiplicado pelo número de mols do Cr_2O_7 que reagem com C^0 (3/2), multiplicado pelo peso equivalente do C (12);
- 1000 = Fator de conversão de unidades

*volume do extrato (amostra filtrada) para a determinação do carbono (mL)

Onde:

- C_I = amostra irradiada
- C_{NI} = amostra não irradiada
- $K_c = 0,33$ para método de irradiação extração de CBMS

2.2.4 Análises enzimática do solo

2.2.4.1 Fosfatases

Para as fosfatases, triplicatas de 1,0 g de solo de cada amostra foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL, juntamente com um tubo adicional para cada amostra denominado controle, e um tubo sem o solo, denominado branco. Estes foram incluídos no experimento com o objetivo de obter os valores no tempo inicial da reação e o valor das absorbâncias referentes às soluções utilizadas. Foi utilizada a solução tampão universal modificada (MUB), à base de Tris hidroximetil aminometano, com pH ajustado para 6,5 e 11 para as fosfatases ácida e alcalina, respectivamente. Tolueno e uma solução contendo um análogo ao substrato das enzimas, p-nitrofenil fosfato a 0,115 M, foi adicionada a cada amostra antes da incubação, exceto nos tubos controle, onde esta solução foi adicionada apenas após a incubação e adição dos inibidores enzimáticos, para representar o “tempo zero” da reação avaliada. Assim, na ocorrência da reação, as fosfatases hidrolisam o p-nitrofenil fosfato, liberando o fosfato e o p-nitrofenol, que foi quantificado por curva de calibração. Todas as demais etapas seguiram os protocolos estabelecidos por Eivazi & Tabatabai (1977).

2.2.4.2 β -glicosidase

Para a β -glicosidase, as amostras foram preparadas de maneira semelhante às fosfatases, com triplicatas de 1,0 g de solo transferidas para tubos Falcon de 15 mL, e um tubo adicional para cada amostra como controle, além de um tubo branco sem solo. A reação foi tamponada com a solução tampão universal modificada (MUB) com pH ajustado para 6. Foi utilizado o p-nitrofenil- β -d-glicopiranoside em solução a 0,025 M como análogo ao substrato da β -glicosidase, para que o produto p-nitrofenol fosse liberado da reação de clivagem pela enzima. Adicionalmente, tolueno foi adicionada a cada amostra antes da incubação. Assim como para as fosfatases, nos tubos controle, a solução de p-nitrofenil- β -d-glicopiranoside foi adicionada após a

incubação e adição dos inibidores enzimáticos. Todas estas etapas e as adicionais seguiram os protocolos estabelecidos por Eivazi & Tabatabai (1988).

2.2.4.3 Arilsulfatase

Na análise da atividade da arilsulfatase no solo, as triplicatas de 1,0 g de solo de cada amostra foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL. Um tubo controle para cada amostra e um branco também fizeram parte do experimento à semelhança das análises das enzimas anteriormente mencionadas. Foi utilizada a solução tampão acetato, com pH ajustado para 5,8. Após adição de tolueno, foi utilizado o substrato sulfato de p-nitrofenil 0,005 M que, de forma semelhante aos substratos das outras enzimas, quando submetido a ação enzimática da arilsulfatase é hidrolisado liberando o p-nitrofenol. Este substrato também foi adicionado a cada amostra antes da incubação, e após a incubação nos tubos controle, depois de também ter sido adicionados os inibidores enzimáticos. Estas etapas e as seguintes seguiram o protocolo estabelecido por Tabatabai & Bremner (1970).

2.2.4.4 Curva padrão

Uma curva padrão para todas as enzimas avaliadas por meio da utilização de substrato combinado com nitrofenil, foi obtida a partir de diluições em que, quantidades conhecidas de p-nitrofenol, composto liberado após a atuação de cada enzima, foram adicionadas em tubos Falcons de 15 mL e submetidas as mesmas condições a que foram submetidas os tubos com as amostras, controles e o branco, inclusive a medição da absorbância nos mesmos comprimentos de ondas utilizados para medir as amostras, que seguiram os protocolos estabelecidos para cada enzima. Com a curva padrão, foi feita uma regressão linear com pelo menos 98 de coeficiente de determinação, e a equação da regressão utilizada para a conversão das medias das amostras em μg de p-Nitrofenol/g de solo⁻¹h⁻¹.

2.2.4.5 Urease

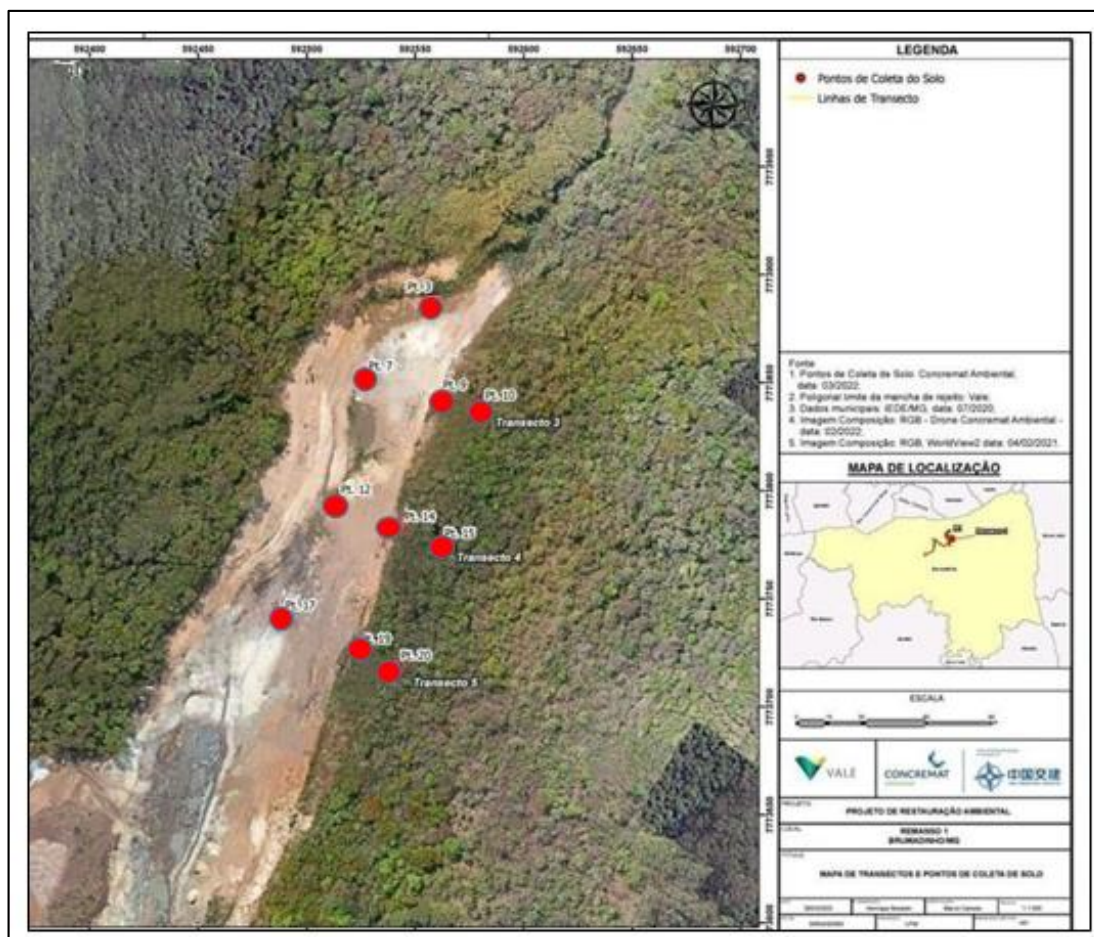
O ensaio para urease seguiu o proposto por Kandeler & Gerber (1988). Para tanto, foi utilizada uma porção de 5,0 g de solo (previamente peneirado e refrigerado) acondicionados em frascos Erlenmeyers de 125 mL, em triplicata com um controle para cada amostra e um branco, sem o solo. Uma solução de ureia em água a 0,08

M foi utilizada como substrato, já que a urease hidrolisa a ureia liberando CO₂ e NH₃. Após o tempo de 2 horas de incubação, a amônia liberada pela ação enzimática da urease foi medida por espectrofotometria ao comprimento de onda de 690 nm. Uma curva padrão foi obtida utilizando solução de amônio, onde quantidades conhecidas de amônia foram adicionadas em tubos Falcon de 50 mL, submetidos às mesmas condições dos tubos das amostras, aferidas em espectrofotômetro a 690 nm, e os resultados expressos em $\mu\text{g de N-NH}_4^+\text{g de solo}^{-1}\text{h}^{-1}$.

2.2.5 Diversidade microbiana do solo

Para a caracterização da diversidade microbiana do solo, 10 pontos representativos dos dois grupos estudados (Área Afetada e Referência) foram amostrados para a finalidade de extração do DNA total do solo sendo, quatro das amostras compostas (Pt3, Pt7, Pt12 e Pt17) referentes ao grupo Área afetada e seis (Pt9, Pt10, Pt14, Pt15, Pt19 e Pt20) representativas do grupo Referência, como mostra a figura 2.

Figura 2 - Pontos amostrados na área Remanso 1B, Brumadinho – MG, para análise de diversidade microbiana.



Fonte: CONCREMAT Ambiental (2022).

Cerca de 200 g de solo coletados foram armazenados em sacos plásticos do tipo ziplock, e mantidos em congelamento até o momento das nas análises. Para a análise da diversidade microbiana, foi extraído o DNA das amostras de solo pelo kit *DNAeasy Power soil pro* da Qiagen seguindo o protocolo do fabricante, associado a uma lise enzimática. Para tal, foi adicionado às amostras de solo, 100 μ l de lisozima (100 mg.mL^{-1}), seguido por incubação por 30 minutos a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Depois disso, foi adicionado 50 μ L de proteinase K (10 mg.mL^{-1}), 200 μ L de Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e as amostras incubadas, por 60 minutos a 56°C . Posteriormente à etapa de lise, foram seguidos todos os passos estabelecidos no protocolo do kit de extração *DNAeasy Power soil pro*. O DNA foi então enviado para o sequenciamento parcial do gene marcador molecular taxonômico 16S rRNA, regiões V3 e V4.

De posse dos dados do sequenciamento, os arquivos *clean data* recebidos foram submetidos ao pacote Dada2 para a obtenção das tabelas de abundância das ASVs e taxonomia. Para tanto, os arquivos *fastq.gz* foram plotados em gráficos individuais de qualidade para a verificação visual da qualidade do sequenciamento. A

partir dessa análise preliminar, foi possível estabelecer um intervalo de máxima qualidade das sequências sendo então filtradas para tamanhos entre 200 e 405 pares de bases. Posteriormente à filtragem, foi utilizado *machine learning* do pacote Dada2 para prever a taxa de erro e gerar o modelo a ser aplicado para filtragem final do *dataset*. Após a filtragem a partir do modelo estatístico da taxa de erro obtido e a remoção das quimeras, foi obtido a tabela de abundância das sequências e a tabela do alinhamento taxonômico utilizando a versão 138.1 do banco de dados Silva. De posse das tabelas de sequências, abundância e taxonomia, foi utilizado o pacote *mctoolsr*, para as filtragens de remoção de sequências de DNA mitocondrial, plastídico e de eucariotos e as sequências foram novamente filtradas para abundâncias superiores a 100. Após esta etapa de filtragem das sequências de baixa abundância, foi feita a rarefação para a menor abundância e calculado os índices de diversidade, a matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e os sumários taxonômicos.

2.2.6 Análise Estatística

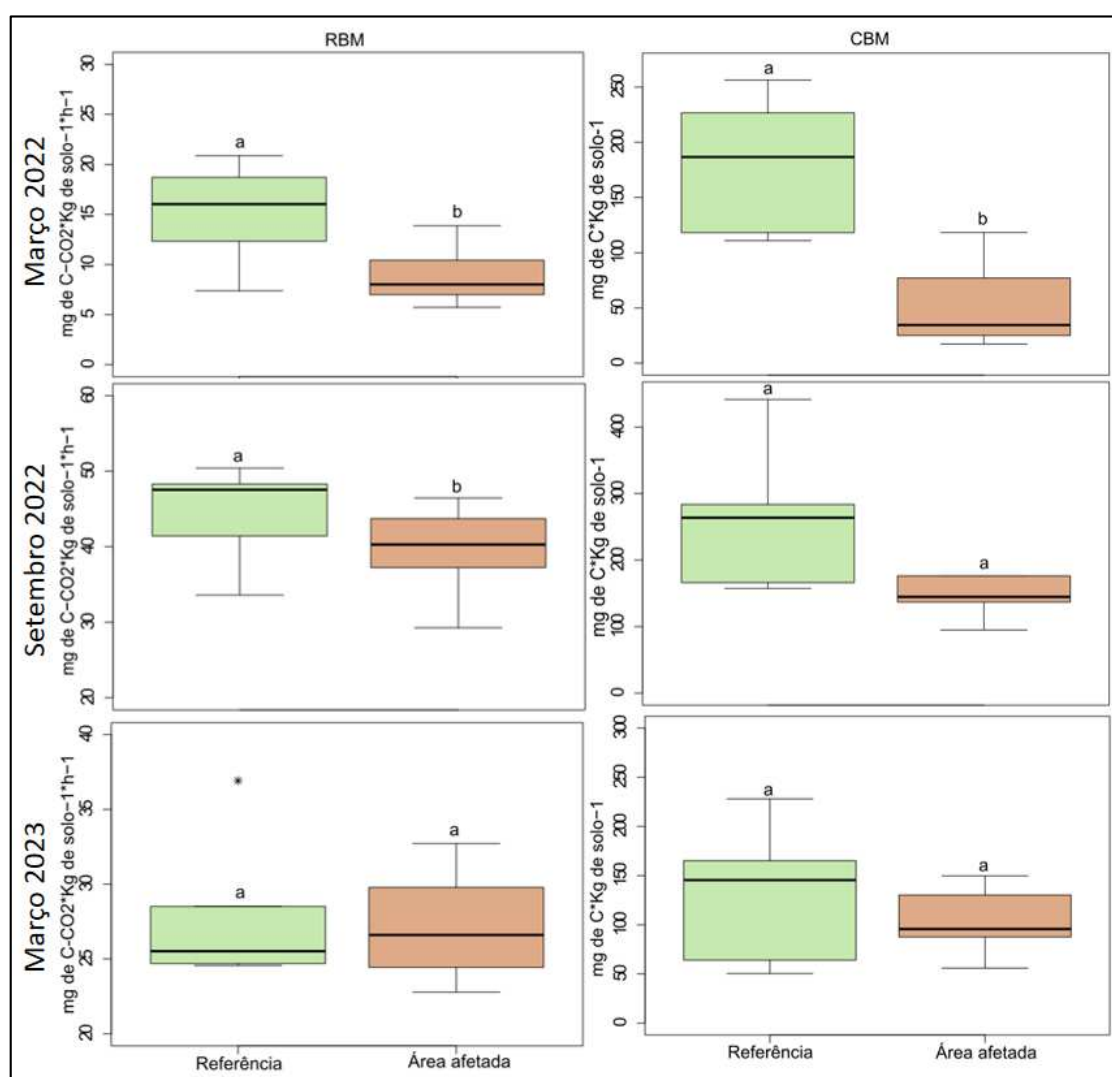
As análises dos bioindicadores foram feitas comparando a área afetada com a referência local para cada coleta e também ao longo do tempo das três coletas. Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK, 1965) para a verificação da normalidade dos resíduos, requisito para a análise de variância de médias. Como este teste acusou não atendimento ao modelo de distribuição normal, os dados das análises foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis (KRUSKAL & WALLIS, 1952) a 5% de significância com teste *post-hoc* de Fisher (FISHER, 1935) a 5%, para a discriminação das medianas, sempre que o Kruskal Wallis apontava alguma diferença estatística. Estes testes foram feitos utilizando o pacote *Agricolae* dentro do R *statistical software*, versão 4.3.2. Para a análise de diversidade microbiana, além do teste de Kruskal Wallis, foi feita uma análise de NMDS e PERMANOVA a 5% de significância, utilizando o pacote *Vegan* e *PairwiseAdonis2* também do programa R.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Respiração basal microbiana (RBM), carbono da biomassa microbiana (CBM) e qCO₂

As análises da RBM e CBM apresentaram variações significativas entre os grupos referência e área afetada em quase todas as coletas e quando comparadas as três coletas ao longo do tempo. Em março de 2022 foi possível perceber uma diferença em que o grupo área afetada apresentou menores valores nas taxas de respiração microbiana e carbono da biomassa como mostra a figura 3. Nas coletas seguintes foi encontrado um padrão de atenuação das diferenças entre os dois grupos, com a coleta de março de 2023 apresentando similaridade estatística entre os grupos tanto para RBM quanto para CBM.

Figura 3 – Respiração basal e Carbono da biomassa microbiana do solo em Remanso 1B na região de Brumadinho, MG. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal Wallis e Fisher a 5 % de significância.



Os nossos resultados demonstraram uma uniformização crescente entre os grupos Referência e Área afetada, para a RBM e o CBM, ao longo do tempo avaliado. A revegetação da área afetada, que ocorreu de forma natural ao longo do tempo de um ano após a primeira coleta (Figura 4), pode ter sido um fator importante na diminuição gradativa das diferenças entre os grupos estudados, uma vez que a cobertura vegetal implica em um maior aporte de material orgânico no solo, que pode ser utilizado pela comunidade microbiana residente como fonte de carbono e energia (LANGE, et al. 2015).

Figura 4 – Progressão da vegetação entre março de 2022 e março de 2023 na área afetada pelo rejeito de mineração no Remanso 1B, em Brumadinho, Minas Gerais. a) Remanso 1B em março de 2022; b) Remanso 1B em março de 2023; c) ponto de coleta em março de 2022; d) ponto de coleta em março de 2023.



Fonte: CONCREMAT Ambiental (2022); Vale S/A 2023; Google Earth 2023

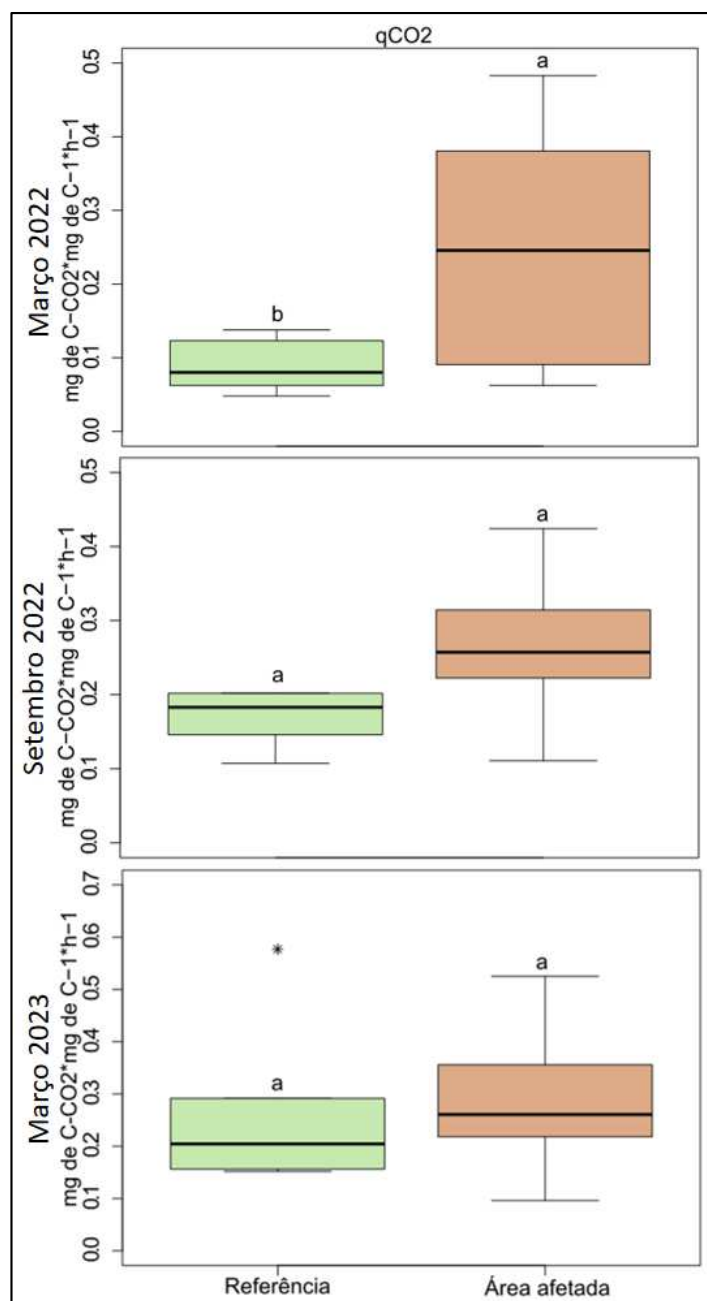
A cobertura vegetal do solo está diretamente relacionada à maior estabilidade das condições de temperatura e umidade, o que, também, pode ter favorecido o aumento do tamanho da comunidade microbiana no grupo Área afetada, aproximando-se das condições do grupo tomado como Referência. Estudos anteriores têm demonstrado haver, de fato, essa estreita correlação entre a comunidade microbiana, em termos de tamanho e estabilidade, com a abundância de cobertura vegetal no solo, de áreas de mineração de ferro em recuperação ambiental (SOUZA, et al. 2020).

Taxas de respiração microbiana do solo mais elevadas são esperadas em ambientes com uma ampla comunidade microbiana ativa ou em situações de estresse, que demandam maior esforço energético da microbiota do solo (ALSTER, et al. 2023). Além do que pode ser visto pelas comparações entre os grupos em cada coleta separadamente, nossos resultados indicam um aumento substancial do CBM entre as coletas de março e setembro de 2022, acompanhada por um incremento das taxas de respiração, o que não foi observado na coleta de março de 2023, apesar de também se tratar de estação chuvosa. O início do ano de 2022 foi marcado por um grande volume de chuvas na região (INMET, 2022), o que pode ter favorecido uma aceleração da recomposição vegetal e da comunidade microbiana em ambos os grupos nos meses que se seguiram, sendo uma hipótese plausível para os valores absolutos observados em setembro de 2022. Em março de 2023, no entanto, valores menores podem estar relacionados a maior estabilidade e interações ecológicas da microbiota, associadas a alterações sazonais, uma vez que indicadores microbiológicos são altamente sensíveis a mudanças sazonais como já relatado (SINGH, et al. 2020; STEINBERGER, et al. 2022).

Para análise de taxa de respiração, em função do tamanho da comunidade microbiana, uma métrica importante é o quociente metabólico (qCO_2). Este índice se refere a taxa de respiração por unidade de biomassa microbiana e tem sido explorado em muitos estudos como um indicador da atividade metabólica da microbiota do solo, uma vez que, de forma indireta, mede a eficiência de fixação de carbono pela microbiota em relação à sua perda para a atmosfera (HARTMAN & RICHARDSON, 2013). Nossos resultados indicam um comportamento semelhante ao comportamento da RBM, em que valores estatisticamente diferentes entre os grupos foram

encontrados apenas na coleta de março de 2022, seguidos por uma equiparação nas coletas subsequentes.

Figura 5 – Quociente metabólico (qCO_2) de amostras coletadas em Remanso 1B, na região de Brumadinho, MG. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal Wallis e Fisher, a 5 % de significância.

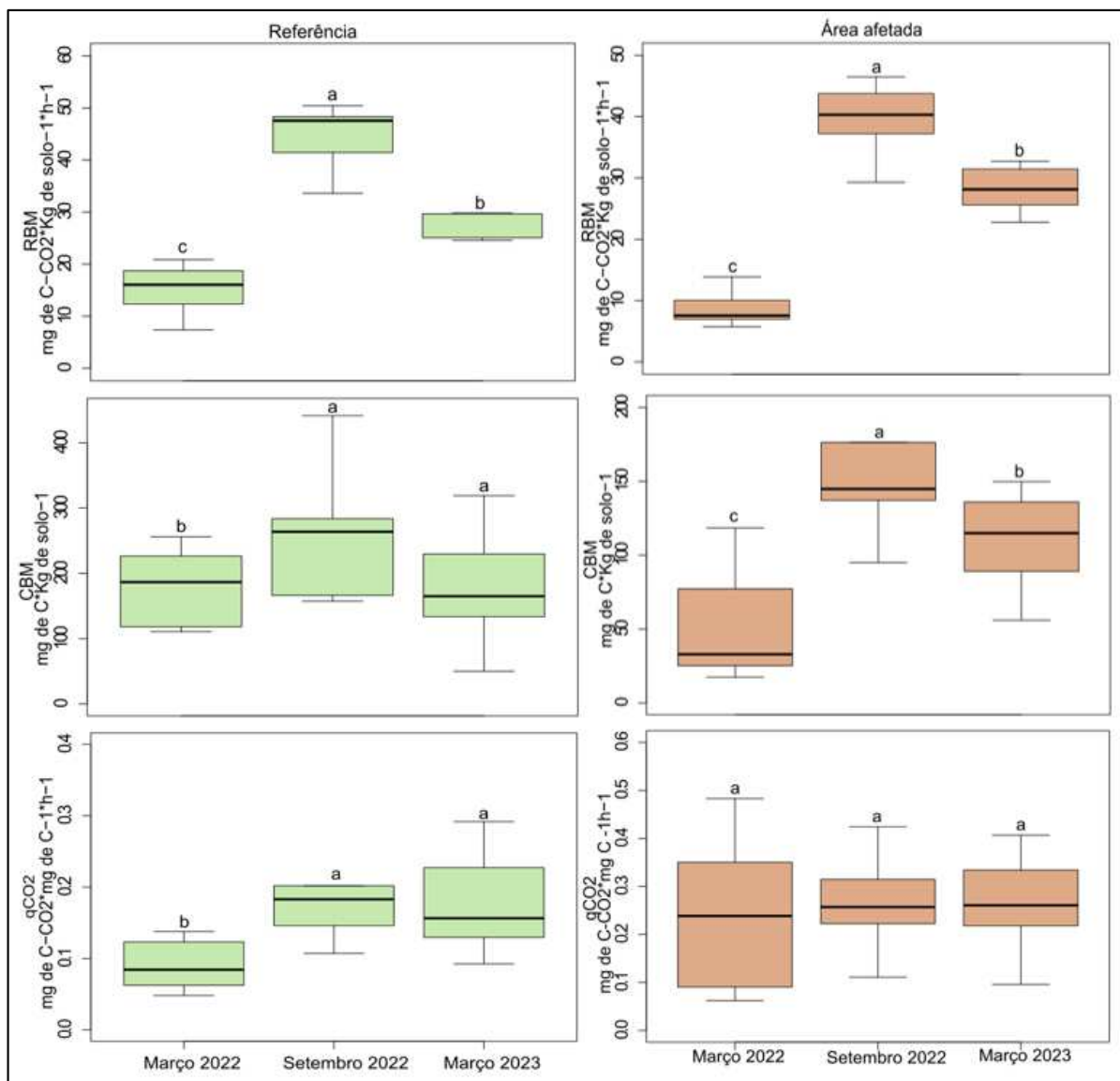


Valores mais altos de qCO_2 têm sido relacionados a condições de estresse ambiental, embora a interpretação desse parâmetro exija cuidado, pois uma maior

atividade metabólica pode também estar relacionada a outros fatores, como entrada e natureza química do material orgânico no solo, outros nutrientes e interações ecológicas (SPOHN, 2015; FENG, et al. 2021). No entanto, em março de 2022 esses valores foram estatisticamente maiores no grupo área afetada e podem ser reflexo de um estresse ambiental nesse grupo, já que nessa época, a área se encontrava com baixa cobertura vegetal. Ao longo das coletas, nossos resultados mostram uma redução dos valores de qCO_2 no grupo área afetada, indicando a uma crescente estabilidade da comunidade microbiana nessa área do ponto de vista metabólico.

Comparando cada grupo entre si ao longo das coletas, foi possível perceber flutuações sazonais (Figura 6). Bioindicadores microbiológicos são naturalmente sensíveis a quaisquer alterações no ambiente, inclusive as transições de estação seca/chuvosa. Assim, torna-se importante, em monitoramento por bioindicadores, a consideração das perturbações naturais ao longo do tempo (BHADURI, et al. 2022).

Figura 6 – Comparações dos valores obtidos para bioindicadores, RBM (respiração basal microbiana), CBM (carbono da biomassa microbiana) e qCO_2 (quociente metabólico), avaliados nas três coletas realizadas em áreas em Remanso 1B na região de Brumadinho, MG. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal Wallis e Fisher a 5 % de significância.



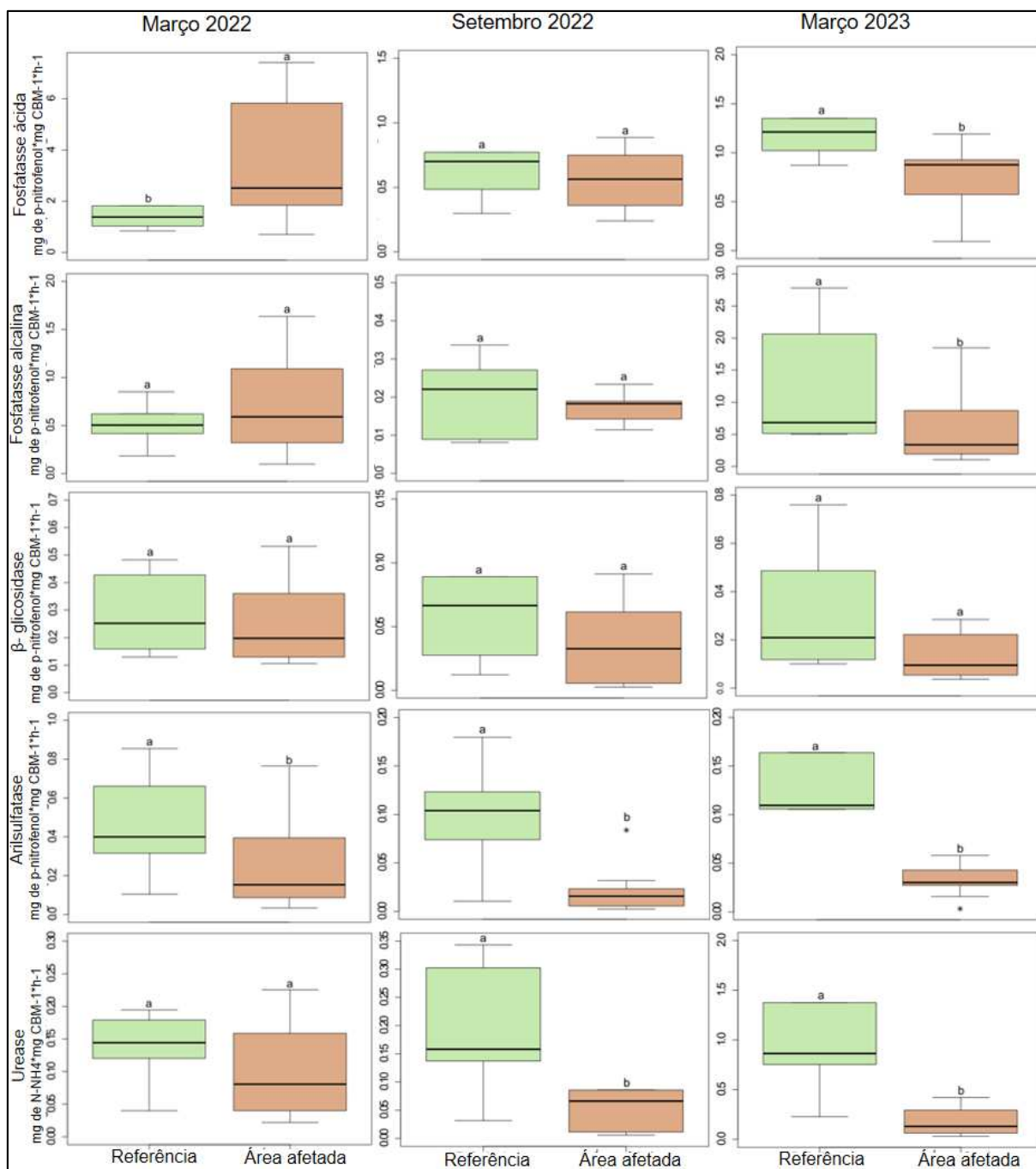
A RBM ao longo das três coletas foi o que mais apresentou flutuações em entre as amostras. Taxa de respiração é um fator sabidamente muito variável por se tratar do reflexo imediato da atividade metabólica da microbiota do solo (YE, et al. 2024). Variações mais acentuadas já foram reladas em outros estudos envolvendo o monitoramento de bioindicadores, tendo como resultados um incremento natural em condições de temperaturas mais elevadas e baixa umidade, característico do mês de setembro, em que devido a baixa disponibilidade de água, há uma diminuição de nutrientes biodisponíveis no solo levando os microrganismos demandarem mais energia para produzir compostos secundários e de proteção, consequentemente alocando mais Carbono para a respiração (LI, et al. 2017). O qCO₂, no entanto, manteve uma estabilidade no grupo AA (Área Afetada) ao longo das três coletas,

mesmo o grupo RF (Referência) tendo apresentado variações no sentido de um incremento crescente ao longo das coletas, o que pode ter mascarado uma possível melhora do grupo Área afetada, se consideramos como uma tendência natural de aumento do qCO_2 ao longo do tempo como o que foi observado no grupo Referência.

2.3.2 Análise enzimática do solo

A atividade potencial enzimática do solo para as enzimas estudadas, em valores absolutos, apresentou diferenças importantes entre as duas áreas estudadas (Tabelas S1, S2 e S3). Para os valores expressos com base em CBM, o perfil enzimático do solo revelou diferenças estatísticas entre as áreas afetadas e referência (Figura 7).

Figura 7 – Atividade enzimática potencial do solo, expressos por unidade de biomassa microbiana, para amostras coletadas em Remanso 1B, na região de Brumadinho, MG. Letras diferentes representam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal Wallis e Fisher a 5 % de significância.



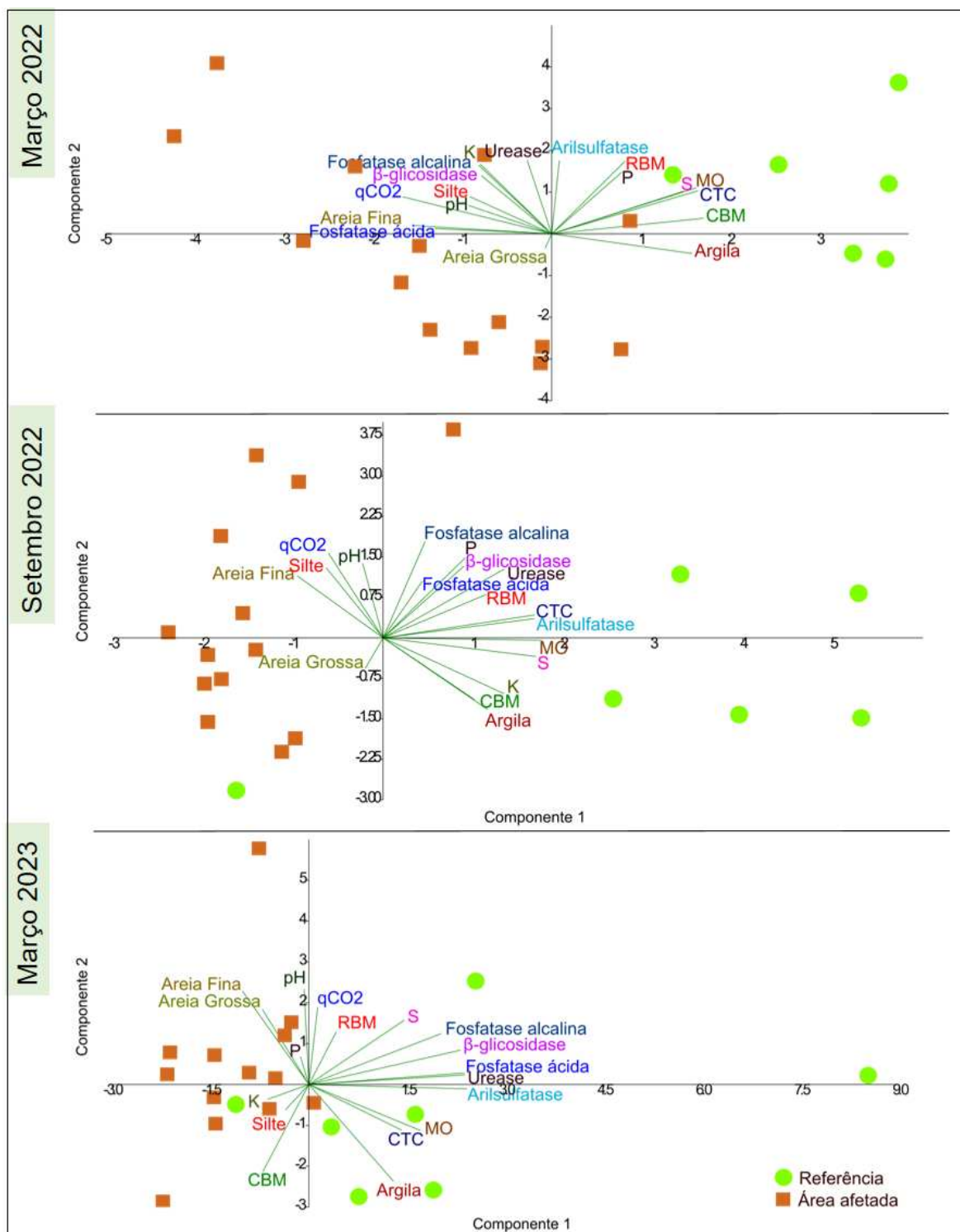
Na coleta de Março de 2022, a fosfatase ácida foi a única a apresentar maior atividade na área afetada. Todas as demais enzimas avaliadas apresentaram maior atividade no grupo referência ou não diferiram estatisticamente, como o caso da arilsulfatase (Figura 7). A Arilsulfatase é uma enzima de alta sensibilidade a variações das condições ambientais, como temperatura e umidade, e sua maior atividade tem sido observado em ambientes cujas condições são mais estáveis (LI & SARAH, 2003; KUNITO et al. 2022; RODRIGUES, et al. 2022). O grupo referência, caracterizado por ampla cobertura vegetal, proporciona uma maior estabilidade de temperatura e

manutenção da umidade do solo, além de maior entrada de material orgânico no solo, esse fato está relacionado a maior atividade nessa área, que foi inclusive, um padrão observado em todas as três coletas.

A urease manteve-se, em março de 2022, sem diferenças estatísticas entre os grupos, mas a partir da coleta de setembro de 2022, seguiu o padrão observado para a arilsulfatase, de maior atividade no grupo referência. Esses resultados corroboram com estudos anteriores que apontam a urease como sendo uma enzima sensível às condições ambientais e fortemente relacionada aos teores de Carbono orgânico e presença de substrato, isto é, compostos nitrogenados de ureia (KUMARI et al. 2020) Nesse sentido, a área afetada é mais pobre desses compostos, oriundos principalmente da entrada de material orgânico no solo, proporcionando menor nível de atividade desta enzima nesse grupo. Adicionalmente, foi possível observar que, apesar de um incremento da atividade da urease a partir de setembro de 2022, a β -glicosidase, enzima conhecida por ser bem relacionada a atividade da urease, não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos em nenhuma coleta. A β -glicosidase, além de ser influenciada pelos níveis de nitrogênio do solo, é, também, correlacionada com a disponibilidade de fósforo e, portanto, às fosfatases, e com a composição da comunidade microbiana (LIU et al., 2022; MARGALEF et al., 2017), o que pode explicar seu comportamento parecido ao observado para as fosfatases.

A análise multivariada de indicadores físico-químicos do solo, das mesmas amostras utilizadas para as análises microbiológicas, integrada aos indicadores microbiológicos, mostraram um padrão de correlação entre níveis de fósforo, enxofre, e todas as enzimas estudadas, além de uma relação dessas com a capacidade de troca catiônica total (CTC), teor de argila e matéria orgânica do solo (Figura 8).

Figura 8 – Análise de principal componente (PCA) dos bioindicadores integrados ao indicadores físico-químicos de amostras coletadas em Remanso 1B região de Brumadinho, MG.



A PCA, por correlação, dos bioindicadores avaliados revelou um aumento da semelhança entre os grupos estudados, sendo que de março de 2022 até março de 2023, foi possível perceber uma aproximação dos pontos de cada grupo. Em março de 2022 ocorreu a maior diferença entre os grupos, em que o grupo referência foi o mais fortemente correlacionado aos vetores sabidamente associados à fertilidade do

solo, como teores de fósforo, enxofre, CTC, teor de matéria orgânica e CBM. Adicionalmente, foi possível perceber um agrupamento incomum da atividade enzimática de várias enzimas na direção dos vetores frequentemente associados a solos mais pobres e contrários aos vetores anteriormente mencionados. A biodisponibilidade de nutrientes e substratos no solo são comumente afetados pelas características físicas do solo, principalmente os teores de argila, que afetam diretamente a CTC (ZHAO et al. 2022; LI et al. 2020; COMERFORD, 2005). Como março de 2022 foi um ano cujo período de chuvas foi acima da média na região, isso pode ter mantido níveis de água e um potencial hídrico e matricial mais adequado, mesmo em solos mais arenosos e pobres de matéria orgânica, teor de argila e baixa CTC, favorecendo a atividade enzimática, uma vez que menores teores de argila podem proporcionar uma menor adsorção de substrato e maior disponibilidade dos mesmos na solução do solo (KOME et al. 2019; SAIDIAN et al. 2016).

Em setembro de 2022, período marcado por menor disponibilidade de água no solo, foi observado a maior associação de todos os bioindicadores aos vetores fósforo, potássio, enxofre, matéria orgânica, CTC e teor de argila, na direção do grupo referência, corroborando com a hipótese anterior de que, na situação de grande disponibilidade de água, até mesmo solos mais pobres e mais arenosos podem apresentar maior atividade enzimática, e que, em situação de seca, parâmetros como argila, CTC, matéria orgânica e teores absolutos de nutrientes se tornam mais importantes.

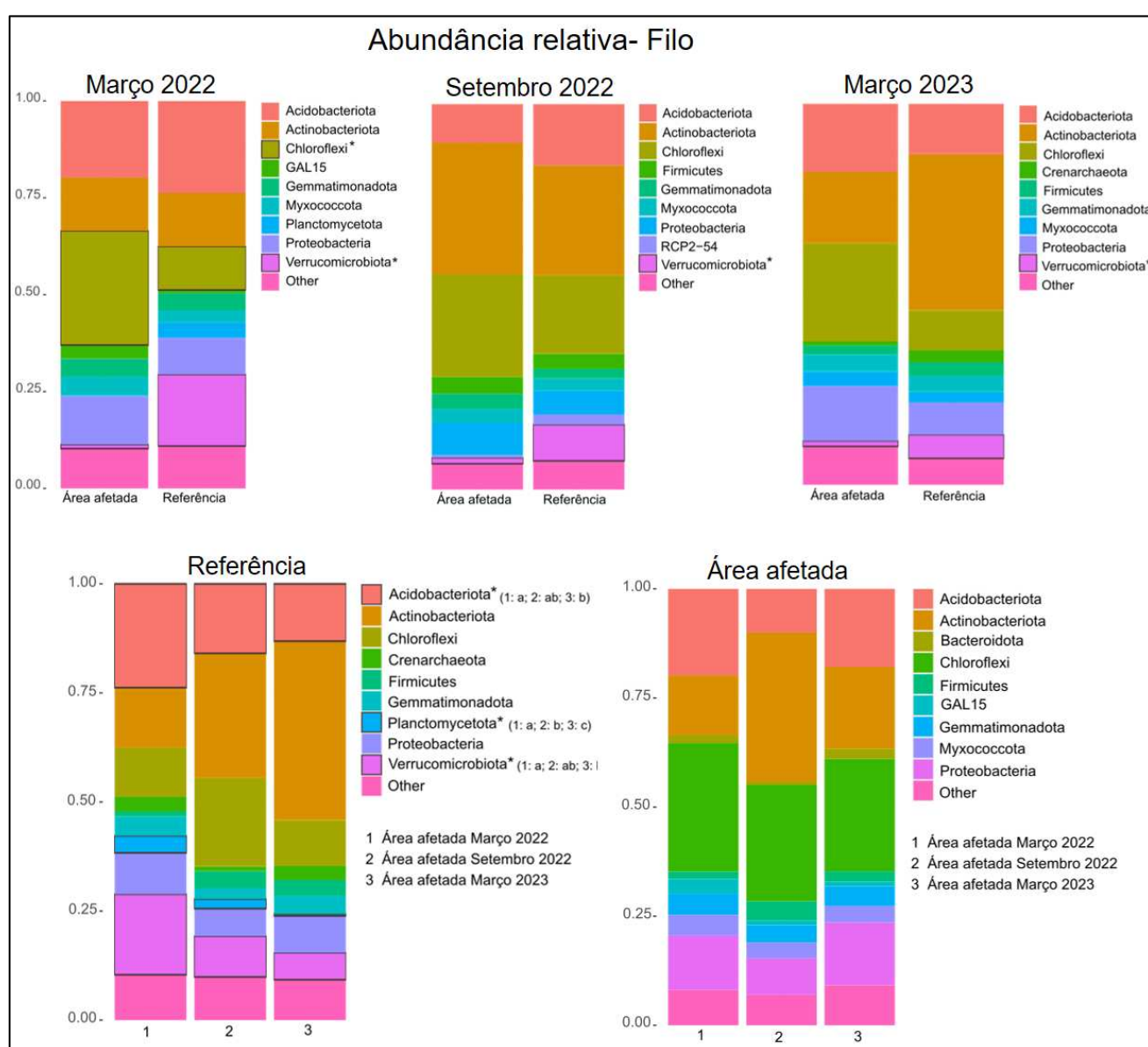
Em março de 2023 foi observado maior deslocamento de vetores na direção do grupo área afetada e indicadores associados a menor fertilidade, à semelhança do que foi observado em março de 2022, além de uma aproximação maior entre os dois grupos, podendo ser entendido como um aumento da semelhança entre os solos estudados e, portanto, uma possível recuperação da área afetada ao longo do período estudado.

2.3.3 Análise da estrutura e diversidade microbiana do solo

A análise do sequenciamento parcial do gene RNAr 16S mostrou uma ampla diversidade de grupos microbianos no solo nas duas áreas e, adicionalmente uma diferença de abundância desses grupos microbianos entre as áreas estudadas. Em nível de filo, a distribuição das abundâncias relativas dos nove filós mais abundantes,

foi representativa de muitos tipos de solos, e engloba muitos grupos microbianos com funções ecológicas distintas (Figura 9).

Figura 9 – Abundância relativa dos principais Filos observados nas amostras coletadas em Remanso 1B na região de Brumadinho, MG. Asteríscos e letras diferentes representam diferenças estatísticas na abundância relativa, pelo teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Fisher, ambos a 5% de significância.



Em levantamento da diversidade microbiana de solos sob estresse antrópico, decorrente de diferentes tipos de uso, tem sido relatada a ocorrência de maior

abundância de vários filos, também encontrados nesse estudo, como Acidobacteriota, Actinobacteriota, Chloroflexi, Fimicutes e Verrucomicrobiota (LIU et al., 2022). Essa diversidade e abundância também tem sido reportada em estudos de solos em áreas de mineração de ferro, reforçando a ubiquidade e a importância desses filos nas funções do solo, uma vez que tais englobam uma vasta gama de táxons diretamente relacionados a saúde do solo (FERNANDES et al., 2018)

Do ponto de vista de cada coleta, dentre os nove filos mais abundantes, foi observado diferenças estatísticas para Chloroflexi e Verrucomicrobiota. O filo Chloroflexi teve maior abundância na área afetada na coleta de março de 2022, seguido por abundâncias estatisticamente iguais nas coletas posteriores. Este filo é um dos cinco filos que compreende microrganismos fotossintéticos baseados em bacterioclorofila e, aparentemente, está correlacionado com ambientes degradados, normalmente pobres em matéria orgânica, já que o seu modo nutricional representativo é a utilização de carbono inorgânico como fonte de carbono (KONG et al., 2024), sendo variável em abundância em comparações entre solos de florestas nativas, sob estresse e em restauração (GUPTA, 2013; SILVA et al., 2024). Nesse sentido, a presença desse filo entre os mais abundantes no grupo área afetada, em março de 2022, pode estar correlacionada à condição ambiental desse sítio, já que o grupo AA também apresentou menores atividades enzimáticas, e menor correlação com matéria orgânica do solo, indicadores desfavoráveis a grupos microbianos heterotróficos.

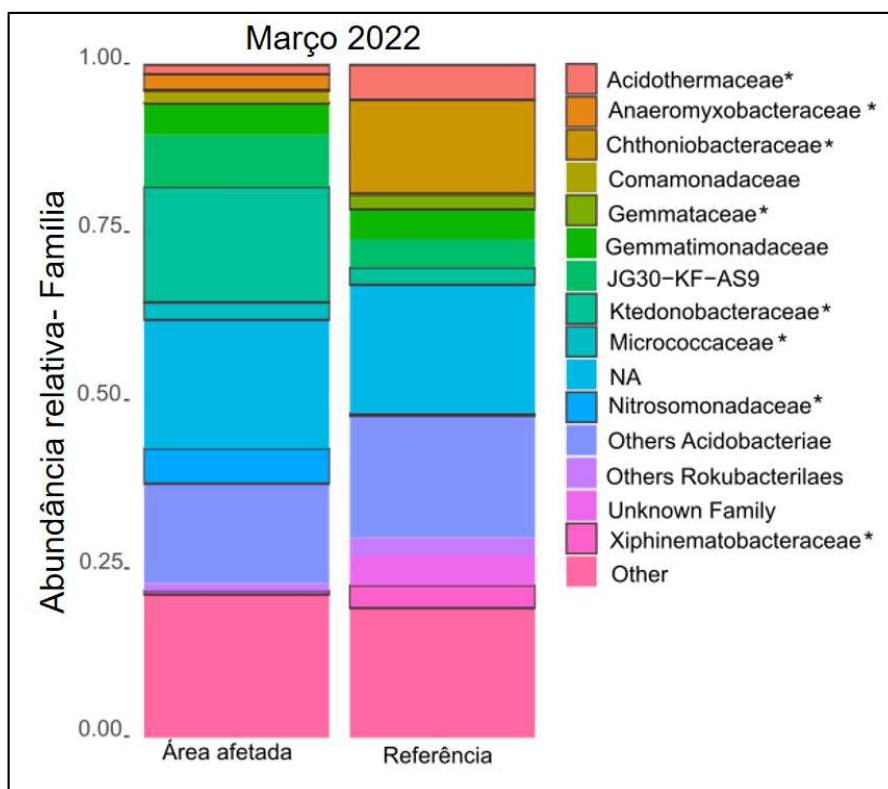
O filo Verrucomicrobiota, apesar da redução da abundância ao longo das três coletas, manteve-se mais abundante no grupo RF em comparação à área AA. Comunidades verrucomicrobianas são amplamente distribuídas no solo, sobretudo em ambientes naturais intactos, embora poucos estudos tenham focado em analisar sua diversidade e distribuição (BERGMANN et al., 2011). Os verrucomicrobiotas têm sido apontados como ubiqüitários, mas estudos sobre a ocorrência, abundância e diversidade, têm demonstrado que este filo é relacionado ao pH e, principalmente, à relação C/N do solo (SHEN et al., 2016), conforme ocorre no grupo AA, que possui um maior aporte de entrada de material orgânico no solo.

Na comparação entre as coletas, o grupo AA foi o único a apresentar diferenças estatísticas entre alguns filos. Neste grupo, além do filo Verrucomicrobiota mencionado acima, os filos Acidobacteriota e Planctomycetota apresentaram queda em suas abundâncias relativas ao longo das três coletas na referência. O grupo área

afetada, não apresentou diferenças estatísticas quando comparadas entre si, configurando assim, um grupo de baixa variabilidade na composição microbiana ao longo do tempo de estudo. Em comunidades mais estruturadas e com maior abundância absoluta de microrganismos, interações ecológicas tendem a ser mais expressivas, sobretudo a competição, podendo ocasionar individualmente um menor aproveitamento de recursos (YU et al., 2019). Nesse cenário, a composição microbiana tende a apresentar maiores oscilações estocásticas nesses ambientes do que em ambientes com menor abundância microbiana. O grupo referência apresentou maior biomassa microbiana, em uma variação crescente a partir de março de 2022, e isso associado à maior variação na composição microbiana observada nesse grupo, reforça a possível relação entre quantidade de microrganismos e maior estocasticidade da composição microbiana, decorrente dos processos ecológicos associados.

As variações na composição microbiana, em nível de família, também foram observadas nos padrões mencionados, em que todas as coletas apresentaram diferenças estatísticas nas abundâncias relativas entre famílias da área afetada para a referência (Figura 10). Na coleta de março de 2022 foi observado maior número de famílias que diferiram estatisticamente, sendo 4 famílias com maior abundância relativa na área afetada e 4 apresentando maior abundância relativa na referência.

Figura 10 – Abundância relativa no nível taxonômico de famílias observados nas amostras coletadas em Março 2022 na região de Brumadinho, MG. Asteriscos representam diferenças estatísticas na abundância relativa, pelo teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Fisher, ambos a 0,05 de significância.



As famílias com maior abundância no grupo AA foram Ktedonobacteriaceae e Chthoniobacteriaceae, pertencentes aos filos Chloroflexi e Verrucomicrobiota, respectivamente, e as famílias Nitrosomonadaceae e Micrococcaceae, pertencentes aos filos Actinobacteriota e Proteobacteria, respectivamente. Estas duas últimas famílias, são bastante diversas, sendo representada em vários tipos de ambientes. A Nitrosomonadaceae compreende gêneros conhecidamente associados ao ciclo no nitrogênio, como o gênero quimioautotrófico *Nitrosomonas* (PROSSER et al., 2013), e sua abundância relativa é comumente associada às mais abundantes em vários tipos de solos (GUO et al., 2022; MARETTO et al. 2022).

A família Micrococcaceae, do filo Actinobacteriota, é numericamente importante no solo e associada a atividade de decomposição de celobiose em condições óxicas (SCHELLENBERGER et al., 2011). Assim, essas famílias podem ser funcionais no grupo AA, atuando tanto no ciclo do nitrogênio, quanto no ciclo do carbono, dada à menor abundância absoluta de microrganismos, constatada pelo menor CBM, que pode se refletir em menor ocorrência de outros grupos de microrganismos celulolíticos. Nesse sentido, esse maior número de famílias estatisticamente diferentes entre as duas áreas estudadas, em março de 2022, corrobora com os outros resultados que, também, apresentaram maior diferença das duas áreas nesta coleta. Nas áreas de referência, além das famílias

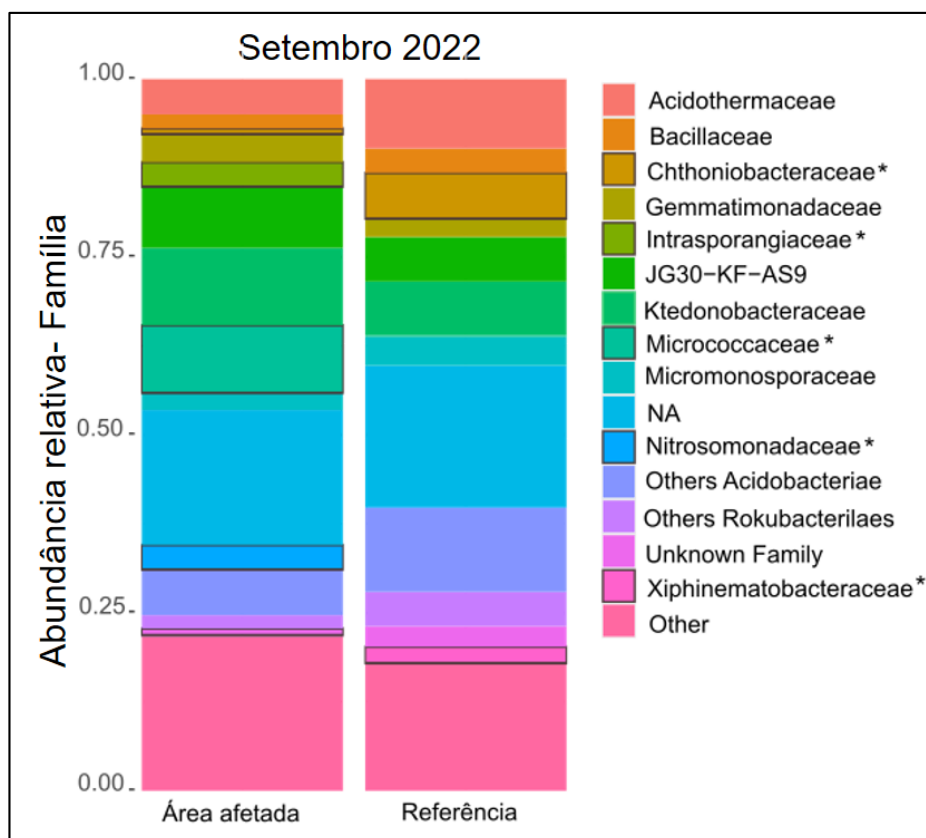
Xiphinematobacteriaceae, do filo Verrucomicrobiota, mais abundante na referência em todas as coletas, e Acidothermaceae, representante do filo Actinobacteriota, grupo representativo, principalmente, em solos florestais, as famílias Gemmataceae e Anaeromyxobacteriaceae foram relativamente mais abundantes. A família Anaeromyxobacteriaceae reúne gêneros diazotróficos, cuja abundância está relacionada a fixação de nitrogênio em vários ambientes do solo (MASUDA et al., 2020).

Abundância relativa mais expressiva dessa família tem sido relatada em estudos de diversidade microbiana em solos ricos em ferro, devido ao seu potencial papel na fixação de nitrogênio, pela presença de genes codificantes de nitrogenases e seu metabolismo redutor de ferro (ZHANG et al., 2023). Assim, a abundância relativa desse grupo na área referência, com maior riqueza de microrganismos, pode ser indicativo de associação desse ambiente, rico em ferro, com esta família que é amplamente distribuída no solo.

Na coleta de setembro de 2022, foram encontradas cinco famílias, cujas abundâncias relativas diferiram estatisticamente entre os grupos. No grupo AA, além das famílias Nitrosomodaceae e Micrococcaceae, que também foram maiores em termos de abundância relativa em março de 2022, a família Intrasporangiaceae, embora em baixa abundância, foi identificada apenas nesse grupo (Figura 11).

A coleta de setembro de 2022, representante da estação seca neste estudo, está relacionada às mudanças da composição microbiana que, em decorrência de seca e estresse hídrico, táxons específicos são favorecidos. Várias famílias do filo Actinobacteriodota já foram constatadas como táxons que são impulsionados em situação de seca e baixo potencial hídrico, entre elas a família Intrasporangiaceae (METZE et al., 2023). Em nossos resultados, as duas famílias mais abundantes no grupo área afetada pertenceram ao filo Actinobacteriodota, corroborando com estudos que atestam esse filo como resistente e favorecido nas condições mais extremas de temperatura e baixa disponibilidade de água (RAO et al. 2022; WIPF et al., 2021).

Figura 11 – Abundância relativa no nível taxonômico de famílias observados nas amostras coletadas em Setembro 2022 na região de Brumadinho, MG. Asteriscos representam diferenças estatísticas na abundância relativa, pelo teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Fisher, ambos a 5% de significância.

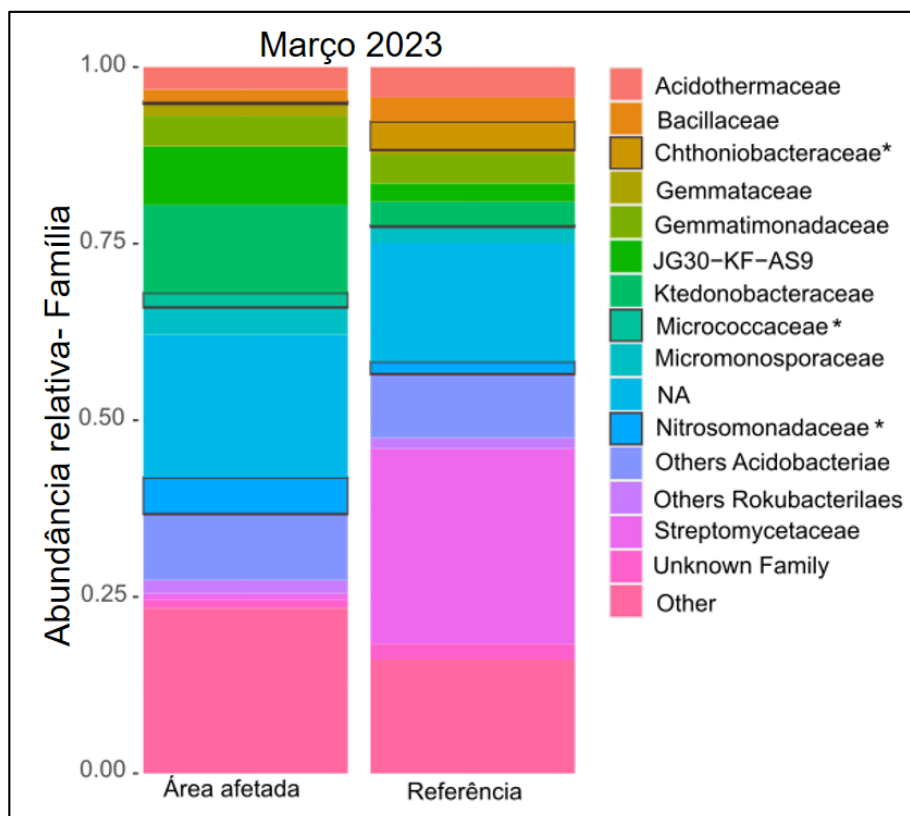


Adicionalmente, em setembro/2022, possivelmente houve uma pressão da condição de seca na composição da comunidade microbiana não só na área afetada, mas, também, na área de referência (Figura 11), que pôde ser percebido pela diminuição da ocorrência de diferenças estatísticas entre os grupos no nível de família. Esta maior uniformização, também, foi percebida nos outros bioindicadores como o CBM, o RBM e a atividade de várias enzimas avaliadas, que apresentaram maior semelhança nas comparações entre a área afetada e a referência.

A coleta de março de 2023, reforça a ideia de aumento das similaridades entre as áreas estudadas ao longo do tempo, já que apenas três das famílias mais abundantes apresentaram diferença estatística, mantendo o padrão mencionado anteriormente de maior abundância de famílias do filo Actinobacteriodota no grupo área afetada (Figura 12).

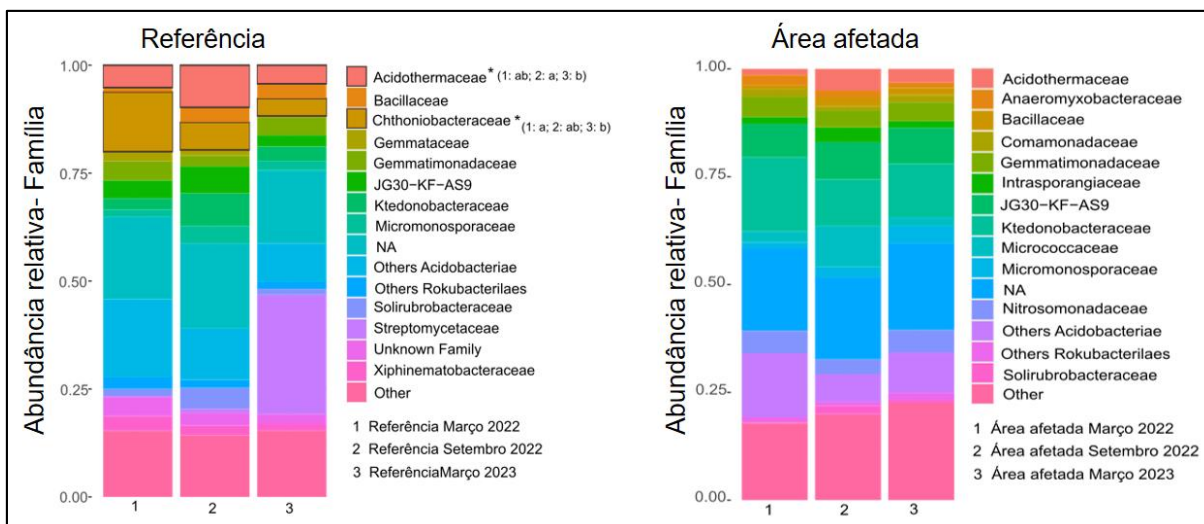
Figura 12 – Abundância relativa no nível taxonômico de famílias observados nas amostras coletadas em março 2023, na região de Brumadinho, MG. Asteríscos representam diferenças estatísticas na abundância relativa, pelo teste de Kruskal

Wallis seguido por teste de Fisher, ambos a 5% de significância.



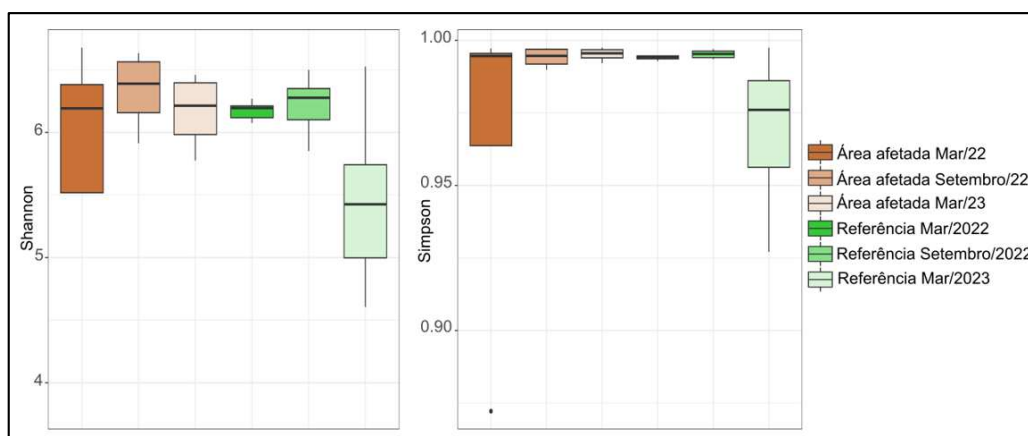
A comparação dos principais grupos microbianos ao longo das três coletas apresentou variação da abundância microbiana no grupo referência (Figura 13). Como já mencionado, comunidades microbianas mais abundantes tendem a apresentar maior grau de interação entre espécies, favorecendo a ocorrência de sucessões ao longo do tempo (YU et al., 2019). Além disso, as mudanças das condições abióticas ao longo do tempo de estudo, pela passagem por estação seca e chuvosa, promoveram maior oscilação da abundância dos grupos dentro da referência por ser uma comunidade maior, como atestado pelas análises de CBM.

Figura 13 – Famílias mais abundantes ao longo das três coletas nos dois grupos de solo coletado na região de Brumadinho, MG. Asteriscos e letras diferentes representam diferenças estatísticas na abundância relativa, pelo teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Fisher, ambos a 0,05 de significância.



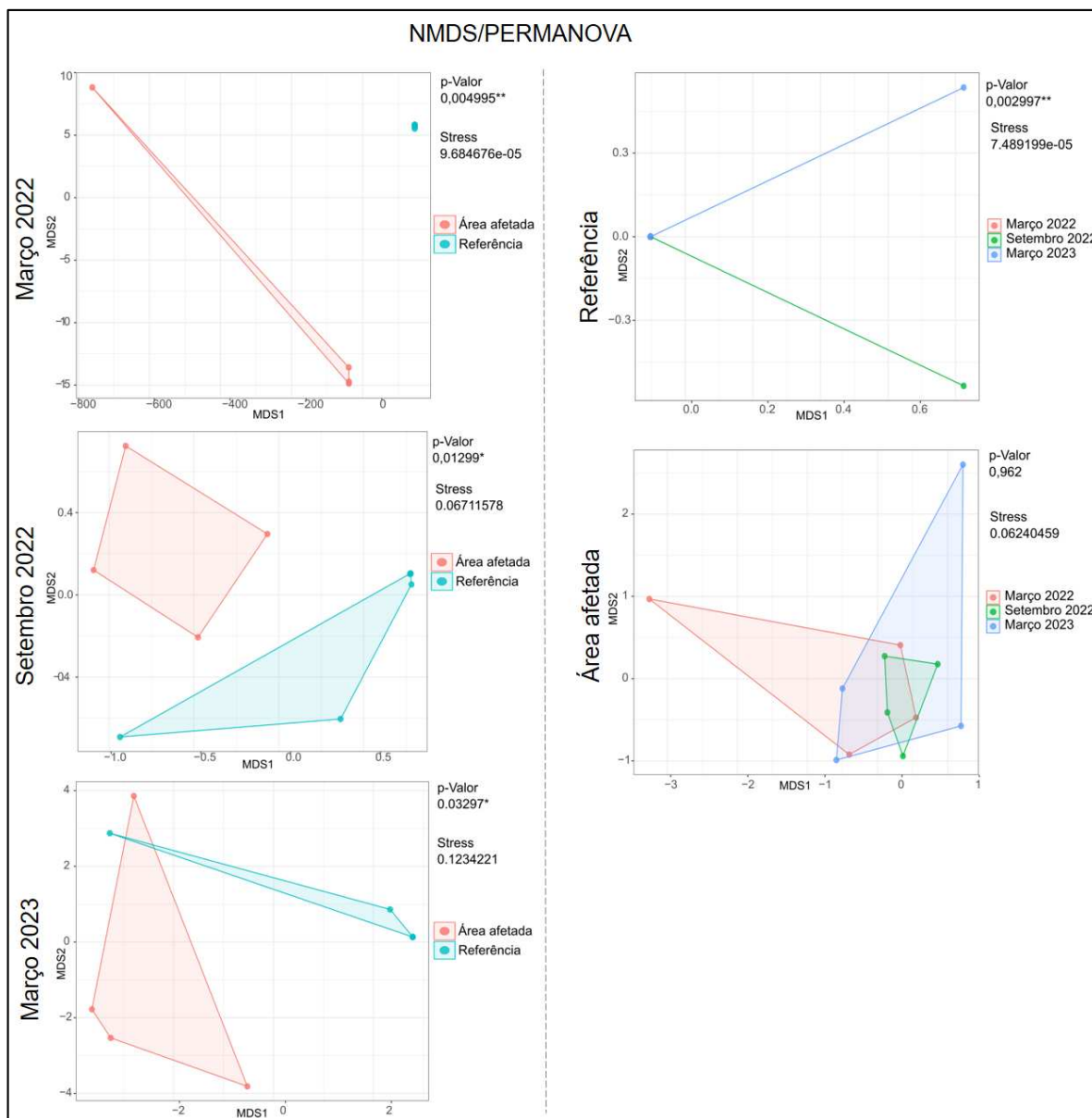
A diversidade microbiana nos grupos ao longo das coletas, pelos índices de Shannon e Simpson, não apresentou diferenças estatísticas tanto entre as áreas estudadas quanto entre as coletas (Figura 14). Tal resultado indicou que, embora a estrutura da comunidade microbiana tenha se diferenciado ao longo do tempo em função dos grupos, não foram observadas dominância de espécies (índice de Simpson), e diferenças de complexidade nas comunidades microbianas avaliadas (índice de Shannon).

Figura 14 – Índices de diversidade de Shannon e Simpson em amostras de solo coletado na região de Brumadinho, MG. Asteríscos e letras diferentes representam diferenças estatísticas na abundância relativa, pelo teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Fisher, ambos a 0,05 de significância.



Apesar das diferenças estatísticas observadas pontualmente em filos e famílias dentro de cada coleta e ao longo dos tempos avaliados, diferenças na composição microbiana geral dos gupos não pode ser inferida apenas com base nas diferenças pontuais em táxons superiores e mais abundantes. Nesse sentido, para a verificação da composição microbiana geral em nível de ASV, foi feito a análise de escalonamento multidimensional não métrica (NMDS) complementada por PERMANOVA, com base na matriz de dissimilaridade de Bray-Curts (Figura 15). No total, foram 5.705 ASVs obtidas após o tratamento de rarefação dos dados e essas ASVs foram comparadas entre os grupos pela análise de PERMANOVA em nível de significância de 0,05.

Figura 15 – NMDS e PERMANOVA da dissimilaridade de Bray-Curts das ASVs de amostras de solo coletadas na região de Brumadinho, MG.



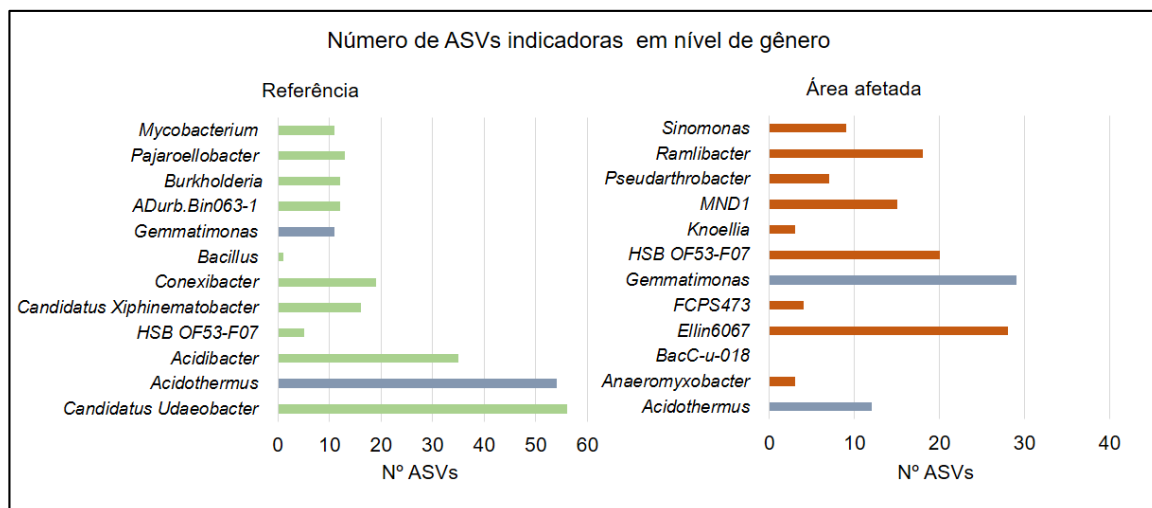
Em cada coleta, os resultados da NMDS mostraram um distanciamento decrescente entre a área afetada e a referência, isto é, uma diferença decrescente na composição microbiana geral entre esses grupos. Na coleta de março de 2022 e no grupo referência das três coletas, não foi possível obter um escalonamento com nível de distorção adequado e a análise de NMDS apresentou um valor de *Stress* muito baixo, o que pode representar baixa variabilidade nos dados e uma distorção que afeta o modelo. Nas demais coletas, esta análise mostrou um distanciamento entre os dois grupos, com um nível de distorção ideal, indicando de fato uma diferença na comunidade microbiana, que foi atestada pela PERMANOVA.

Para a dissimilaridade das duas áreas estudadas ao longo do tempo, foi observado o mesmo padrão encontrado para a abundância relativa nos níveis mais superiores, em que o grupo referência apresentou a comunidade microbiana diferente ao longo das três coletas e a área afetada se manteve igual, sugerindo uma possível homogeneidade neste ambiente, que pode conservar a estrutura da comunidade como menos dinâmica ao longo do tempo, observado mesmo em nível de ASV.

Estudos sobre a composição microbiana, e sua variação ao longo de diferentes tipos de solo, uso de solo, propriedades geomorfológicas e ecossistemas, demonstram uma relação direta desses fatores com a composição microbiana, em que um dos influenciadores centrais é a cobertura vegetal do solo (KAČERGIUS et al. 2023). Já foi demonstrado que a diversidade de fungos micorrízicos em áreas sob processo de revegetação, teve sua diversidade aumentada, e níveis taxonômicos mais baixos de grupos bacterianos são relatados como variáveis, em termos de composição, em estudos sobre diversidade microbiana de solos afetados por atividades de mineração (PRADO et al., 2019; VIEIRA et al., 2018). Nossos resultados concordam com esses estudos, já que também observamos essa diferenciação da composição do microbioma entre as duas áreas estudadas nas coletas individualmente, mostrando que a comunidade microbiana responde às características dos ambientes podendo ser um indicador de ambientes específicos.

Considerando a representatividade de ambientes por meio de grupos específicos de microrganismos, foi feita a análise de espécies indicadoras para verificar o grau de associação de ASVs aos ambientes estudados (Figura 16). Esta análise indicou ASVs que foram exclusivas e altamente associadas a cada um dos grupos, reforçando o fato de que certos grupos microbianos podem ser bioindicadores de ambientes com características específicas. Das 5.705 ASVs totais, 2.206 apresentaram algum grau de associação significativa aos grupos referência e área afetada, sendo 957 associadas a área afetada e 834 associadas a referência.

Figura 16 – ASVs indicadoras em nível de gênero e com abundância relativa acima de 0,01 provenientes de sequenciamento parcial do gene RNAr 16S de amostras de solo coletadas na região de Brumadinho, MG. As barras de cor cinza representam as ASV presentes nos dois grupos.



Dentre os gêneros das ASVs indicadoras de maior abundância relativa, apenas dois gêneros foram comuns a ambos os grupos, *Gemmatinomoas* e *Acidibacter*, além de gêneros associados a solos mais ácidos e organoheterotróficos como *Acidibacter* e *Bacillus*. Em ecossistemas florestais, *Gemmatinomoas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Acidibacter* e *Burkholderia* têm sido gêneros relatados como indicadores desse tipo de ambiente, geralmente impulsionados pela alta disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio e, sobretudo, influenciados pelo pH mais ácido (MA et al., 2022; SHI et al., 2021; BAĆMAGA et al., 2022).

Na área afetada, como previsto, houve a identificação de gêneros indicadores mais específicos, possivelmente em decorrência das maiores peculiaridades desse ambiente. Foram observados gêneros associados a atividades promotoras de crescimento de plantas e espécies celulolíticas específicas, como *Sinomonas* e *Ramlibacter*. Este último tem sido descrito como degradador de celulose por meio da produção das enzimas glucanases, e *Sinomonas*, uma Actinobacteriota, é relacionado a solubilização de nutrientes minerais, sobretudo fosfato inorgânico (CHINACHANTA et al., 2023; KANG et al., 2022). Como já discutido anteriormente, o grupo área afetada apresentou uma comunidade microbiana de menor correlação com a MO e CTC; nesse cenário, grupos com atividades promotoras de crescimento de plantas, como o Proteobacteria *Ramlibacter*, e os Actinobacteriota *Sinomonas* e *Pseudarthrobacter*, podem estar sendo favorecidos e selecionados, favorecendo o estabelecimento de relações específicas com plantas, como já demonstrado em outros estudos envolvendo solos degradados (RAO et al., 2022; SAEED et al., 2021; SILVA et al., 2024).

Um outro gênero indicador com alto grau de associação a área afetada observado em amostras de setembro/2022, o *Knoellia*, representante da família Intrasporangiaceae, é relatada como aumentado em termos de abundância, em situações de stresse hídrico como já discutido anteriormente (METZE et al., 2023).

2.4 CONCLUSÕES

As análises dos bioindicadores microbianos permitiram o monitoramento e a caracterização do solo ao longo do tempo. Os bioindicadores associados diretamente às funções ecológicas, como a atividade enzimática, tamanho da comunidade microbiana e taxa de respiração do microbioma do solo, possibilitaram estabelecer uma relação direta entre a revegetação, que ocorreu ao longo das três coletas, e a saúde do solo. A análise integrada dos bioindicadores indicou uma recuperação do solo na área afetada, tendo em vista a crescente aproximação dos seus valores aos valores de referência. Com relação as análises da estrutura e da diversidade microbiana do solo, foi demonstrado, também, aumento da semelhança ao longo do tempo entre áreas afetada e referência, já que a diferença das abundâncias relativas dos filos e famílias foram atenuadas ao longo do tempo avaliado. Adicionalmente, o estudo da estrutura da comunidade microbiana demonstrou ser mais persistente em revelar diferenças nos dois ambientes, uma vez que, apesar do aumento da semelhança na comunidade microbiana geral, mesmo na última coleta quando outros indicadores, como a atividade enzimática, indicavam ausência de diferenças estatísticas na atividade de várias enzimas, as análises de NMDS complementadas com PERMANOVA, ainda indicavam significância nas dissimilaridades entre as áreas. A análise de espécies indicadoras revelou bioindicadores muito específicos no grupo área afetada, com a identificação de gêneros descritos como promotores de crescimento vegetal, ressaltando a peculiaridade, em termos de microbioma, relacionada a demandas específicas de cada tipo de ambiente. Esta análise também evidenciou que dois gêneros, *Gemmatimonas* e *Acidothermus*, apresentaram um potencial para serem utilizados como marcadores no monitoramento do processo de reabilitação, uma vez que os mesmos apareceram em ambas áreas referência e afetada.

Portanto, os bioindicadores CBM, qCO₂, atividade da urease a arilsulfatase, e análise de espécies indicadoras foram os mais eficientes para o monitoramento da qualidade do solo nesse estudo, demonstrando sensibilidade adequada quando analisados conjuntamente, principalmente o CBM e a análise da diversidade, sendo uma ferramenta promissora em estudos de solos degradados.

REFERÊNCIAS

- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press INC, 1995.
- ALSTER, C. J. Quantifying thermal adaptation of soil microbial respiration. *Nat Commun*, v. 14, p. 5459, 2023.
- BACMAGA, M. et al. Role of forest site type in determining bacterial and biochemical properties of soil. *Ecological Indicators*, v. 135, p. 108557, 2022.
- BANERJEE, S.; HEIJDEN, M. G. A. Soil microbiomes and one health. *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, p. 6–20, 2023.
- BERGMANN, J. D. et al. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biol Biochem*, v. 43, n. 7, p. 1450–1455, 2011.
- BHADURI, D. et al. A review on effective soil health bio-indicators for ecosystem restoration and sustainability. *Front. Microbiol*, v. 13, 2022.
- CHINACHANTA, K. et al. Rhizoactinobacteria Enhance Growth and Antioxidant Activity in Thai Jasmine Rice (*Oryza sativa*) KDML105 Seedlings under Salt Stress. *Plants (Basel)*, v. 12, n. 19, p. 3441, 2023.
- CHOIX, F. J. et al. Traditional and new proposals for environmental microbial indicators - a review. *Environ Monit Asses*, v. 195, n. 12, p. 1521, 2023.
- COMERFORD, N. B. Soil Factors Affecting Nutrient Bioavailability. In: BASSIRIRAD, H. (Ed.). *Nutrient Acquisition by Plants*. Berlin: Springer-Verlag, 2005. (*Ecological Studies*, v. 181).
- EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 9, n. 3, p. 167-172, 1977.
- EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 20, n. 5, p. 601-606, 1988.

- FENG, J. et al. Soil microbial trait-based strategies drive metabolic efficiency along an altitude gradient. *ISME COMMUN*, v. 1, p. 71, 2021.
- FERNANDES, C. C. et al. Bacterial communities in mining soils and surrounding areas under regeneration process in a former ore mine. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 489-502, 2018.
- FISHER, R. A. *The design of experiments*. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1935.
- GUO, H. et al. Response of ammonia-oxidizing Bacteria and Archaea to long-term saline water irrigation in alluvial grey desert soils. *Sci Rep*, v. 10, p. 489, 2020.
- GUPTA, R. S. Molecular Markers for Photosynthetic Bacteria and Insights into the Origin and Spread of Photosynthesis. In: SARGENT, S. (Ed.). *Advances in Botanical Research*. v. 66, p. 37-66, 2013.
- HARTMAN, W. H.; RICHARDSON, C. J. Differential Nutrient Limitation of Soil Microbial Biomass and Metabolic Quotients (qCO₂): Is There a Biological Stoichiometry of Soil Microbes? *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, e57127, 2013.
- HOLLSTEIN, M. et al. Impact of a natural disturbance on the performance and microbial communities in a full-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Front. Environ. Sci.*, v. 11, 2023.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Diagnóstico das Chuvas Ocorridas no Período de 08 a 10 de janeiro de 2022 em Minas Gerais. INMET/5ºDISME/BH Página 1. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/noticias/inmet-divulga-o-diagn%C3%B3stico-das-chuvas-ocorridas-no-per%C3%ADodo-de-08-a-10-de-janeiro-de-2022-em-minas-gerais>. Acesso em: 20/04/2024.
- JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1976.
- KAČERGIUS, A. Comparison of the Structure of Soil Microbial Communities of Different Ecosystems Using the Microbiome Sequencing Approach. *Soil Syst.*, v. 7, n. 3, p. 70, 2023.
- KANDELE, E.; GERBER, H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, v. 6, p. 68–72, 1988.
- KOME, G. K. et al. Influence of Clay Minerals on Some Soil Fertility Attributes: A Review. *Open Journal of Soil Science*, v. 9, n. 9, 2019.
- KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, v. 47, n. 260, p. 583-621, 1952.

- KUMARI, J. A. et al. Effect of Substrate Concentration on Soil Enzyme Urease. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, v. 9, n. 3, p. 1150-1158, 2020.
- KUNITO, T. et al. Microbial synthesis of arylsulfatase depends on the soluble and adsorbed sulfate concentration in soils. *European Journal of Soil Biology*, v. 111, p. 103418, 2022.
- LANGHE, M. et al. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nature Communications*, v. 6, p. 6707, 2015.
- LI, G. et al. Effect of Soil Moisture on the Response of Soil Respiration to Open-Field Experimental Warming and Precipitation Manipulation. *Forests*, v. 8, n. 3, p. 56, 2017.
- LI, X.; SARAH, P. Arylsulfatase activity of soil microbial biomass along a Mediterranean-arid transect. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 35, n. 7, p. 925-934, 2003.
- LI, J. et al. Soil physico-chemical properties are critical for predicting carbon storage and nutrient availability across Australia. *Environ. Res. Lett.*, v. 15, p. 094088, 2020.
- LIAO, J. et al. Soil microbial community and their functional genes during grassland restoration. *Journal of Environmental Management*, 2023.
- LIU, S. et al. Composition and Diversity of Soil Microbial Community Associated With Land Use Types in the Agro–Pastoral Area in the Upper Yellow River Basin. *Front. Plant Sci.*, v. 13, 2022.
- LIU, X. et al. Urease and β -glucosidase activity enhanced the transformation of functional groups of humin amended by straw and straw-derived biochar. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 9, p. 87, 2022.
- MA, F. et al. Development of Microbial Indicators in Ecological Systems. *Int J Environ Res Public Health*, v. 19, n. 21, p. 13888, 2022.
- MARETTO, L. Microbial Diversity of Reconstituted, Degraded, and Agricultural Soils Assessed by 16S rDNA Multi-Amplicon Sequencing. *Front. Environ. Sci.*, v. 9, 2021.
- MARGALEF, O. et al. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1337, 2017.
- MASUDA, Y. et al. Diazotrophic *Anaeromyxobacter* Isolates from Soils. *Appl Environ Microbiol*, v. 86, n. 16, e00956-20, 2020.
- METZE, D. et al. Microbial growth under drought is confined to distinct taxa and modified by potential future climate conditions. *Nature Communications*, v. 14, p. 5895, 2023.

- NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 68, n. 1, p. 12-26.
- PRADO, I. G. O. et al. Revegetation process increases the diversity of total and arbuscular mycorrhizal fungi in areas affected by the Fundão dam failure in Mariana, Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 141, p. 84-95, 2019.
- PROSSER, J. I.; HEAD, I. M.; STEIN, L. Y. The Family Nitrosomonadaceae. In: ROSSELLO-MORA, R. (Ed.). *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Berlin: Springer-Verlag, p. 901-918, 2013.
- RAO, M. P. N. et al. Actinobacteria–Plant Interactions in Alleviating Abiotic Stress. *Plants (Basel)*, v. 11, n. 21, p. 2976, 2022.
- RODRIGUES, R. N. et al. Soil enzymatic activity under coffee cultivation with different water regimes associated to liming and intercropped brachiaria. *Ciência do Solo - Cienc. Rural*, v. 52, n. 3, 2022.
- SAEED, Q. et al. Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms. *Int J Mol Sci.*, v. 22, n. 19, p. 10529, 2021.
- SAIDIAN, M.; GODÍNEZ, L. J.; PRASAD, M. Effect of clay and organic matter on nitrogen adsorption specific surface area and cation exchange capacity in shales (mudrocks). *Applied Clay Science*, v. 123, p. 123-131, 2016.
- SCHELLENBERGER, S.; DRAKE, H. L.; KOLB, S. Functionally Redundant Cellobiose-Degrading Soil Bacteria Respond Differentially to Oxygen. *Appl Environ Microbiol*, v. 77, n. 17, p. 6043–6048, 2011.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.
- SHEN, C.; GE, Y.; YANG, T.; CHU, H. Verrucomicrobial elevational distribution was strongly influenced by soil pH and carbon/nitrogen ratio. *J Soils Sediments*, v. 17, p. 2449–2456, 2016.
- SHI, G. et al. Bacterial communities as indicators of soil health under a continuous cropping system. *LDD*, v. 32, n. 7, p. 2393-2408, 2021.
- SILVA, D. E. O. et al. Short-term restoration practices change the bacterial community in degraded soil from the Brazilian semiarid. *Scientific Reports*, v. 14, p. 6845, 2024.
- SINGH, A. K. et al. Biological indicators affected by land use change, soil resource availability and seasonality in dry tropics. *Ecological Indicators*, v. 115, p. 106369, 2020.

- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 23, n. 3, p. 249–261, 1997.
- SOUZA, S. S. et al. Iron ore mining areas and their reclamation in Minas Gerais State, Brazil: impacts on soil physical properties. *SN Appl. Sci.*, v. 2, p. 1659, 2020.
- SPOHN, M. Microbial respiration per unit microbial biomass depends on litter layer carbon-to-nitrogen ratio. *Biogeosciences*, v. 12, p. 817–823, 2015.
- STEINBERGER, Y. et al. A sensitive soil biological indicator to changes in land-use in regions with Mediterranean climate. *Scientific Reports*, v. 12, p. 22216, 2022.
- TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Arylsulfatase Activity of Soils. *Soil Science Society of America Journal*, v. 34, n. 2, p. 225-229, 1970.
- TEDESCO, M. J. et al. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. 2.ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.
- VIEIRA, C. K. et al. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Applied Soil Ecology*, v. 131, p. 55-65, 2018.
- WIPF, H. M. L.; BÙI, T. N.; COLEMAN-DER, D. Distinguishing Between the Impacts of Heat and Drought Stress on the Root Microbiome of *Sorghum bicolor*. *Phytobiomes Journal*, v. 5, p. 122-247, 2021.
- YE, C. et al. Long-term organic amendments increase the vulnerability of microbial respiration to environmental changes: Evidence from field and laboratory studies. *Science of The Total Environment*, v. 920, p. 170979, 2024.
- YU, X.; POLZ, M. F.; ALM, E. J. Interactions in self-assembled microbial communities saturate with diversity. *The ISME Journal*, v. 13, p. 1602–1617, 2019.
- ZHANG, G. et al. Microbial diversity and functions in saline soils: A review from a biogeochemical perspective. *Journal of Advanced Research*, 2024.
- ZHANG, Z. et al. Active Nitrogen Fixation by Iron-Reducing Bacteria in Rice Paddy Soil and Its Further Enhancement by Iron Application. *Appl. Sci.*, v. 13, n. 14, p. 8156, 2023.
- ZHAO, X. Y. Changes in Soil Physico-Chemical and Microbiological Properties During Natural Succession: A Case Study in Lower Subtropical China. *Front. Plant Sci.*, v. 13, 2022.

CAPÍTULO 3

ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS DA ÁREA AFETADA PELO REJEITO DE MINERAÇÃO DE FERRO

3.1 INTRODUÇÃO

As rizobactérias são microrganismos que habitam o entorno das raízes de plantas, região passível da influência das raízes, sendo normalmente indefinida quanto a sua geometria e delimitação uma vez que envolve gradientes de dimensões diferentes em função dos processos e do tipo de solo (HARTMANN et al., 2007; HINSINGER et al., 2005). A presença dessas bactérias nesta região tem sido associada a inúmeras funções para a planta, sendo que muitas dessas bactérias são capazes de produzir metabólitos de interesse para a planta e utilizar, em contrapartida, substâncias exsudadas pelas raízes (PANTIGOSO et al. 2022). Assim, devido a esta capacidade de fornecer substâncias importantes para a planta, no sentido do seu desenvolvimento, e serem constituintes da rizosfera, essas bactérias são designadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR).

Vários estudos têm demonstrado a capacidade de produção e liberação de metabólitos por PGPRs que afetam diretamente as plantas, dentre elas, além de enzimas que atuam em substratos do solo, estão hormônios, como ácido indol 3-acético e giberelinas, substâncias antagonistas a fitopatógenos, sideróforos e ácidos orgânicos capazes de solubilizar fósforo adsorvido (KHAN et al., 2021; Shi et al., 2024). Nesse sentido, a íntima relação estabelecida pelas rizobactérias possibilitam as plantas a superarem diversas situações de estresse, favorecendo seu estabelecimento mesmo em solos degradados, que é o passo inicial nos processos de recuperação ambiental (CORDERO et al., 2024; UPADHYAY et al., 2022; XU et al., 2023).

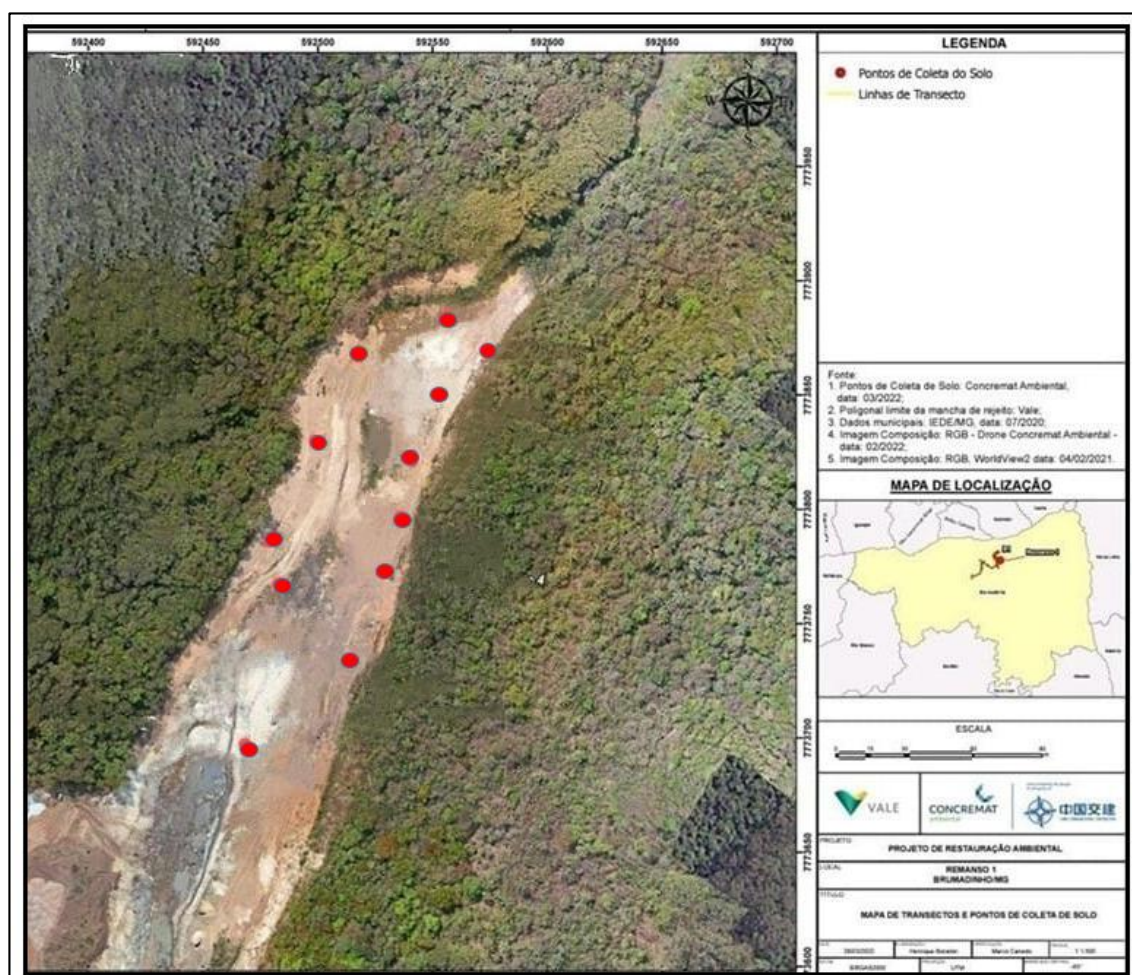
Portanto, tendo em vista a presença de crescimento vegetal na área, foi proposto a hipótese de que existem PGPRs na área afetada pelo rejeito em Remanso 1B. Este trabalho realizou o isolamento e a caracterização de rizobactérias no âmbito da prospecção de isolados eficientes na promoção de crescimento vegetal como uma ferramenta para estratégias futuras de reestabelecimento da vegetação em processos de recuperação ou de reabilitação de solos degradados. Estas PGPRs podem ser aplicadas para produção de mudas vegetais de maior rusticidade refletindo na maior sobrevivência em áreas afetadas por rejeito de mineração.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de material

Para o isolamento de bactérias rizosféricas foram coletadas raízes de plantas na área afetada pelo rejeito de mineração de ferro proveniente do rompimento da barragem B1 da Mina Córrego do Feijão na região de Remanso 1B (Figura 17).

Figura 17 – Localização dos pontos de coletas de amostras para isolamento de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas na área Remanso 1B em Brumadinho, MG.



Fonte: CONCREMAT (2022)

Uma planta em cada ponto, totalizando 12 plantas, foi retirada do solo e suas raízes coletadas, utilizando alicate de jardinagem e transferidas para sacos plásticos do tipo ziplock novos e devidamente identificados. Os sacos contendo as raízes foram mantidos em refrigeração a 4 °C por um período de dois dias até o término da coleta, depois do qual as raízes foram prontamente levadas ao isolamento.

3.2.2 Isolamento de rizobactérias

Para processo de isolamento de rizobactérias foi seguido o protocolo proposto por White et al. (2014). Para tanto, as raízes foram cortadas e colocadas em tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL contendo 30 mL de solução salina tamponada com fosfato e Tween 20 % (PBST) na razão de 500 µL de Tween 20 %/L de PBS. Os tubos foram submetidos a ultrassom no ultrasonicador Elmasonic 30 H™ (Elma Schmidbauer GmbH, Alemanha), para desprendimento dos microrganismos aderidos mais proximamente à raiz, em três tempos sucessivos, 1 minuto, 1 minuto e 10 minutos, sendo as raízes transferidas para um novo tubo Falcon estéril de 50 mL contendo 30 mL de PBST sucessivamente depois de cada tempo de sonicação. Em seguida, o lavado das raízes foi centrifugado a 5.000 g por 5 min e o *pellet* formado, ressuspendido em um volume de 5,0 mL de PBST. Posteriormente foi feita a diluição em série, e as diluições 10^{-3} e 10^{-4} plaqueadas por espalhamento em meio ágar nutriente suplementado com o antifúngico ciclohexamida (Merck, Alemanha). As placas foram incubadas a 37 °C para o crescimento microbiano e as colônias morfológicamente distintas repicadas pelo menos três vezes sucessivas em meio ágar nutriente para a obtenção dos isolados (White et al., 2014).

Obtidos os isolados, estes foram cultivados em caldo nutriente a 37 °C por tempo suficiente para visualização do crescimento de colônias, estando isentos de qualquer contaminação aferidas em placas de Petri, foi feito o estoque dos mesmo em glicerol 25 % sendo a partir então mantidos em refrigeração a -20°C.

3.2.3 Identificação taxonômica dos isolados e análise filogenética

Depois da etapa de isolamento e estoque, procedeu-se a identificação dos isolados por meio da amplificação parcial do gene 16S rRNA. Para tanto, os isolados foram repicados por estrias compostas em placas de ágar nutriente, e incubados a 37°C até o crescimento suficiente para verificação da não existência de contaminação e obtenção de colônias isoladas. A partir de colônias isoladas, foi feita a lise celular para obtenção do DNA molde a ser usado na amplificação parcial do gene 16S rRNA. Para a lise celular, uma pequena massa de célula foi coletada utilizando-se alça de

repicagem estéril descartável de 10 µL e transferida para microtubos de 200 µL contendo 40 µL de água ultrapura autoclavada. Posteriormente, os microtubos contendo a suspensão de células de cada isolado foram levados ao termociclador SensoQuest™ da GmbH e submetidos a 95 °C por 5 minutos para lise térmica. Depois da etapa da lise térmica, os tubos foram transferidos para microcentrífuga em que foram centrifugados por 10 segundos a 14.000 rpm para a precipitação dos resíduos celulares da lise.

Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA, foram utilizados o sobrenadante dos tubos de lise celular como DNA molde na reação em cadeia de polimerase (PCR) que foi conduzida em 30 ciclos nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 95 °C por 1 min, anelamento do primer a 57 °C por 25 segundos e 72 °C por 1 min para extensão da cadeia. Os *primers* utilizados foram o par de *primer* universal 10F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1100R (AGGGTTGCGCTCGTTG) gerando amplicons de tamanho aproximado de 1500 pb. Os amplicons obtidos da reação foram aferidos quanto ao tamanho e a intensidade da banda, em gel de agarose 0,8 %, corado com *UniSafe Dye* (Uniscience) e visualizados em transluminador (Applied Biosystems, USA). Posteriormente, foi feita a purificação dos produtos de PCR utilizando *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* da Promega sendo obtido, por fim, produtos de PCR parcial do gene 16S rRNA purificados e prontos para sequenciamento.

Os produtos de PCR do gene 16S rRNA foi sequenciado bidirecionalmente, e as sequências obtidas foram analisadas no *software DNA Baser Assembler* versão 5.21.0, sendo montados os *contigs*, salvos em formato fasta, e estes foram contrastados com o banco de dados BLASTn da base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), para alinhamento das sequências nucleotídicas. Depois do alinhamento das sequências de cada isolado com sequências do banco de dados, foi montado o arquivo “txt” contendo os *contigs* e sequências tipo para cada isolado, obtidas do banco de dados RefSeq (NCBI Reference Sequences). Utilizando o *software* MEGA versão 7.0.26 foi feito o alinhamento dos *contigs* e sequências tipo e por alinhamento *Muscle* e a reconstrução filogenética, pelo método estatístico *Neighbor-joining*, utilizando o Kimura 2p para cálculo do comprimento dos ramos em um *bootstrap* de 1000 repetições.

3.2.4 Triagem *in vitro* dos isolados para PGPR

Os isolados identificados foram triados com relação a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, produção sideróforos, ácido giberélico, ácido Indol 3 - acético e fixação biológica de nitrogênio.

Para o teste de solubilização de fosfato foi utilizado o método baseado em SYLVESTER-BRADLEY et al. (1982). Nesse caso, os isolados foram previamente cultivados em caldo nutriente por tempo suficiente para o pleno crescimento. O meio GL foi preparado contendo glicose, extrato de levedura e ágar nas concentrações de 10, 2 e 15 g/L respectivamente. Adicionalmente, uma solução em água de K_2HPO_4 a 100g/L (Solução 1) e uma solução aquosa de $CaCl_2$ a 100g/L (solução 2) foi preparada em recipiente particular para serem autoclavados separadamente. Após a autoclavagem, as soluções 1 e 2 foram misturadas, homogeneizadas e adicionadas ao meio GL com pH ajustado para 6,8, que foi então vertido nas placas de Petri. Após isso, cada isolado foi plaqueado em triplicatas, pela técnica de microgotas, em que 20 μ L de cada cultura de célula foi transferida para placa contendo meio de cultura GL e, após a secagem, incubadas a 28 °C por 5 dias. Com o crescimento dos isolados na placa, os halos de coloração clara resultante da solubilização do fosfato tricálcico, foram medidos.

Para o teste de produção de sideróforos foi utilizado o método de SCHWYN & NEILANDS (1987). Neste método os isolados, previamente ativados em caldo nutriente, foram plaqueados por microgotas em meio ágar kingB diluído, adicionado 20% do volume do meio de corante cromo azurol S (CAS). O meio ágar KingB foi preparado com glicerol 3 g/L, peptona 4 g/l, K_2HPO_4 0,23 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3 g/L e ágar a 15g/L sendo ajustado pH para 6,8. O corante CAS foi feito a partir da mistura de quatro soluções sendo a solução 1 composta de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ e HCL a 1 mM e 10 mM respectivamente, solução 2 de CAS em água ultrapura estéril a 2mM, solução 3 de CTAB (HDTMA) em água ultrapura a 10mM e solução 4 de piperazina anidro 0,5M e HCL 2,4mM. Após 5 dias de incubação os halos de coloração laranja resultantes da reação dos compostos sideróforos com o corante CAS foram medidos.

A quantificação de giberelinas foi aferida como descrito por El et al. (2024). Para tanto, os tubos com os isolados previamente cultivados em meio isento de glicose e nitrogênio foram centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos e 0,5 mL do sobrenadante misturados a 4,5 mL de H_2SO_4 concentrado e resfriado. Os tubos de

ensaio foram então colocados em banho de gelo por 10 minutos e logo após em banho-maria a 28°C por 1 hora. Após a retirada de todos os tubos de ensaio do banho-maria, eles foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos e medido a absorvância a 412 nm em espectrofotômetro (Hach DR3900®, Alemanha). As leituras foram convertidas em concentração de ácido giberélico a partir da curva de calibração preparadas com concentrações crescentes de 0 a 100 ppm, utilizando o mesmo meio de cultivo e procedimento adotada para os isolados.

No teste de produção de ácido indol 3-acético (AIA) foi utilizado o método proposto por GLICKMANN e DESSAUX (1995). Para tanto, os isolados foram cultivados em meio ágar KingB modificado (adição de triptofano 0,5g/L) com pH 6,8 por 72 horas, sendo posteriormente tomado 1 mL da cultura e centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. Após a etapa de centrifugação, 150 µL do sobrenadante foram transferidos para microplacas de 96 poços e adicionado 100 µL do reagente de Salkowsky composto por de FeCl₃ (0,07M) e H₂SO₄ (7,7M). As placas foram incubadas no escuro por 30 minutos e imediatamente após esse tempo, lidos a um comprimento de onda de 520 nm em leitor de microplaca (Agilent BioTek®, USA). Uma curva de calibração foi preparada com concentrações crescentes de 0 a 1000 µmol/mL de AIA como proposto por SARWAR & KREMER (1995).

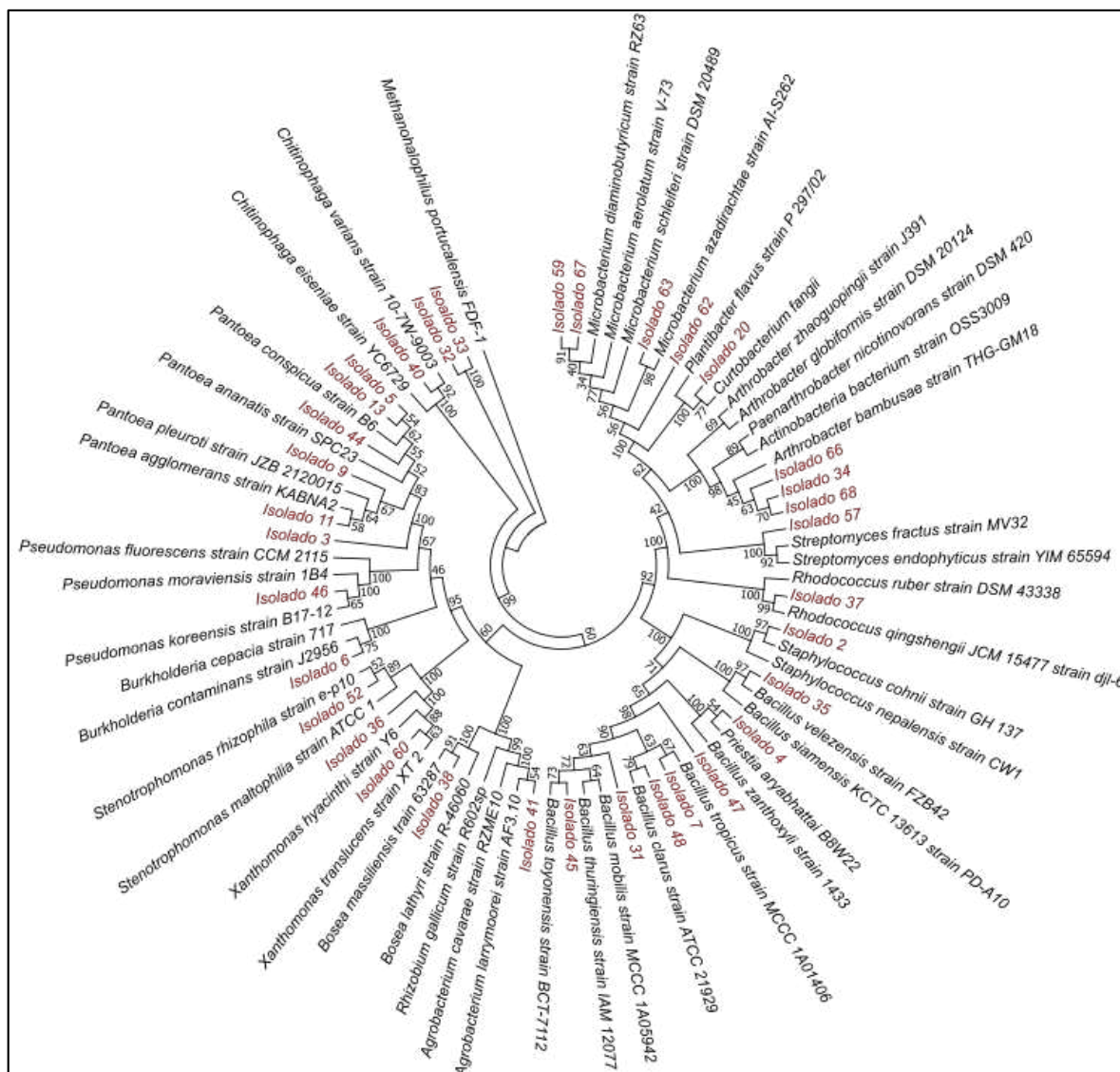
Para o teste de capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio (FBN), foi preparado o meio NFb semi-sólido com a seguinte composição: ácido málico 5 g/L, K₂HPO₄ 0,5g/L, MgSO₄·7H₂O 0,2g/L, NaCl 0,1 g/L, CaCl₂·2.H₂O 0,02 g/L, 2 mL de solução de azul de bromotimol a 0,5 %, 4 mL de solução de FeEDTA a 1,64 %, KOH 4,5 g/L, e 3,5 g/L ágar. Além disso, foi adicionado ao meio uma solução de micronutrientes composta por 0,04 g/L de CuSO₄·5H₂O, 1,2 g/L de ZnSO₄·7.H₂O, 1,4 g/L de H₃BO₃, 1 g/L de Na₂MoO₄·2H₂O, 1,175 g/L de MgSO₄·H₂O e uma solução de vitaminas composta por 100 mg/L de biotina e 200 mg/L de piridoxol-HCL. No meio NFb semi-sólido foram inoculados os isolados como descrito DÖBEREINER et al. (1995), em que 20 mL do meio foi vertido em tubos de ensaio, e os isolados previamente cultivados em meio ágar nutriente, recolhidos por uma alça de repicagem de 1 µL e inoculados por meio de uma picada no meio, em triplicata. Os tubos foram então incubados a 28 °C por até 8 dias e a formação de um halo de crescimento bacteriano de cor azul clara associada a basificação do meio foi indicativo de positivo para fixação biológica de nitrogênio.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Isolamento e identificação taxonômica de rizobactérias

Das raízes das 12 plantas coletadas, foram obtidos 34 isolados rizosféricos pelo método de isolamento utilizado. Após o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foi realizada a análise taxonômica e a análise filogenética dos isolados (Figura 18). A maioria dos isolados foram afiliados ao gênero *Bacillus* seguidos por *Pantoea*, *Arthrobacter* e *Microbacterium*. Os gêneros menos representados, com apenas um isolado, foram *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Chitinophaga*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Bosea*, *Agrobacterium*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus* e *Curtobacterium*. Quatro isolados não tiveram os gêneros resolvidos pela hipótese filogenética gerada, sendo o isolado 3 na base *cluster* do gênero *Pantoea*, o isolado 62 na base do *cluster* de *Microbacterium*, e os isolados 32 e 33 como um *cluster* individual mais próximo ao *outgroup*.

Figura 18 – Análise filogenética, baseada em sequências parciais do gene RNAr 16S, de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas do solo de área degradada pelo rejeito de minério de ferro em Remanso B1 na região de Brumadinho, MG. Distância evolutiva baseada no modelo Kimura 2p e reconstrução da árvore pelo método *Neighbor-joining*. Valores de *Bootstrap* (repetição de 1000, mostrada com %) foram listados.



O gênero *Bacillus* tem sido relatado como muito comum no solo, sendo recorrente em todas as técnicas de isolamento em meio de culturas mais usuais, principalmente em plantas arbustivas (MILJAKOVIĆ et al., 2020; PANDEY & PALNI 1997). Este gênero é associado a muitas funções ecológicas importantes e, além disso, conhecidos produtores de metabólitos promotores de crescimento de plantas (CHERIF-SILINI, et al., 2016). Vários estudos de prospecção de microrganismos a partir de solos relatam ser, esse gênero, o mais representativo, ressaltando sua importância na colonização da rizosfera. Nossos resultados corroboram com esses estudos, já que foram os que tiveram maior abundância pelo método de isolamento adotado.

Pantoea é comumente relatado como um gênero que engloba algumas linhagens de PGPR e fitopatógenos, tendo representantes encontradas também na

filosfera e de forma endofítica (LV et al., 2022). Dentre os nossos isolados, 5 foram agrupados em nível de gênero no *cluster Pantoea*, sendo o isolado 11 apontado com grande identidade à espécie *Pantoea agglomerans*, espécie que abrange desde linhagens com alta capacidade de promoção de crescimento de plantas a até algumas descritas como patógeno oportunista em humanos (CRUZ et al., 2007). Os demais gêneros, como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium*, *Bosea* e *Artrobacter* e *Microbacterium* têm sido amplamente relacionados a funções importantes para o desenvolvimento das plantas de interesse agrônomo como biocontrole de patógenos, fixação biológica de N, produção de citocinas entre outros, e são conhecidos por colonizarem a rizosfera (JHA & SARAF 2015). O *cluster* individual dos isolados 32 e 33 foi agrupado próximo ao grupo do gênero *Chitinophaga*. O Gênero *Chitinophaga*, assim como o gênero *Curtobacterium* também representando, são conhecidos por algumas linhagens apresentarem resistência a metais pesados e capacidade de uso em biorremediação (MURATOVA et al., 2023; PATEL et al., 2022). Esses isolados juntamente aos isolados 3 e 62, que não tiveram o gênero resolvido pela hipótese filogenética, podem ser representativos do ambiente em que foram isolados, dada a sua possível capacidade de resistência a metais e contaminantes.

3.3.2 Triagem *in vitro* dos isolados para promoção de crescimento de plantas

Os testes de triagem aos quais foram submetidos os isolados, indicaram alguns como promissores do ponto de vista de PGPRs. Dos 28 isolados considerados distintos, apenas 5 não apresentaram resposta a nenhum teste, e 20 demonstraram potencial em pelo menos 2 dos testes realizados, representando um percentual de 70% do total dos isolados (Tabela 1 e Figuras 19 e S1).

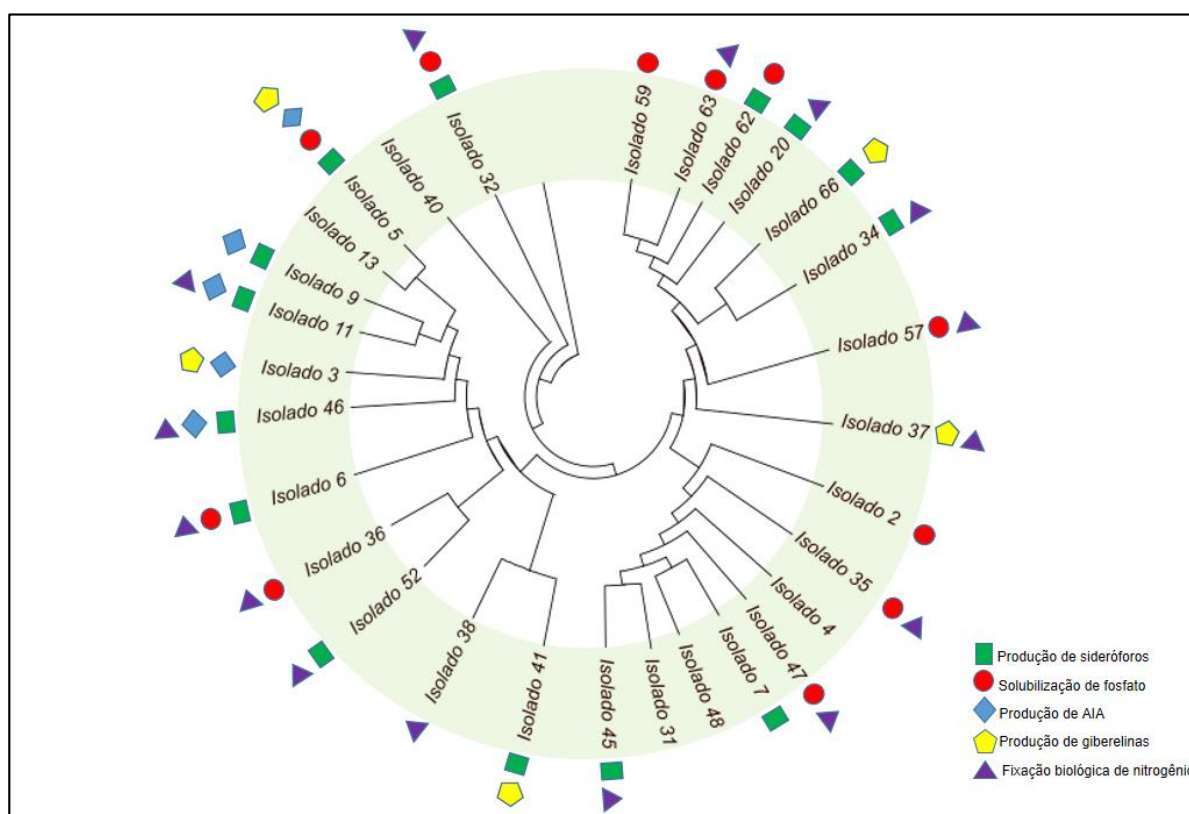
Tabela 1 – Quantitativos dos testes de triagem dos isolados provenientes de Remanso 1B na região de Brumadinho (MG) para promoção de crescimento de plantas. ID: identidade; SD: sideróforos; SF: solubilização de fosfato; AIA: ácido indol 3-acético; GA: giberelinas; FBN: fixação biológica de Nitrogênio; *: gêneros não resolvidos pelo modelo *Neighbor-Joining* (Figura 18).

ISOLADO	BLASTn	ID %	Nº ACESSO	SD halo (mm)	SF halo (mm)	AIA $\mu\text{g}^*\text{mL}^{-1}$	GA $\mu\text{g}^*\text{mL}^{-1}$	FBN
2	<i>Staphylococcus</i>	99,3	MW365210.1	-	12	-	-	-
3	<i>Pantoea</i> *	95,2	CP035034.1	-	-	14,9	139,5	-
4	<i>Bacillus</i>	99,7	MT225770.1	-	-	-	-	-
5	<i>Pantoea</i>	98,3	MH973237.1	13	15	17,6	39,7	-
6	<i>Burkholderia</i>	99,7	MG674319.1	90	20	-	-	+
7	<i>Bacillus</i>	99,5	MK648344.1	49	-	-	-	-
9	<i>Pantoea</i>	98,3	HQ242739.1	15	-	36	-	-
11	<i>Pantoea</i>	99,2	MG836018.1	50	-	24,6	-	++
13	<i>Pantoea</i>	97,4	CP054912.1	-	-	-	-	-
20	<i>Curtobacterium</i>	99,7	AY273209.1	10	-	-	-	+
31	<i>Bacillus</i>	99,2	OP268526.1	-	-	-	-	-
32	<i>Pseudomonas</i> *	98,2	CP087166.1	20	10	-	-	+
34	<i>Arthrobacter</i>	99,1	FJ890893.1	18	-	-	-	+
35	<i>Bacillus</i>	99,1	OR342735.1	-	12	-	-	+
36	<i>Xanthomonas</i>	99,8	OQ439133.1	-	-	15	-	++
37	<i>Rhodococcus</i>	99,4	MN826591.1	-	-	-	45,9	++
38	<i>Bosea</i>	99,8	LC133745.2	-	-	-	-	++
40	<i>Chitinophaga</i>	99,6	MN100129.1	-	-	-	-	-
41	<i>Agrobacterium</i>	99,6	GU296353.1	17	-	-	42,1	-
45	<i>Bacillus</i>	99,7	MN421112.1	16	-	-	-	+
46	<i>Pseudomonas</i>	99,5	KJ642326.1	29	8	-	-	++
47	<i>Bacillus</i>	97,7	MN448425.1	-	9	-	-	++
48	<i>Bacillus</i>	99,7	MT225770.1	-	-	-	-	-
52	<i>Stenotrophomonas</i>	98,4	MT071582.1	21	-	-	-	+
57	<i>Streptomyces</i>	99,3	MN826178.1	-	17	-	-	+
59	<i>Microbacterium</i>	99,7	MT487634.1	-	10	-	-	-
62	<i>Microbacterium</i> *	99,2	MW433868.1	9	10	-	-	-
63	<i>Microbacterium</i>	99,5	OK271123.1	-	10	-	-	++
66	<i>Arthrobacter</i>	97,7	FJ890893.1	2	-	-	64	-

Dos testes, o FBN foi o que mais obteve resposta dos isolados, seguido de produção de sideróforos e solubilização de fosfato. O teste de FBN apresentou positivo para 15 isolados distribuídos em vários gêneros distintos, além de positivo também para isolados de *clusters* individuais. O teste de produção de sideróforos, indicou positivo para 14 isolados, e 11 isolados foram capazes de solubilizar fosfato tricálcico. Os testes para quantificação da produção de fitormônios, AIA e ácido giberélico foram os mais restritos, em que apenas 5 isolados indicaram positivos com quantidades dentro da faixa de detecção da curva padrão utilizada para cada método.

Em termos quantitativos, houve sobreposição de isolados como mais eficientes na produção de metabólitos de interesse (Figura 19).

Figura 19 – Análise filogenética destacando a caracterização *in vitro* dos isolados provenientes de Remanso 1B na região de Brumadinho (MG) para fatores de promoção de crescimento de plantas. Distância evolutiva baseada no modelo Kimura 2p e reconstrução da árvore pelo método *Neighbor-joining*.



O isolado 5 foi o que mais respondeu aos testes, sendo positivo para sideróforos, solubilização de fosfato, produção de AIA e giberelinas. O Gênero *Pantoea*, do filo Pseudomonadota, ao qual pertence isolado 5, é bastante conhecido por incluir linhagens descritas como PGPRs. Esse gênero, proposto em 1989, passou a incluir o grupo *Erwinia herbicola* e algumas linhagens de *Enterobacter agglomerans*, cuja análise genética de hibridização DNA-DNA e de características fenotípicas, demonstraram uma íntima relação entre esses organismos. Assim, essas duas espécies foram estabelecidas dentro deste gênero como *P. agglomerans* e *P. dispersa*. Desde então, o gênero *Pantoea* passou a reagrupar outras espécies consideradas mais heterogêneas como, *E. uredovora* e *E. stewartii* e outras

descobertas a partir de 1992 (MORIN & PARVEEN, 1999). Estudos anteriores demonstraram capacidade de produção de uma combinação de auxinas por cepas desse gênero, sendo o AIA produzido em combinação com outros compostos semelhantes, que foram capazes de melhorar o enraizamento de estaquias de plantas lenhosas, sugerindo assim seu potencial uso como bioestimulantes (LUZIATELLI et al., 2020). Nosso estudo contemplou a verificação da produção de AIA em quantidades pequenas de triptofano, precursor dessa auxina, e mesmo em quantidades baixas de triptofano, os isolados identificados como *Pantoea sp.* tiveram níveis de produção variando de 14,9 a 36 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, quantidades consideradas altas e normalmente obtidas em cultivos com grandes quantidades de triptofano disponível no meio (MOHITE, 2013; SILVA et al., 2020). Adicionalmente, estudos de exploração do microbioma rizosféricos demonstraram que *Pantoea*, pode fixar nitrogênio como microrganismos de vida livre no solo, solubilizar fosfato inorgânico e tem apresentado alta capacidade de produção de AIA (GANESH et al., 2022). Nossos resultados corroboram com esses estudos já que, com exceção do isolado 36, todos os demais que demonstraram capacidade de produção de AIA foram pertencentes ao gênero *Pantoea*, além da capacidade de solubilizar fosfato, também apresentada por isolados desse grupo.

Enquanto a produção do AIA e outras auxinas são mais amplamente distribuídos entre os microrganismos, a produção de giberelinas é de caráter mais restrito. As primeiras experiências sobre a biossíntese desse composto foram na espécie fungica *Giberella fujikuroi*, reclassificado como *Fusarium fujikuroi*, sendo a partir de então atribuído a outras espécies de fungos e, posteriormente, a plantas e bactérias (MACMILLAN, 2002; SALAZAR-CEREZO et al., 2018). Em nossos resultados, para a produção de giberelinas, além do gênero *Pantoea* representado pelo isolado 5, os isolados 3, 66, 37 e 41 foram positivos, e os que tiveram melhores níveis de produção desse fitormônio, variaram de 39 a 139,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Estudos têm relatado cepas de *Pseudomonas spp.* produzindo quantidades máximas em torno de 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de giberelinas em condições de cultivo otimizado (LOTFI et al., 2022) e alguns *screening* de potenciais PGPR tem reportado valores semelhantes como referentes a cepas com alta capacidade de produção desse metabólito, o que torna esses isolados promissores nesse sentido (SILPA et al., 2018). O isolado 3 foi o que apresentou maior potencial de produção de giberelinas no teste *in vitro*, com níveis 54 % acima do isolado 66, o segundo com melhor nível de produção. Este isolado foi identificado como proximamente relacionado ao gênero *Pantoea*, embora na hipótese

filogenética obtida, não tenha sido definido seu gênero. Possivelmente, este isolado pertence, se não ao gênero *Pantoea*, pelo menos à família *Erwiniaceae* estando assim próximos aos isolados com melhor desempenho também na produção de AIA. O isolado 66, foi identificado como pertencente ao gênero *Arthrobacter*. O gênero *Arthrobacter* criado em 1947, e incluído na família *Micrococcaceae* a partir de 1980 (JONES & KEDDIE, 2006) tem sido significativamente relacionado a síntese de giberelinas e fixação de nitrogênio, assim como outras actinobacterias (GRAPPELLI & ROSSI 1981; SHI et al., 2023). Nossos resultados indicam atividade de fixação de nitrogênio, tanto para os isolados próximos a *Arthrobacter*, quanto para os demais isolados 63,20,57 e 37 pertencentes também à Actinobacteriota, reforçando o papel das actinobacterias na FBN como descrito em muitos *screenings* de PGPR (SELLSTEDT & RICHAU, 2013; KUCHO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2018).

Nos testes de produção de sideróforos e solubilização de fosfato, foi encontrado maior ocorrência de sobreposição, em que o mesmo isolado respondeu positivamente a dois testes. Do ponto de vista quantitativo, o isolado 6 apresentou a maior resposta considerando a medição do halo de reação dos sideróforos com o meio e o halo de solubilização de fosfato tricálcico. A capacidade de solubilização de fosfato foi detectada na maioria dos isolados testados. Dez isolados apresentaram capacidade de solubilizar fosfato tricálcico, dentre eles isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Microbacterium*, *Burkholderia* e *Pantoea*. Identificado como pertencente ao gênero *Burkholderia*, o isolado 6 apresentou um potencial acima de 44 % maior na produção de sideróforos relativamente aos demais isolados e maior halo de solubilização de fosfato. Linhagens de *Burkholderia contaminans* têm sido descritas como PGPR capazes de produção de sideróforos, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e controle biológico de fusarioses (HEO et al., 2022). O gênero *Burkholderia* tem sido alvo de estudos de prospecção de genes com potencial biotecnológico, sendo relatado como rizóbios com capacidade de estabelecer nodulação com plantas leguminosas para fixação de nitrogênio (EMBRAPA, 2006), e de produzir enzimas de atuação em uma ampla gama de substratos, sendo assim altamente competitivo (LARD et al., 2017). Portanto, o isolado 6, identificado justamente como uma linhagem dessa espécie, pode ser reflexo de alguma pressão seletiva em função do solo em que foi isolado, e pode ser promissor na promoção de crescimento de plantas.

Assim como para a FBN, o teste para sideróforos apresentou uma grande distribuição entre os isolados, em que vários grupos microbianos demonstraram

atividade. O solo da região estudada é rico em minério de ferro, no entanto formas férricas como a hematita e alguns outros hidróxidos de ferro, são insolúveis podendo levar a uma baixa disponibilidade de ferro para as plantas mesmo nesse tipo de solo (BENITE et al., 2002). Ademais, estudos apontam para uma relação entre a o movimento do ferro no solo e a disponibilidade de nitrogênio (SLIMANI et al., 2023), que podem estar relacionadas ao fato dos isolados terem apresentado maior resposta a esses dois testes. Compostos sideróforos produzidos por microrganismos permitem a captura de ferro livre no solo e o seu carreamento para as células microbianas, disponibilizando assim esse nutriente. Muitos microrganismos rizósfericos são conhecidos pela capacidade de produção desses compostos quelantes de ferro e isso pode ser uma vantagem sobre os outros microrganismos, uma vez que o ferro ficaria disponível para eles e não para os outros (SAYYED et al., 2013). Assim, a ocorrência de muitos isolados capazes de produzirem sideróforos neste estudo, podem ser reflexo da baixa disponibilidade de ferro devido ao solo apresentar grande teor de hematita, forma indisponível, e ser uma vantagem competitiva num cenário de solo degradado.

3.4 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram a ocorrência de PGPRs na área afetada pelo rejeito no Remanso 1B sendo o método de isolamento adotado baseado na sonicação em três tempos sucessivos, eficiente na obtenção de isolados rizosféricos mais diversos, já que além dos vários gêneros, foi também possível obter linhagens, que na hipótese filogenética gerada pelo modelo *Neighbor-Joining* a partir do sequenciamento parcial do 16S rRNA, formaram *clusters* mais distantes de suas linhagens tipo. Esses isolados são promissores do ponto de vista de sua classificação taxonômica, podendo se tratar de uma espécie ainda não descrita. Nesse sentido, mais estudos são necessários para a caracterização desses isolados, inclusive estudos genéticos de sequenciamento de outros marcadores filogenéticos ou do DNA total, para uma identificação mais precisa. No total, 34 isolados foram obtidos e os gêneros mais abundantes foram *Bacillus*, *Pantoea*, *Arthrobacter* e *Microbacterium*. Esses gêneros são bem relatados na literatura como grupos associados a funções

importantes para plantas, e os nossos resultados corroboraram com relatos a partir dos resultados dos testes de triagem.

Nas triagens para produção de compostos com capacidade de promoção de crescimento de plantas, vários isolados se mostraram eficientes como PGPR pois, do total de 28 isolados, apenas 8 não foram positivos a nenhum ou foram a apenas um dos testes realizados, sendo mais de 70 % com atividade em dois ou mais testes, incluindo isolados afiliados aos gêneros mais abundantes, em que 7 se destacaram nos testes quantitativos. Esses isolados são promissores do ponto de vista de bioestimulação vegetal, sobretudo em áreas degradadas, uma vez que foram isolados deste tipo de ambiente e apresentaram boa atividade, *in vitro*, em testes-chave como FBN, solubilização de fosfato, produção e AIA e giberelinas. Todos esses isolados, sobretudo os que apresentaram atividade de produção de fitormônios, são promissores para testes *in vivo*, consorciados entre si ou individuais, para verificação de sua real atividade de promoção de crescimento vegetal. Assim, poderá ser possível o estabelecimento de uma formulação de inoculante a ser utilizado, principalmente para potencializar o estabelecimento vegetal em áreas mais exigentes, como solos degradados por atividade de mineração de ferro.

4. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho avaliou bioindicadores microbiológicos de solos afetados pelo rejeito de mineração de ferro, após o rompimento da barragem B1 em Brumadinho, visando a caracterização e o monitoramento da área afetada Remanso 1B durante o processo de reabilitação. Adicionalmente, a prospecção de potenciais PGPRs sob a perspectiva do estabelecimento de melhorias em métodos de reabilitação de áreas degradadas também foi feita, já que normalmente as práticas de reabilitação ou recuperação de áreas envolvem o restabelecimento da vegetação no local.

A análise dos bioindicadores utilizados, relevaram diferenças significativas entre as duas áreas estudadas, sobretudo, na primeira coleta (março/2022), indicando um cenário de estresse ambiental na área afetada. Em Março de 2022, a área afetada apresentou os menores valores associados ao tamanho da comunidade microbiana, menor eficiência de aproveitamento do carbono devido a taxa de respiração microbiana mais elevada, e até mesmo diferenças estatísticas na abundância relativa

de alguns grupos microbianos. No entanto, os bioindicadores avaliados ao longo das três coletas foram capazes de capturar um aumento gradativo de similaridade entre a área afetada e a referência local, mostrando a ocorrência de reabilitação do solo em que, os indicadores relacionados às funções microbianas no solo, como CBM, RBM, qCO₂ e atividade enzimática deixaram de apresentar diferenças estatísticas significativas no decorrer do tempo de estudo. Desse modo, o CBM, qCO₂ e a atividade da urease e da arilsulfatase foram os bioindicadores mais eficientes para apontar os processos de reabilitação da área estudada.

A análise da comunidade microbiana do solo revelou a presença de espécies indicadoras associadas aos ambientes avaliados, apontando a presença de grupos específicos relacionados a resistência a estresse abiótico e à promoção de crescimento de plantas na área afetada. Esta análise apontou dois gêneros, *Gemmatimonas* e *Acidothermus*, como um potencial para serem utilizados como marcadores no monitoramento do processo de reabilitação, uma vez que os mesmos apareceram em ambas as áreas referência e afetada. Esses resultados também demonstram que a contaminação por rejeitos de mineração de ferro alterou a microbiota do solo, que as diferenças entre as duas áreas foram atenuadas ao longo do tempo, e que a comunidade microbiana, do ponto de vista estrutural, foi parcialmente modulada.

A prospecção de PGPRs de plantas da área afetada, revelou a existência de 20 isolados promissores do ponto de vista de revegetação de áreas degradadas, cuja maioria tiveram bom desempenho nos testes de triagem *in vitro*, sendo muitos desses isolados afiliados aos gêneros mais abundantes dentro do conjunto total dos isolados obtidos. Adicionalmente, o isolamento das bactérias 3 e 32, que apesar de não ter uma definição taxonômica precisa, tiveram bom desempenho nos testes da triagem, o que enseja novos estudos de caracterização filogenética, podendo se tratar, inclusive, do isolamento de novas espécies.

Portanto, este estudo reafirma o uso dos bioindicadores microbiológicos como ferramentas rápidas de aferição e monitoramento de qualidade dos solos, principalmente em áreas impactadas por atividade de mineração, e reforça a possibilidade de utilização de PGPRs em processos de revegetação de áreas degradadas, que normalmente representam solos mais exigentes do ponto de vista do crescimento e manutenção de plantas.

REFERÊNCIAS

- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Siderophores: a microorganism's answer. *Quím. Nova*, v. 25, n. 6b, 2002.
- CHERIF-SILINI, H. et al. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology*, v. 66, p. 1087–1097, 2016.
- CORDERO, I.; PUEYO, J. J.; RINCÓN, A. Bio-fertilisation with native plant growth promoting rhizobacteria increases the tolerance of the neotropical legume tree *Caesalpinia spinosa* to water deficit. *Forest Ecology and Management*, v. 558, 121786, 2024.
- CRUZ, A. T.; CAZACU, A. C.; ALLEN, C. H. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 6, p. 1989–1992, 2007.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como Isolar e Identificar Bactérias Diazotróficas de Plantas Não-Leguminosas. Embrapa SPI, 1995.
- EI, S. L. Study on gibberellin and gibberellin-like substances from endophytes and their effect on maize plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 55, 102979, 2024.
- GANESH, J. et al. Exploration of the rhizosphere microbiome of native plant *Ceanothus velutinus* – an excellent resource of plant growth-promoting bacteria. *Front. Plant Sci.*, v. 13, 2022.
- GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, v. 61, n. 2, p. 793-796, 1995.
- GRAPPELLI, A.; ROSSI, W. The effect of phytohormones produced by *Arthrobacter* sp. on the phosphatase activity in plant roots. *Folia Microbiol*, v. 26, p. 137–141, 1981.
- HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil*, v. 312, p. 7–14, 2007.
- HEO, A. Y.; KOO, Y. M.; CHOI, H. W. Biological control activity of plant growth promoting rhizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 against tomato fusarium wilt and bacterial speck diseases. *Biology (Basel)*, v. 11, n. 4, 619, 2022.

- HINSINGER, P. et al. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist*, v. 168, p. 293-303.
- HUGO, A. P.; NEWBERGER, D.; VIVANCO, J. M. The rhizosphere microbiome: plant-microbial interactions for resource acquisition. *J Appl Microbiol*, v. 133, n. 5, p. 2864–2876, 2021.
- JHA, C. K.; SARAF, M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *E3 Journal of Agricultural Research and Development*, v. 5, n. 2, p. 108-119, 2015.
- JONES, D.; KEDDIE, R. M. The Genus *Arthrobacter*. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006.
- JUNIOR, F. B. R. et al. “Beta-Rizóbios” os novos simbioses encontrados em espécie de Mimosa. *Embrapa Cerrados*, p. 20, 2006.
- KHAN, N. et al. Insights into the interactions among roots, rhizosphere, and rhizobacteria for improving plant growth and tolerance to abiotic stresses: a review. *Cells*, v. 10, n. 6, 1551, 2021.
- LARD, M. et al. Competition experiments for legume infection identify *Burkholderia phymatum* as a highly competitive β -Rhizobium. *Front. Microbiol.*, v. 8, 2017.
- LOTFI, N. et al. Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in Persian walnut associated with drought stress tolerance. *Scientific Reports*, v. 12, n. 12725, 2022.
- LUZIATELLI, F. et al. Metabolites secreted by a plant-growth-promoting *Pantoea agglomerans* strain improved rooting of *Pyrus communis* L. cv Dar Gazi cuttings. *Front. Microbiol.*, v. 11, 2020.
- LV, L. et al. Beneficial effect and potential risk of *Pantoea* on rice production. *Plants (Basel)*, v. 11, n. 19, 2608, 2022.
- MACMILLAN, J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *J Plant Regul*, v. 20, p. 387-442, 2002.
- MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, v. 8, n. 7, 1037, 2020.
- MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, v. 13, n. 3.

- MORIN, A.; PARVEEN, Z. Pantoea. Encyclopedia of Food Microbiology. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/pantoea>. Acesso em: 19 abr. 2024.
- MURATONA, A. et al. Effect of heavy-metal-resistant PGPR inoculants on growth, rhizosphere microbiome and remediation potential of *Miscanthus giganteus* in zinc-contaminated soil. *Microorganisms*, v. 11, n. 6, 1516, 2023.
- PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. *Bacillus* species: the dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. *Microbiological Research*, v. 152, n. 4, p. 359-365.
- PATEL, M. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria *Curtobacterium oceanosedimentum* improves growth attributes and strengthens antioxidant system in chili (*Capsicum frutescens*). *Sustainability*, v. 14, n. 7, 4335, 2022.
- RODRIGUES, A. A. et al. Isolation and screening for multi-trait plant growth promoting Actinobacteria from organic sugarcane rhizosphere. *International Journal of Microbiology Research*, v. 10, n. 5, p. 1193-1198.
- SALAZAR-CEREZO, S. et al. Gibberellin biosynthesis and metabolism: a convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, v. 208, p. 85-98, 2018.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Letters in Applied Microbiology*, v. 20, p. 282-285, 1995.
- SAYYED, R. Z. et al. Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. In: CHINCHOLKAR, S. B.; REDDY, M. S.; GANGURDE, N. S.; PATEL, P. R. (Eds.). *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 449-467, 2013.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, v. 160, p. 47-56, 1987.
- SELLSTEDT, A.; RICHAU, K. H. Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic *Frankia*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 342, n. 2, p. 179–186, 2013.
- SHI, X. et al. Insights into plant–microbe interactions in the rhizosphere to promote sustainable agriculture in the new crops era. *New Crops*, v. 1, 100004, 2024.
- SHI, Z. et al. Screening of high-efficiency nitrogen-fixing bacteria from the traditional Chinese medicine plant *Astragalus mongolicus* and its effect on plant growth promotion and bacterial communities in the rhizosphere. *BMC Microbiology*, v. 23, 292.

- SILPA, D. et al. Studies on gibberellic acid production by *Bacillus licheniformis* DS3 isolated from banana field soils. *Int J S Res Sci. Tech*, v. 4, n. 5, p. 1106-1112, 2018.
- SILVA, M. J. C. et al. IAA production of indigenous isolate of plant growth promoting rhizobacteria in the presence of tryptophan. *AJCS*, v. 14, n. 3, p. 537-544.
- SLIMANI, I.; ZHU-BARKER, X.; LAZICKI, P.; HORWATH, W. Reviews and syntheses: Iron – a driver of nitrogen bioavailability in soils? *Biogeosciences*, v. 20, p. 3873–3894, 2023.
- SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazon*, v. 12, p. 15–22, 1982.
- UPADHYAY, S. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria: a potential bio-asset for restoration of degraded soil and crop productivity with sustainable emerging techniques. *Environ Geochem Health*, v. 45, n. 12, p. 9321-9344, 2023.
- WHITE, L. J.; BRÖZEL, V. S.; SUBRAMANIAN, S. Isolation of rhizosphere bacterial communities from soil. *Bio-Protocol*, v. 5, n. 16, e1569, 2014.
- XU, D.; LI, X.; CHEN, J.; LI, J. Research progress of soil and vegetation restoration technology in open-pit coal mine: a review. *Sustainability*, v. 13, 226, 2023.

APÊNDICE A

Tabela S1 – Valores absolutos de Março 2022: CBM ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$); RBM ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); FA: Fosfatase ácida ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); FL: Fosfatase alcalina ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); βG : β -Glicosidase ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); AR: Arilsulfatase ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); UR: Urease ($\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

		Março 2022							
		CBM	RBM	qCO ₂	FA	FL	βG	AR	UR
Área afetada		36,23	15,91	0,44	66,67	82,36	10,75	12,86	6,02
		75,27	17,95	0,24	125,91	122,98	19,51	29,69	11,94
		26,42	10,06	0,38	153,95	23,78	9,52	10,01	3,23
		77,16	7,00	0,09	208,85	24,75	11,67	7,26	2,19
		118,39	13,88	0,12	83,11	78,04	13,07	10,37	2,62
		67,98	6,11	0,09	134,83	14,49	7,16	3,24	3,26
		17,40	8,40	0,48	104,28	18,96	13,50	10,10	3,66
		118,24	7,38	0,06	152,82	11,64	15,31	12,38	4,72
		25,43	7,00	0,28	105,68	32,57	3,59	1,03	3,60
		23,81	10,44	0,44	176,60	12,42	10,28	9,67	1,60
		25,17	6,37	0,25	107,11	9,38	4,68	4,33	1,38
		89,36	7,64	0,09	166,33	10,36	11,34	12,00	2,43
		32,91	5,73	0,17	76,28	13,54	6,89	1,09	3,09
		24,71	8,66	0,35	177,21	17,94	13,14	18,90	5,57
	Referência		151,95	18,72	0,12	240,56	175,34	65,01	129,80
		256,35	12,35	0,05	215,11	116,55	40,70	80,97	31,16
		118,24	7,38	0,06	152,82	11,64	15,31	12,38	4,72
		221,40	20,88	0,09	227,83	137,36	47,16	107,07	36,95
		110,93	15,28	0,14	201,89	46,27	53,52	73,24	19,85
		226,67	16,81	0,07	694,12	127,73	65,98	71,62	27,26

Tabela S2 – Valores absolutos de Março 2022: CBM ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$); RBM ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); FA: Fosfatase ácida ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); FL: Fosfatase alcalina ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); βG : β -Glicosidase ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); AR: Arilsulfatase ($\text{mg p-nitrofenol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); UR: Urease ($\text{mg N-NH}_4^+\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

		Setembro 2022							
		CBM	RBM	qCO2	FA	FL	βG	AR	UR
Área afetada		176,26	46,47	0,26	48,39	72,75	3,00	2,76	35,08
		144,11	45,32	0,31	81,18	94,34	12,66	12,08	31,21
		142,39	36,41	0,26	54,47	26,92	0,50	1,80	1,29
		123,63	29,28	0,24	95,28	22,58	5,12	2,86	1,41
		250,92	31,06	0,12	60,31	58,52	8,36	5,89	14,54
		114,63	38,39	0,33	85,87	16,33	0,30	2,67	7,59
		144,74	37,24	0,26	81,61	20,71	2,57	0,75	12,31
		168,99	37,62	0,22	97,27	19,31	10,40	2,80	14,47
		338,52	42,78	0,13	87,52	39,47	1,88	0,83	2,02
		369,88	41,06	0,11	133,12	24,52	1,00	1,13	3,36
		137,05	44,69	0,33	121,41	24,51	12,51	1,26	9,90
		156,39	43,73	0,28	79,25	29,56	5,11	0,89	2,14
		95,01	40,30	0,42	138,92	17,71	15,72	3,03	8,18
	Referência		166,42	33,61	0,20	49,63	14,85	2,04	1,75
		283,78	41,44	0,15	218,75	22,92	17,00	34,99	39,92
		441,69	47,36	0,11	214,14	119,67	12,15	40,74	77,59
		282,33	47,74	0,17	191,31	94,99	60,42	50,71	85,36
		157,49	50,42	0,32	196,68	38,31	14,05	18,22	54,02
		245,33	48,32	0,20	177,36	48,50	17,94	18,15	33,66

Tabela S3 – Valores absolutos de Março 2022: CBM ($\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$); RBM ($\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); FA: Fosfatase ácida ($\text{mg p-nitrofenol} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); FL: Fosfatase alcalina ($\text{mg p-nitrofenol} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); β G: β -Glicosidase ($\text{mg p-nitrofenol} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); AR: Arilsulfatase ($\text{mg p-nitrofenol} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); UR: Urease ($\text{mg N-NH}_4^+ \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

		Março 2023							
		CBM	RBM	qCO2	FA	FL	β G	AR	UR
Área afetada		91,95	32,72	0,36	89,13	123,06	22,28	5,34	16,09
		80,01	26,74	0,33	45,83	147,83	5,07	2,59	23,51
		118,11	26,48	0,22	100,92	102,79	26,23	4,89	12,15
		149,65	24,32	0,16	135,99	25,09	8,06	5,15	9,34
		125,46	31,45	0,25	91,83	147,58	35,72	6,13	3,98
		56,01	26,48	0,53	51,87	21,48	13,00	1,64	17,12
		87,59	24,19	0,28	32,90	19,46	3,99	1,70	11,90
		89,04	22,79	0,41	95,66	26,05	9,97	3,83	29,83
		68,70	27,88	0,12	61,70	28,64	12,25	3,45	4,05
		135,91	25,59	0,37	94,54	28,08	12,64	4,42	16,93
		90,25	24,44	0,27	107,46	40,24	8,76	2,47	38,03
		99,30	29,79	0,22	20,37	19,16	5,57	1,58	10,36
		332,58	31,96	0,10	31,18	35,27	12,17	1,10	10,28
		130,21	28,39	0,22	116,98	23,33	6,44	3,73	27,88
Referência		64,01	36,92	0,58	81,61	132,11	31,15	6,79	88,00
		50,41	28,52	0,23	199,73	140,26	38,31	33,91	122,24
		227,96	25,97	0,29	198,81	117,48	22,89	24,06	52,01
		165,05	25,08	0,15	189,43	121,66	36,61	27,03	124,26
		157,07	24,57	0,16	160,57	78,89	18,60	16,63	137,95
		133,76	24,70	0,18	180,49	84,17	26,33	15,13	113,54

Figura S1 – Colônia de isolados com melhor desempenho nos testes *in vitro* para promotores de crescimento vegetal. a) Isolado 3, melhor potencial de produção de GA; b) Isolado 5, positivo para um maior numero de testes; c) Isolado 6, melhor desempenho na produção de sideróforos e solubilização de fosfato; d) Isolado 9, melhor potencial de produção de AIA; e) Isolado 38, Fixação de Nitrogênio; f) Isolado 63, Fixação de Nitrogênio

