

HELENA SANTIAGO LIMA

**BIOMONITORAMENTO E RECONHECIMENTO DE PADRÕES DA
COMUNIDADE BACTERIANA EM ÁREAS IMPACTADAS PELO ROMPIMENTO
DA BARRAGEM DE FUNDÃO (MARIANA-MG)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

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

T

L732m
2019

Lima, Helena Santiago, 1994-

Biomonitoramento e reconhecimento de padrões da comunidade bacteriana em áreas impactadas pelo rompimento da barragem de Fundão (Mariana-MG) / Helena Santiago Lima. – Viçosa, MG, 2019.

ix, 83 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Solos - Qualidade - Indicadores. 2. Diversidade microbiana. 3. Ativação enzimática. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

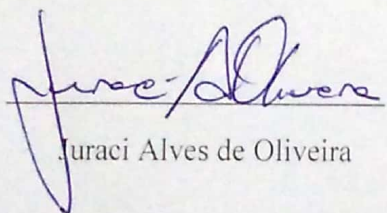
CDD 22. ed. 631.4

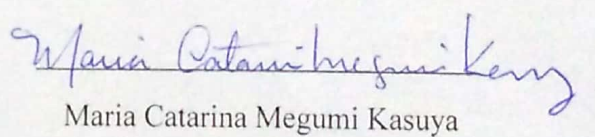
HELENA SANTIAGO LIMA

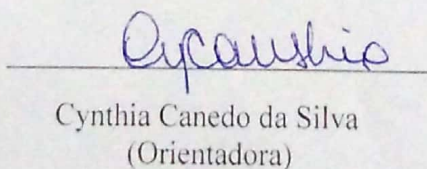
**BIOMONITORAMENTO E RECONHECIMENTO DE PADRÕES DA
COMUNIDADE BACTERIANA EM ÁREAS IMPACTADAS PELO
ROMPIMENTO DA BARRAGEM DE FUNDÃO (MARIANA-MG)**

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

APROVADA: 26 de fevereiro de 2019.


Juraci Alves de Oliveira


Maria Catarina Megumi Kasuya


Cynthia Canedo da Silva
(Orientadora)

Dedico esta dissertação a minha família, em especial minha mãe Silvana, vó Cotita, irmã Marina e sobrinhos, Laura e Murilo. A eles, todo meu amor e minha gratidão.
Ora at Labora!

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa vencida. Agora mudam-se as metas e as expectativas para novas conquistas. Sei o quanto é importante as pessoas na nossa caminhada, não há profissional capaz de levar a vida isoladamente e é com essa certeza que agradeço a Deus e aqueles que me ajudaram a vencer essa etapa. À minha família, peça fundamental nessa caminhada, só tenho a agradecer. Mãe, obrigada pelo seu amor incondicional. Vó, você que viveu esse sonho comigo e hoje estamos realizando. Minha irmã Marina que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis. Meus sobrinhos, Laura e Murilo, que me fizeram querer ser uma pessoa melhor. Minha madrinha que sempre me ensinou o caminho. Ao meu padrasto Léo que é um exemplo a ser seguido. Aos meus tios e tias, primos e primas, meu muito obrigada! Aos meus amigos de São João, em especial a Laura e Albaline, vocês fazem parte da minha família, vivemos, sofremos e vencemos juntos! A galera do lab LIVM, onde passei muitos momentos divertidos, obrigada pelos ensinamentos. Tenho me espelhado em muitos de vocês. A Lívia, que é uma irmã que vou levar para o resto da vida, obrigada por ouvir, rir e chorar comigo. A minha orientadora Cynthia, obrigada pela oportunidade e apoio. A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia que me proporcionaram a oportunidade de crescimento profissional e pessoal. A CNPq, FAPEMIG, CAPES/PROEX001 pelo financiamento do projeto. Finalizo com a certeza de que o futuro dependerá só daquilo que tenho construído no presente.

RESUMO

LIMA, Helena Santiago, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019.
Biomonitoramento e reconhecimento de padrões da comunidade bacteriana em áreas impactadas pelo rompimento da barragem de Fundão (Mariana-MG).
Orientadora: Cynthia Canedo da Silva.

As atividades de mineração são conhecidas por resultarem em danos extensivos ao solo, causando distúrbios drásticos na paisagem, alterando o ambiente e a comunidade microbiana. Em novembro de 2015 ocorreu a ruptura da barragem do Fundão localizada no município de Mariana-MG, liberando um volume estimado de 43 milhões de m³ de rejeito de mineração na Bacia do Rio Doce resultando em grandes perdas socioeconômicas, humanas e ambientais. A multifuncionalidade do solo foi perdida devido a deposição de uma grande camada de rejeito e para recuperação destas funções, os microrganismos do solo têm um papel fundamental. Assim, esse trabalho teve como objetivos avaliar ao longo do tempo o comportamento da comunidade microbiana, bem como sua atividade em resposta em solos afetados pelo rejeito e prever como a estrutura da comunidade microbiana e sua atividade metabólica se comportam mediante a um impacto ambiental é fundamental para realizar o monitoramento do real impacto nessas áreas, bem como auxiliar nas tomadas de decisão para otimizar o processo de recuperação. Para isso foi realizado o acompanhamento das atividades enzimáticas de fosfatase ácida, alcalina e β -glicosidase, carbono da biomassa microbiana, respiração basal do solo e composição e funções da comunidade microbiana, com o intuito de monitorar a recuperação das áreas afetadas pelo desastre. As enzimas fosfatase ácida e β -glicosidase e o carbono da biomassa foram os indicadores mais sensíveis para mostrar diferenças entre as áreas, sendo que apresentaram maior atividade nas áreas de florestas. Das variáveis químicas o pH, fósforo e saturação por base foram mais relacionados com a área de rejeito, enquanto matéria orgânica, CTC e alumínio com as áreas de floresta. As regiões mais próximas do local da barragem tiveram maiores alterações nos atributos microbiológicos e químicos do solo. A matéria orgânica e o carbono da biomassa microbiana foram as variáveis mais importantes para separar as áreas afetadas e não afetadas pela deposição do rejeito de mineração através da construção do modelo preditivo. Os resultados mostraram que a comunidade microbiana das áreas afetadas pelo rejeito de mineração apresentou uma recuperação ao longo do tempo, mas ainda

é possível notar de forma significativa os efeitos da deposição de rejeito nas atividades microbiológicas avaliadas, como a estrutura da comunidade bacteriana e as características químicas do solo. Sendo de extrema importância, o monitoramento e estimulação das comunidades microbianas para a recuperação do solo dessas áreas afetadas para que se torne possível o reestabelecimento do ecossistema na região. Os indicadores microbiológicos de qualidade do solo foram muito eficientes para demonstrar mudanças microbiológicas nas áreas impactadas, favorecendo a utilização dos mesmos como ferramenta para avaliar a recuperação dessas áreas impactadas pelo rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem de Fundão.

ABSTRACT

LIMA, Helena Santiago, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Biomonitoring and pattern recognition in the bacterial community in areas impacted by the collapse of the Fundão dam (Mariana-MG).** Adviser: Cynthia Canedo da Silva.

Mining activities are known to result in extensive damage to the soil, causing drastic disturbances in the landscape, altering the environment and the microbial community. In November 2015, the Fundão dam was disrupted, located in the municipality of Mariana-MG, releasing an estimated 43 million cubic meters of mining tailings in the Rio Doce Basin resulting in large socioeconomic, human and environmental losses. The multifunctionality of the soil was lost due to the deposition of a large tailings layer and to recover these functions the soil microorganisms play a fundamental role. The objective of this work was to evaluate over time the behavior of the microbial community as well as its response activity in soils affected by the tailing and to predict how the structure of the microbial community and its metabolic activity behave through an environmental impact is fundamental to monitor the real impact in these areas, as well as assist in decision making to optimize the recovery process. The monitoring of the enzymatic activities of acid phosphatase, alkaline and β -glucosidase, microbial biomass carbon, soil basal respiration and composition and functions of the microbial community were carried out to monitor the recovery of the areas affected by the disaster. The enzymes acid phosphatase and β -glycosidase and biomass carbon were the most sensitive indicators to show differences between the areas, being that they presented greater activity in the forest areas. From the chemical variables the pH, phosphorus and base saturation were more related to the tailings area, while organic matter, CTC and aluminum with the forest areas. The regions closer to the site of the dam break had greater changes in soil microbiological and chemical attributes. The organic matter and carbon of the microbial biomass were the most important variables to separate the affected and unaffected areas by the deposition of the mining tailings through the construction of the predictive model. The results showed that the microbial community of the areas affected by the mining tailings showed a recovery over time, but it is still possible to notice significantly the effects of the tailings deposition on the microbiological activities evaluated, such as the bacterial community structure

and the characteristics chemical properties of the soil. Being of extreme importance, the monitoring and stimulation of the microbial communities for the recovery of the soil of these affected areas so that it becomes possible the reestablishment of the ecosystem in the region. The microbiological indicators of soil quality were very efficient to demonstrate microbiological changes in the impacted areas, favoring the use of them as a tool to evaluate the recovery of these areas impacted by the mining tailings from the rupture of the Fundão dam.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
Avaliação de atributos microbiológicos do solo em áreas impactadas pela deposição de rejeito de mineração proveniente da ruptura da barragem do Fundão, Mariana-MG	3
1. Introdução	5
2. Material e Métodos	7
2.1. Local de estudo e amostragem	7
2.2. Análises químicas do solo	8
2.3. Indicadores de Qualidade do solo	8
2.4. Extração de DNA total do solo	11
2.5. Sequenciamento	11
2.6. Análises estatísticas	12
3. Resultados e discussão	12
3.1. Análise dos indicadores de qualidade do solo	12
3.2. Análise da estrutura da comunidade funcional do solo	22
3.3. Análise do perfil funcional putativo	31
4. Conclusões	34
Referências	36
Material Suplementar	44
CAPÍTULO 2	50
Distribuição de atributos microbiológicos e reconhecimento de padrões em solos impactados com rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem do Fundão, Mariana-MG	50
1. Introdução	52

2. Material e Métodos	54
2.1. Local de estudo e amostragem.....	54
2.2. Análises químicas e físicas do solo.....	54
2.3. Indicadores de Qualidade do solo.....	55
2.4. Extração de DNA total do solo	57
2.5. Análises estatísticas	57
2.6. Aprendizado de máquinas.....	58
3. Resultados e discussão	58
3.1. Avaliação dos indicadores microbiológicos de qualidade do solo	58
3.2. Correlação entre características químicas e atributos microbiológicos do solo	64
3.3. Correlação entre áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito por meio de índices de qualidade do solo	67
3.4. Construção do modelo preditivo através de aprendizagem de máquinas	70
4. Conclusões	72
Referências	73
Material Suplementar	80
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	82

INTRODUÇÃO GERAL

Em novembro de 2015 ocorreu a ruptura da barragem do Fundão de rejeitos de mineração de ferro, pertencente à mineradora Samarco, localizada na cidade de Mariana-MG. Essa barragem possuía o volume de 43,7 milhões de m³ de rejeito que foram despejados diretamente na Bacia do Rio Doce, sendo apontado como o maior desastre ambiental conhecido do Brasil. A onda de rejeito atingiu os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, percorrendo 668 quilômetros desde o local do rompimento até chegar ao Oceano Atlântico, onde sedimentos finos suspensos se espalharam por quilômetros na costa brasileira, acarretando grandes prejuízos humanos, socioeconômicos e principalmente, ambientais e ecológicos na Mata Atlântica que é considerada *hotspot* mundial de biodiversidade.

A recuperação completa de uma área impactada não caracteriza-se somente pela remoção do poluente, é necessário também a restauração da multifuncionalidade do ecossistema, que são mantidas principalmente pelos microrganismos do solo. Estes desempenham papel chave na participação de diversas funções ecológicas, como ciclagem de nutrientes, formação de associações biológicas com plantas, animais e outros microrganismos e no desempenho de serviços ambientais, que são serviços que a natureza fornece ao homem e que são de fundamental importância para sua sobrevivência, especialmente necessários após perturbações antrópicas.

As atividades de mineração são conhecidas por resultarem em danos extensivos ao solo, causando distúrbios drásticos na paisagem, alterando o ambiente e a comunidade microbiana do solo, reduzindo a diversidade, a riqueza e a capacidade funcional proporcionada pelos microrganismos no solo. A perda da

diversidade pode estar relacionada com a perda de algumas funções ecológicas específicas que podem pôr em risco todo o processo de recuperação de ambientes degradados.

Ser capaz de prever como a comunidade microbiana e sua atividade metabólica se comporta mediante a um impacto ambiental torna-se fundamental para realizar o monitoramento do real impacto nessas áreas, bem como auxiliar nas tomadas de decisão para otimizar o processo de recuperação. Para isso é importante entender a interação entre ambiente e comunidade microbiana, ou seja, como o ambiente influencia a comunidade e vice-versa.

Atualmente, com o advento das tecnologias de sequenciamento *high throughput* (HTS) tem-se ficado cada vez mais eficiente e de baixo custo, o monitoramento da composição de comunidades residentes no solo, além disso, com essa tecnologia também é possível verificar ou inferir as funções ecológicas que foram afetadas e/ou estão sendo recuperadas neste solo. Assim este trabalho teve como objetivos monitorar a comunidade microbiana presentes nas áreas impactadas pelo rejeito submetidas e não submetidas à programas de revegetação através do sequenciamento HTS de amostras de DNA do solo e por indicadores biológicos da qualidade do solo, e utilizar estas informações para encontrar marcadores microbianos importantes para serem aplicados no restabelecimento das funcionalidades do solo. E com auxílio destes dados, estabelecer um modelo preditivo, por meio de aprendizado de máquina, que permita reconhecer padrões de alterações nos solos afetados pela deposição do rejeito que possam ser utilizados como índices para avaliação da retomada ou não das multifuncionalidades dos solos afetados pelo rompimento da barragem de Fundão.

CAPÍTULO 1

Avaliação de atributos microbiológicos do solo em áreas impactadas pela deposição de rejeito de mineração proveniente da ruptura da barragem do Fundão, Mariana-MG

Helena Santiago Lima^a, João Paulo Campos Moura Cavalcante^b, Lívia Carneiro Fidélis Silva^c, Gustavo Sampaio de Lima Martins^d, Marcos Rogério Tótola^e, Maria Catarina Megumi Kasuya^f, Cynthia Canêdo da Silva^{g*}.

^a Pós-graduação, Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (hsantiagolima@gmail.com)

^b M. Sc., Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (jpcamposmc@gmail.com)

^c Ph. D., pesquisadora, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (livia.silva@ufv.br)

^d M. Sc., Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (gustavo.samppaio@gmail.com)

^e Ph. D., Professor, Departamento de microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (totola@ufv.br)

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

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

*Autor correspondente: e-mail: ccanedo@ufv.br Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Viçosa - MG, 36570-900, Tel.: +55 (31) 3899-2973.

Resumo: Em novembro de 2015 ocorreu à ruptura da barragem do Fundão localizada no município de Mariana-MG, liberando um volume estimado de 43 milhões de m³ de rejeito de mineração que se caracterizou como o pior desastre ambiental conhecido no Brasil e no mundo. A deposição do rejeito de mineração gera impactos drásticos no solo, alterando o ambiente e como consequência a comunidade microbiana e a sua estabilidade funcional. A microbiota desempenha um papel fundamental no solo e devido a essas importantes funções do ecossistema que são mediadas pelos microrganismos, a recuperação da comunidade microbiana do solo é um passo crítico para alcançar a meta de restauração do solo para seu uso sustentável. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivos avaliar ao longo do tempo o comportamento da comunidade microbiana bem como sua atividade em resposta a deposição da camada de rejeito sobre o solo. Para isso foi realizado o acompanhamento das atividades enzimáticas de fosfatase ácida, alcalina e β -glicosidase, carbono da biomassa microbiana, respiração basal do solo e composição e funções da comunidade microbiana, com o intuito de monitorar ao longo do tempo, o processo de recuperação de áreas afetadas pelo rejeito de mineração (REC1) e afetadas, mas submetida à programas de revegetação (REC2). As áreas de florestas (UND), utilizadas como controle, como esperado apresentaram maiores valores para os atributos microbiológicos e também maiores atividades enzimáticas por biomassa, sendo que fosfatase ácida, β -glicosidase e carbono da biomassa microbiana foram os indicadores mais sensíveis para demonstrar as diferenças entre as áreas afetada e não afetadas. A estrutura da comunidade microbiana destas áreas também se diferiu, sendo que a área REC2 encontrou-se mais próxima a UND que REC1, isso mostra a importância da implementação de programas de revegetação para iniciar o processo de recuperação de áreas impactadas. Apesar das áreas impactadas com o rejeito de

mineração apresentarem uma melhora com o tempo, ainda é possível observar o forte efeito da deposição de rejeito que afetou de forma significativa as atividades microbiológicas e estrutura da comunidade bacteriana avaliadas nesse trabalho.

Palavras-chave: diversidade microbiana, fosfatases, β -glicosidase, respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana.

1. Introdução

Em novembro de 2015 ocorreu à ruptura da barragem do Fundão localizada no município de Mariana-MG, liberando um volume estimado de 43 milhões de m³ de rejeito de mineração na Bacia do Rio Doce que ocupa grande parte do bioma Mata Atlântica, se caracterizando como o pior desastre ambiental conhecido no Brasil e também no mundo, excedendo a magnitude dos acidentes anteriores nas Filipinas em 1982 (28 milhões m³) e 1992 (32,2 milhões m³), que até então eram considerados os maiores acidentes envolvendo rejeito de mineração (IBAMA, 2015; GFT, 2015; Samarco, 2016; Bowker, 2015).

A onda de rejeito atingiu os estados de Minas Gerais e Espírito Santo, percorrendo 668 quilômetros desde o local do rompimento até chegar ao Oceano Atlântico, onde sedimentos finos suspensos se espalharam por quilômetros na costa brasileira (Bianchini, 2016), acarretando grandes prejuízos humanos, socioeconômicos e principalmente, ambientais e ecológicos na Mata Atlântica que é considerada *hotspot* mundial de biodiversidade (Carnaval, 2009).

A deposição do rejeito de mineração gera impactos drásticos no solo, alterando o ambiente e como consequência a comunidade microbiana e a sua estabilidade funcional (Wang *et.al.*, 2009; Santos *et.al.*, 2016).

A microbiota do solo desempenha um papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos, decomposição e mineralização de materiais orgânicos, mantendo assim o fluxo dos processos ecológicos (Karlen *et. al.*, 2001). Devido a essas importantes funções no ecossistema, a recuperação da comunidade microbiana do solo é um passo crítico para alcançar a meta de restauração do mesmo e seu uso sustentável (Rana *et. al.*, 2007; Santos *et. al.*, 2016).

A avaliação da vegetação e dos atributos físico-químicos do solo tem sido os parâmetros mais utilizados para avaliar o processo de recuperação de áreas impactadas pela atividade de mineração (Santos *et. al.*, 2016; Hahn *et. al.*, 2013). Porém alterações na comunidade microbiana podem preceder mudanças em níveis perceptíveis das propriedades físico-químicas do solo, tornando-se um parâmetro mais sensível para detecção de estresse ambiental e/ou recuperação do ambiente na área impactada pela mineração (Dangi *et. al.*, 2012; Upadhyay *et al.*, 2017). Entretanto, estudos avaliando a diversidade e atividade microbiana nessas áreas são escassos, muitas vezes não fica claro como a abundância e a composição das comunidades microbianas se correlacionam com a recuperação e interação para afetar os processos do ecossistema.

Esse trabalho teve como objetivos avaliar ao longo do tempo o comportamento da comunidade microbiana, bem como sua atividade em resposta a deposição da camada de rejeito sobre o solo, através do acompanhamento das atividades enzimáticas de fosfatase ácida, alcalina e β -glicosidase, carbono da biomassa

microbiana, respiração basal do solo e composição e funções da comunidade microbiana, com o intuito de monitorar a evolução das áreas em processo de recuperação após o desastre causado pelo rompimento da barragem de Fundão.

2. Material e Métodos

2.1. Local de estudo e amostragem

O local de estudo foi Paracatu de Baixo (20°18'15" Sul e 43°13'51" Oeste), localizado aproximadamente a 50 Km da barragem do Fundão, com auxílio de técnicos da empresa Agroflor.

Foram utilizadas duas áreas afetadas pela deposição de rejeito em diferentes, estágios de revegetação, e uma área utilizada como referência, adjacente às duas áreas anteriores, porém, não afetada pela deposição de rejeito, sendo essas: i) área afetada pela deposição de rejeito sem programa de revegetação em andamento, mas com presença de revegetação natural (REC1), ii) área afetada, submetida a programa de revegetação (REC2) e iii) área referência adjacente (região de floresta) não afetada pela deposição do rejeito (UND).

A amostragem foi realizada nos meses de fevereiro e setembro de 2017 e março de 2018, representando as estações chuvosas (março) e secas (setembro). Para cada área foram coletadas três amostras compostas selecionadas de forma aleatória. Cada amostra composta foi constituída de 5 subamostras, coletadas numa área de 1,5 m², na profundidade de 0 a 15 cm, essas amostras foram acomodadas em sacos plásticos e estocadas a 10 °C para análises químicas e enzimáticas e a -80 °C para extração de DNA.

2.2. Análises químicas do solo

Para análises químicas de rotina, as amostras foram enviadas ao laboratório de análises de amostras de solo no Departamento de Solo, da Universidade Federal de Viçosa, seguindo a seguinte metodologia:

O pH foi determinado em água (relação 1:2,5 p/v), com o auxílio de um potenciômetro. Potássio (K) e fósforo (P) foram extraídos por solução bi-ácida composta por ácido sulfúrico e ácido hidrocloreídrico e determinados por fotometria de chama. Cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al) foram extraídos com uma solução neutra de cloreto de potássio (KCl, 1 mol.L⁻¹), o cálcio e magnésio foram medidos com espectrofotômetro de absorção atômica (Varian) com a adição de cloreto de estrôncio a 0,05, e o alumínio foi medido por titulação com hidróxido de sódio. A acidez potencial (H + Al) foi extraída utilizando solução neutra de acetato de cálcio (1N) por titulação e hidróxido de sódio (NaOH). A saturação de bases (V), capacidade de troca catiônica (CTC) e a soma de bases (SB) foram calculadas. A matéria orgânica (M.O.) foi quantificada pelo método colorimétrico e a medição do carbono orgânico foi obtida através da aproximação $C.O. = M.O. / 1,724$ (Defelipo & Ribeiro, 1981).

2.3. Indicadores de Qualidade do solo

2.3.1. Análises de atividade enzimática

As análises foram realizadas no laboratório de biotecnologia e biodiversidade ambiental/UFV. Para quantificar as atividades enzimáticas foram utilizadas somente as amostras coletadas em fevereiro/2017, as atividades enzimáticas das fosfatases, alcalina e ácida, e β -glicosidase foram medidas segundo os métodos colorimétricos propostos por Tabatabai (1994). Todos os ensaios utilizam um análogo de substrato

para realizar a quantificação da atividade enzimática, para as fosfatases foi utilizado o p-nitrofenil-fosfato (PNF), e para β -glicosidase, foi utilizado p-nitrofenil- β -D-glicosídeo (PNG). Os tampões utilizados tiveram o pH ajustado para o ótimo de cada enzima (pH 6,5 para fosfatase ácida e β -glicosidase e pH 11,0 para fosfatase alcalina).

Foi pesado 1 g de solo úmido de cada amostra e transferidos para dois tubos de ensaio, um utilizado para medir a atividade enzimática e outro utilizado como controle. Para cada amostra foi adicionado em seu respectivo tubo 0,25 mL de tolueno, 4 mL do tampão MUB (12,1 g de tris hidroximetil-aminometano, 11,6 g de ácido maleico, 14,0 g de ácido cítrico e 6,3 g de ácido bórico em 488 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ e diluir a solução para 1 L completando com água destilada), foi adicionado também 1mL do análogo de substrato (PNF ou PNG) na concentração de 25mM somente nos tubos contendo os tratamentos. Logo após, os tubos de ensaio foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 37 °C durante uma hora. Após o período de incubação, foram adicionados em todos os tubos 1 mL de CaCl₂ (0,5 M) e 4 mL THAM (Tris-hydroxymethyl-aminomethane) com pH ajustado para 12, foi adicionado também 1 mL do análogo de substrato (PNF ou PNG) na concentração de 25 mM somente nos tubos contendo os controles. Todos os tubos de ensaio foram agitados novamente e a solução de solo foi filtrada usando papel filtro. A absorbância do filtrado foi medida no comprimento de onda de 410 nm.

Para obtenção dos valores foi feito uma curva de calibração usando 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100 μ g de p-nitrofenol. Os valores obtidos foram corrigidos utilizando os controles e a umidade do solo.

2.3.2. Carbono da Biomassa microbiana

Para quantificar o carbono da biomassa microbiana foram utilizadas somente as amostras coletadas em fevereiro/2017, ele foi quantificado através do método da fumigação - extração proposto por Vance *et al.* (1987). Cada amostra foi pesada em duas subamostras contendo 10 g cada (massa úmida), a primeira subamostra foi utilizada como controle e a segunda foi utilizada para o processo de fumigação. As amostras foram colocadas no dessecador para fumigação, juntamente com 25 mL de clorofórmio e em um frasco separado 5 g de NaOH, seguido da aplicação de vácuo e incubação por 48 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram retiradas do dessecador, essas amostras juntamente com as amostras controles, que estavam estocadas, foram preparadas para o processo de extração do carbono. Para obtenção do extrato foram adicionados 25 mL de K_2SO_4 , na concentração de 0,5M, em seguida as amostras foram agitadas a 250 rpm, durante o período de 1 hora. Após o período de agitação, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram filtrados por meio de papel filtro.

O extrato filtrado posteriormente foi submetido a reação com permanganato de potássio, conforme proposto por Bartlett e Ross (1994) e em seguida, foi realizado a medição em espectrofotômetro no comprimento de onda de 495nm.

Para obtenção dos valores foi feito uma curva de calibração com ácido oxálico nas concentrações de 0, 6, 12, 18 e 24 mg L⁻¹ de carbono. Os valores obtidos foram corrigidos utilizando os controles e a umidade do solo.

2.3.3. Respiração basal do solo

Para quantificar a respiração basal do solo foram utilizadas somente as amostras coletadas em fevereiro/2017, utilizando o respirômetro automatizado com detector infravermelho (*Sable Systems – 54 Mod. TR-RM8 Respirometer Multiplexer*, USA), seguindo o proposto por Heinemeyer *et al.* (1989). Para isso foram adicionados 50 g de solo úmido, de cada amostra, em recipientes com capacidade de 500 mL, acoplados no respirômetro e incubadas durante um período de 96 h, na temperatura de 25 °C.

O quociente metabólico (qCO_2) foi calculado pela razão (respiração basal do solo)/(carbono da biomassa microbiano) proposto por Anderson e Domsch (1993).

2.4.Extração de DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído a partir de 0,5 g de amostra, usando o Kit *Nucleospin Soil* (Macherey-Nagel Laboratories, Germany), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1 %, corado com *Gel Red* (Biotium, USA), visualizado em transiluminador (Applied Biosystems, USA) e quantificado em *Nanodrop* (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc., USA).

2.5. Sequenciamento

As amostras foram enviadas para sequenciamento da região V4 do gene RNAr 16S na empresa Molecular Research DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, TX, USA) usando a plataforma MiSeq Illumina, com *reads paired-end* 150x150 pb.

A análise de qualidade das sequências foi testada utilizando o *software* FastQC, para timagem, agrupamentos em OTU e anotação foi utilizado o *software* Qiime e o

banco de dados SILVA versão 132, para as análises de diversidade, construção dos gráficos, análises multivariadas e estatísticas foram utilizados os *software* R, pacote ggplot2 (Wickham, 2009), e PAST. O banco de dados FAPROTAX (Louca *et.al.*, 2016) foi utilizado para mapear as OTUs para predizer as funções metabólicas ecologicamente relevantes.

2.6. Análises estatísticas

Para os dados gerados a partir dos experimentos de atividade enzimática, carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK, 1965). Como os dados não seguiram distribuição normal, todos os grupos foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis (KRUSKAL, 1952). Depois foram realizadas múltiplas comparações com o mesmo conjunto de dados aplicando o teste não paramétrico de Dunn (DUNN, 1958). Todas as análises estatísticas foram feitas no *software* R. Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados para indicar diferença estatística a 95 % de confiança.

3. Resultados e discussão

3.1. Análise dos indicadores de qualidade do solo

Os atributos microbiológicos do solo (atividade enzimática, carbono da biomassa e respiração basal) foram sensíveis para mostrar a diferença da atividade microbiana entre as áreas avaliadas (Figura 1), mostrando que as áreas afetadas pela deposição do rejeito, REC1 e REC2, ainda estão distantes da área de floresta, considerada como referência.

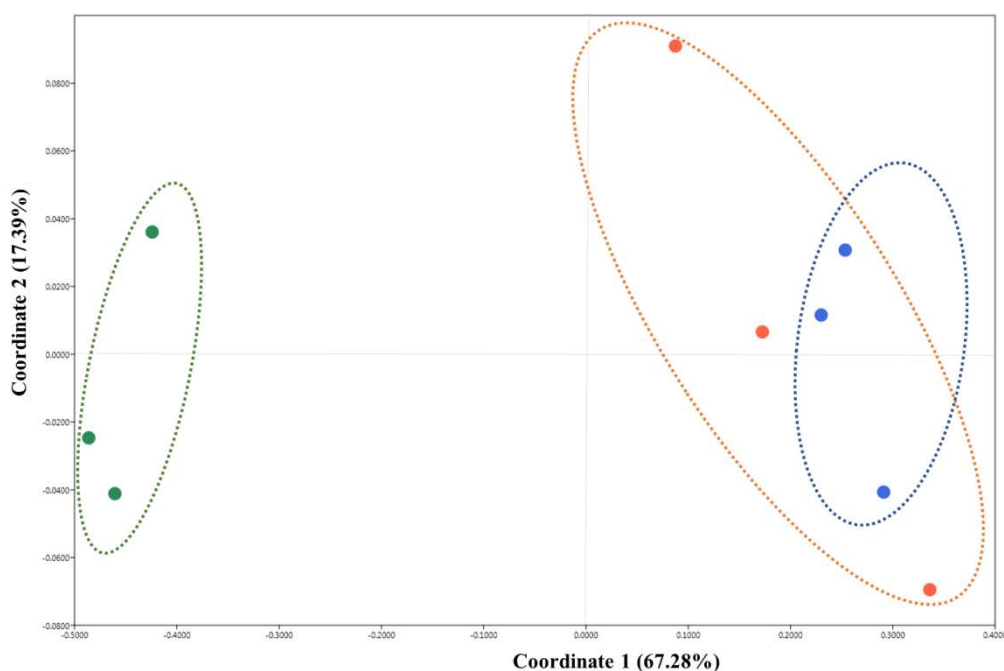


Figura 1. Análise de componente principal (PCA) usando os indicadores microbiológicos do solo. A cor verde corresponde a área UND – área de floresta não afetada pela deposição de rejeito, a laranja REC1 – área afetada pelo rejeito com revegetação natural e a azul, REC2 – área afetada pelo rejeito submetida a programa de revegetação.

O resultado da PCA explicou 84,67% (CP₁ 67,28% e CP₂ 17,39%) da variação entre as áreas (Figura 1), mostrando que os bioindicadores de qualidade do solo apresentam uma resposta rápida às mudanças que ocorrem no ambiente, por isso são amplamente utilizados como uma importante ferramenta para avaliar impactos ocorridos no solo (Wahsha, 2016; de Moraes Sá *et.al.*, 2018).

Quando as variáveis químicas do solo foram adicionadas na análise de multivariada e os resultados mostraram um incremento na explicação da variação entre as amostras, a explicação passou a ser de 99,11% (CP₁ 86,21% e CP₂ 12,90%) (Figura 2).

Possivelmente, isso ocorreu porque as variáveis ambientais possuem papel fundamental na regulação das atividades metabólicas que ocorrem no ambiente. O pH, Al + H, fósforo, CTC, saturação por base (V) e fosfatase ácida foram as variáveis que tiveram maior influência na composição do CP₁, que é o eixo responsável por apresentar o maior nível de explicação da variância entre as amostras (Tabela 1). Entre essas variáveis, as que tiveram maior influência nas áreas afetadas pelo rejeito foram o pH e o fósforo (Figura 2).

O pH apresentou valores mais alcalinos nas áreas afetadas pelo rejeito (Tabela S1). Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de serem adicionadas ao rejeito substâncias de caráter alcalino durante o processamento do minério, como eterminas, eterdiaminas, além de hidróxido de sódio. Então, uma vez que esse rejeito depositou-se no solo, o ambiente passou a ter tendência mais alcalina do que naturalmente era encontrado (Silva *et. al.*, 2006; Xiong *et. al.*, 2017).

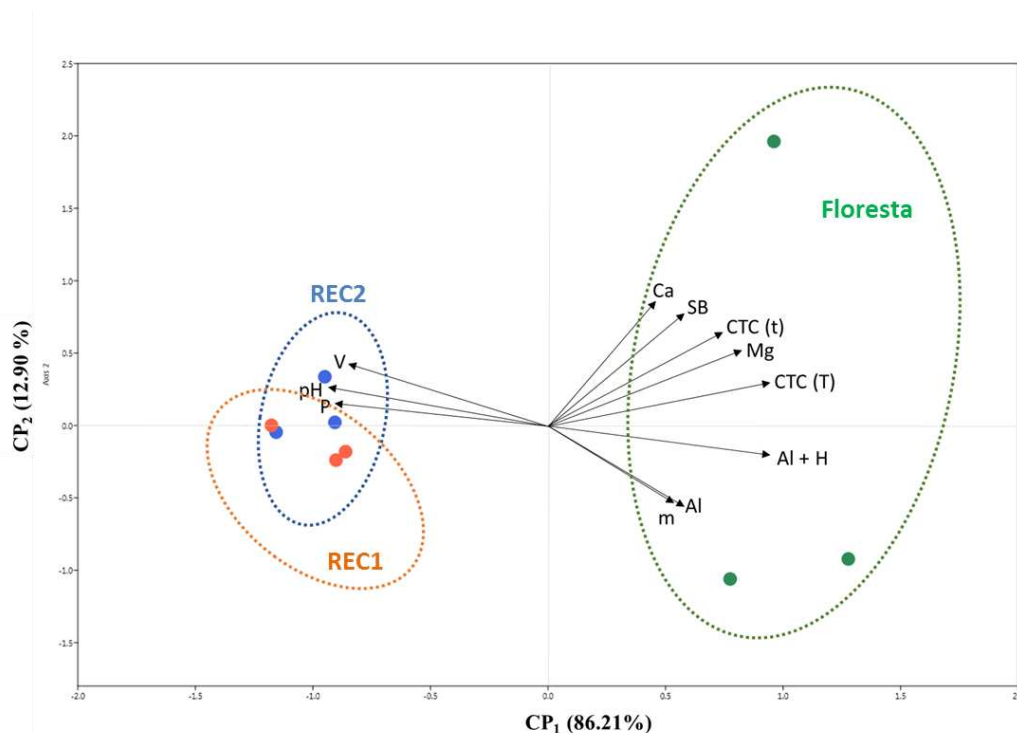


Figura 2. Análise de correspondência canônica (CCA) relacionando os indicadores microbiológicos com as variáveis ambientais. A cor verde corresponde a área UND – área de floresta não afetada pela deposição de rejeito, a laranja REC1 – área afetada pelo rejeito com revegetação natural e a azul REC2 – área afetada pelo rejeito com programa de revegetação implementado. V = saturação por base, P = fósforo, m = saturação por alumínio, Al = alumínio, CTC (t) = capacidade de troca catiônica efetiva, CTC (T) = capacidade de troca catiônica potencial, Mg = magnésio, SB = soma de bases e Ca = cálcio.

As concentrações de fósforo, também, foram mais elevadas nas áreas afetadas pelo rejeito, REC1 e REC2, quando comparadas com a área UND. O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento de qualquer organismo, porém, ocorre em baixa concentração nos solos brasileiros, pois os mesmos geralmente apresentam em elevado estágio de intemperismo (Silva *et al.*, 2006). Assim, como medida emergencial após o rompimento da barragem do Fundão, foi dado início a programas de revegetação, com isso foi realizado adubações nessas áreas, ocorrendo um

incremento de fósforo, o que explica as maiores concentrações desse elemento nas áreas estudadas (Agroflor, 2016).

Tabela 1. *Eigenvalues* referentes à CCA de atributos químicos e indicadores microbiológicos do solo das áreas UND, REC1 e REC2.

	CP ₁	CP ₂
B-glicosidase	0,55489	-0,0606
Fosfatase ácida	0,79389	-0,0885
Fosfatase alcalina	0,43653	0,68565
Carbono biomassa microbiana	-0,0751	-0,0751
Respiração Basal	0,04015	0,0848
pH	-0,9315	0,26172
P	-0,907	0,15182
Ca	0,45934	0,8624
Mg	0,82431	0,52013
Al	0,57487	-0,5613
Al+H	0,94221	-0,2058
SB	0,58523	0,78354
CTC(t)	0,74787	0,64741
CTC(T)	0,94357	0,29737
V (%)	-0,8472	0,42584
m (%)	0,53985	-0,5397

V = saturação por base, P = fósforo, m = saturação por alumínio, Al = alumínio, CTC (t) = capacidade de troca catiônica efetiva, CTC (T) = capacidade de troca catiônica potencial, Mg = magnésio, SB = soma de bases e Ca = cálcio.

Entretanto, na área utilizada como referência (UND), as variáveis que apresentaram maior relação dentre as citadas anteriormente foram o Al + H e a capacidade de troca catiônica (CTC) (Figura 2).

Os solos da área UND apresentaram valores de Al e Al + H mais elevados que as áreas afetadas pelo rejeito REC1 e REC2 (Tabela S1). Isso se deve ao fato dos

solos do Brasil, em sua grande maioria, apresentam naturalmente uma acidez elevada e já é relatado que os solos da região do quadrilátero ferrífero, onde a cidade de Mariana está localizada, apresentam elevadas concentrações de alumínio na sua composição em virtude dos processos pedológicos que ocorrem ou ocorreram nessa região (de Carvalho Filho et al., 2010; de Carvalho Filho et al., 2015).

A CTC, também, foi mais elevada na área UND quando comparada com as áreas REC1 e REC2. A CTC representa a capacidade de retenção de cátions por um solo, ou seja, quanto maior for a CTC maior a capacidade de o solo reter nutrientes que podem ser liberados gradativamente, alimentando assim a capacidade desse solo em sustentar a vida em seu ecossistema. A matéria orgânica presente no solo, que é composta por substâncias húmicas, possui na sua superfície elevada concentração de cargas livres, logo, tendem a elevar a CTC do solo. Como esperado, a área UND apresenta maior teor de matéria orgânica do que as áreas com rejeito (Tabela S1), o que auxilia para que essa área tenha maior CTC (Embrapa, 2010). As áreas afetadas pelo rejeito, REC1 e REC2, apresentaram valores mais elevados de saturação por base (V) que é indicativo de fertilidade do solo. Essa elevação na saturação por bases pode ser explicada pela adubação realizada nas áreas afetadas, entretanto, essa fertilidade não é autossustentável, uma vez que esse solo que está se formando ainda não possui uma boa capacidade de reter esses nutrientes, sendo assim, necessita de um constante aporte externo de nutrientes (Embrapa, 2010).

Condições ambientais adversas, como a deposição do rejeito, são prejudiciais às comunidades microbianas presentes, alterando as atividades metabólicas que são desempenhadas pelos microrganismos (Figura 3) que são de extrema importância para a manutenção das multifuncionalidades do solo. Por isso, torna-se fundamental

a recuperação da vegetação nos ambientes impactados, o processo de revegetação melhora as características do solo, como por exemplo, o aumento do pH e aumento da matéria orgânica, o que favorece diretamente a comunidade microbiana local, aumentando o sistema radicular das plantas, a entrada de carbono e, conseqüentemente, melhora da agregação do solo (Carvalho *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2017).

Com exceção da fosfatase alcalina, todos os atributos microbiológicos dos solos apresentaram-se significativamente ($p < 0,05$) mais elevados na área UND (Figura 3), mostrando, assim, que possuem sensibilidade suficiente para mostrar a diferença entre as áreas afetadas e não afetadas pela deposição do rejeito.

Os microrganismos e a atividade enzimática realizada pelos mesmos são altamente influenciáveis pelas características físico-químicas do ambiente em que eles estão presentes (Faucon *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2017). A umidade é um dos fatores que tem grande efeito nessas atividades enzimáticas, sendo considerado em alguns trabalhos como o fator principal na regulação da atividade enzimática (Brockett *et al.*, 2012; Esch *et al.*, 2017; Faucon *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2017).

As áreas afetadas pela deposição de rejeito formaram uma nova camada de um solo artificial, denominado tecnossolo, tendo como uma de suas características, a falta de estruturação, tornando-se, assim, um solo mais compactado. Essa característica acarreta vários problemas a esse ambiente, dentre eles, a dificuldade de infiltração de água pelo perfil do solo, dificultando a retenção da umidade. Assim, mesmo as amostras deste estudo terem sido coletadas no período chuvoso, as áreas afetadas pelo rejeito ainda sofrem o efeito da baixa umidade quando comparado com as áreas florestais, que possuem um solo mais bem estruturado (Silva, 2017).

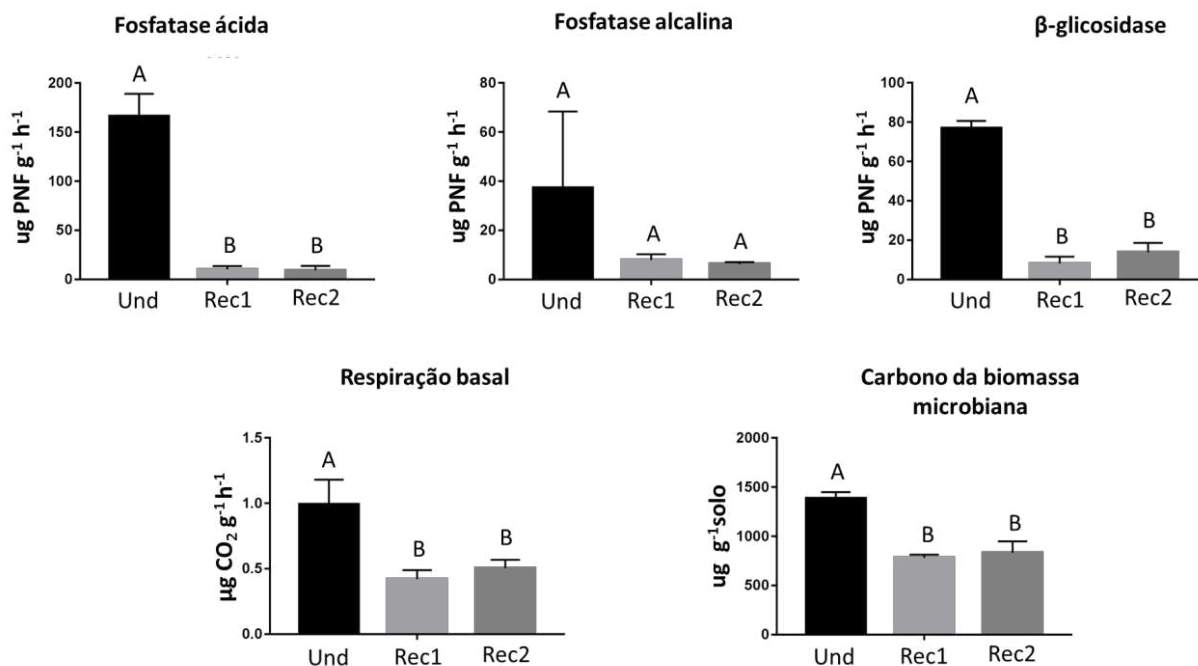


Figura 3. Valores dos indicadores microbiológicos do solo das diferentes áreas – floresta (UND), revegetação natural (REC1) e submetida à programa de revegetação (REC2). Médias seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Entre as enzimas testadas a fosfatase ácida e a β -glicosidase foram as que tiveram sensibilidade para mostrar diferença entre as áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito (Figura 3).

Os solos de florestas apresentaram o pH mais ácido, o que proporciona uma tendência a ter maior atividade da fosfatase ácida em detrimento da alcalina, enquanto nas áreas afetadas pelo rejeito essa tendência se inverteu, uma vez que apresentaram um pH mais alcalino. A proporção dessas enzimas no ambiente variam de acordo com o seu pH ótimo de funcionamento (Turner, 2010; Nannipieri *et. al.*, 2011), isso pode ser um dos fatores que levam a atividade da fosfatase ácida ser

muito mais elevada na região UND em relação as áreas afetadas REC1 e REC2, quando comparadas com a atividade da fosfatase alcalina. Outro fator muito importante na regulação da atividade dessas enzimas é a concentração de fósforo presente no solo. As fosfatases são responsáveis em converter fósforo orgânico em fósforo inorgânico tornando o mesmo disponível para os organismos utilizarem em seu metabolismo. Assim, quando há disponibilidade de fósforo inorgânico no solo suficiente para suprir a demanda exigida pelo crescimento microbiano, a atividade dessas enzimas tende a diminuir (Nannipieri *et al.*, 2011, Finkenbein *et al.*, 2013). As regiões afetadas com a deposição do rejeito de mineração receberam adubação química (Agroflor, 2016), o que pode ter favorecido a diminuição da atividade das fosfatases nessas áreas.

A enzima β -glicosidase também teve maior atividade na área UND em relação REC1 e REC2, sendo um bom indicador para avaliar a qualidade do solo e matéria orgânica (Figura 3). A atividade dessa enzima vem sendo amplamente utilizada para avaliar impacto ambiental, inclusive em áreas contaminadas com metais pesado, e submetidas a diferentes tipos de manejos de solo (Hinojosa *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2013; Cenini *et al.*, 2015; Cenini *et al.*, 2016). Esta enzima tem como função a quebra de ligações glicosídicas, sendo capaz de degradar a celulose, que é o principal componente da parede celular dos vegetais, que é a biomassa mais abundante no planeta. Por isso essa enzima é muito sensível ao tipo de vegetação e, também, a matéria orgânica presente no solo (Cenini *et al.*, 2016), o que leva as áreas afetadas pelo rejeito apresentarem menor atividade enzimática, além de baixos teores de matéria orgânica, pois a vegetação ali presente ainda é recente e incipiente, quando comparada com as das áreas de florestas.

O carbono da biomassa microbiana, também, está altamente relacionado com as características de fitofisionomia e matéria orgânica do ambiente. Quando há maior diversidade de plantas, consequentemente, há maior produção de exsudados radiculares com diferentes composições químicas, que podem servir de nutrientes para os microrganismos e ,com isso, ocorre a elevação da diversidade microbiana, resultando em uma comunidade mais metabolicamente mais ativa (Lange *et al.*, 2014, 2015; Thakur *et al.*, 2015; Esch *et al.*, 2017; Wahsha *et al.*, 2017). Esse fato pode ser observado nas amostras de florestas, quando a atividade enzimática, normalizada pelo carbono da biomassa microbiana, mostra que além da atividade enzimática da comunidade microbiana ser maior em termos quantitativos, também, é mais eficiente (Figura 4), ou seja, a comunidade microbiana está metabolicamente mais ativa nas áreas não afetadas pelo rejeito, quando comparado com as áreas afetadas pelo rejeito.

Apesar das áreas afetadas pelo rejeito apresentarem qCO_2 semelhantes à área de floresta usada como referência (UND) (Figura 4), os resultados demonstram que as florestas, de fato, são um ambiente complexo, com uma significativa comunidade metabolicamente ativa, que pode ser observado pela elevada atividade enzimática do ambiente (Figuras 3 e 4). Quando comparada a esse ambiente complexo, as áreas afetadas pelo rejeito REC1 e REC2 se mostraram ainda sofrendo o efeito da deposição de rejeito, que foi observado pela diminuição de forma significativa das atividades microbiológicas que foram testadas nesse trabalho.

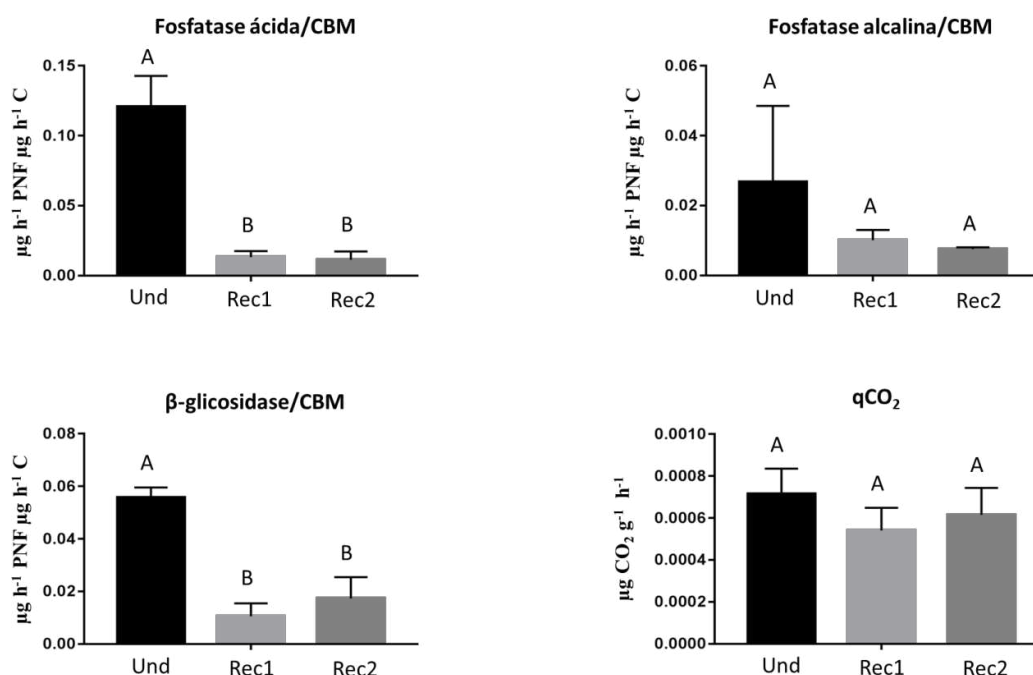


Figura 4. Atividade enzimática específica por carbono da biomassa do solo das diferentes áreas – floresta (UND), revegetação natural (REC1) e submetidas à programa de revegetação (REC2). Médias seguidas pela mesma letra não se diferenciam estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

3.2. Análise da estrutura da comunidade funcional do solo

Quando ocorre um distúrbio no solo, como a deposição de rejeito de mineração, há alteração na estrutura da comunidade microbiana em resposta a esse estresse, porém, ao longo do tempo a tendência é que haja o reestabelecimento dessa comunidade microbiana e recuperação das funções desse ecossistema. Sendo assim, o tempo é um fator chave no processo de recuperação de áreas degradadas, fato que já foi visto em diversos trabalhos que acompanharam a estrutura da comunidade microbiana de solos afetados por atividade de mineração em processo de recuperação (Banning *et. al.*, 2011; Lewis *et. al.*, 2012; Lewis *et. al.*, 2010; Li *et. al.*, 2016).

O resultado da PCoA usando a composição da comunidade bacteriana em nível de gênero (95% de similaridade) do solo explicou 65,1% (PC1 39,9% e PC2 25,2%) da variação observada (Figura 5) e claramente conseguiu mostrar a variação entre as áreas estudadas e seus diferentes estágios de recuperação, no caso de REC 1 e REC2.

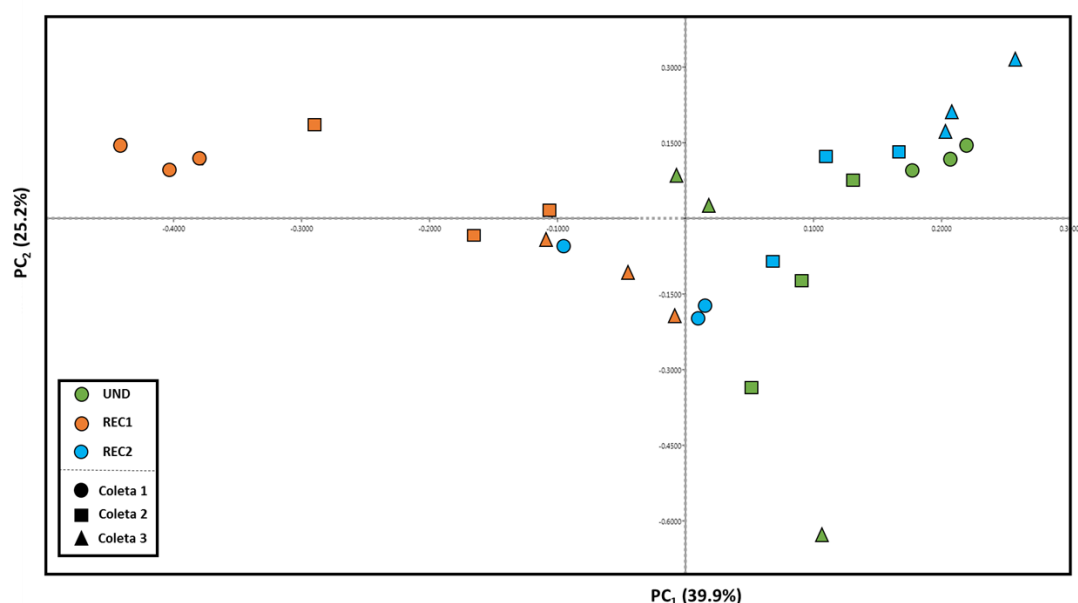


Figura 5. Análise de coordenada principal (PCoA) usando os indicadores microbiológicos do solo das áreas estudadas em diferentes tempos de coletas.

Esses resultados mostraram que a vegetação desempenha papel de grande importância na comunidade microbiana, corroborando com as informações de que quanto mais cedo houver a presença de vegetação na área impactada, mais rápido será o início do restabelecimento da comunidade microbiana (Zhang *et. al*, 2011; Zhang *et. al*, 2013; Xiao *et. al*, 2016). Esse efeito pôde ser observado nas áreas afetadas com o rejeito de mineração, a área REC2 se agrupou mais próxima das áreas não afetadas UND, quando comparada com a área REC1 (Figura 5). A área REC2

teve o programa de revegetação implementado logo após o desastre, sendo assim, o crescimento da vegetação foi mais acelerado quando comparado com o crescimento natural da vegetação que ocorreu na área REC1. Porém, fica evidente a ocorrência de um processo de sucessão microbiana ao longo do tempo na área REC1, pois pode ser observado que a cada coleta, mais a microbiota se aproxima da área referência, UND. Esse resultado corrobora para demonstrar que o tempo é um fator chave no processo de recuperação de áreas impactadas, uma vez que este fator está diretamente relacionado com o crescimento da vegetação.

Na análise de CCA é possível observar o efeito dos fatores químicos na composição da comunidade bacteriana do solo (Figura 6). Quando foram adicionados estes fatores, a explicação da variação da estrutura da comunidade bacteriana aumentou para 68,40% (CP₁ 39,95% e CP₂ 28,45%). Isso sugere que a alteração na diversidade da comunidade bacteriana do solo pode ser parcialmente atribuída às mudanças nas propriedades químicas do solo.

Como pode ser observada, a influência das variáveis ambientais na composição da comunidade bacteriana apresentou um padrão de resposta semelhante aos atributos microbiológicos do solo. Dentre as variáveis que tiveram maior peso para separação das amostras, a CTC, alumínio e matéria orgânica tiveram uma maior influência nas áreas UND e REC2, e as variáveis pH, fósforo e saturação por bases, na área REC1. Esse resultado indica que as variáveis ambientais, além de apresentarem papel importante de regulação da atividade microbiana, também modulam a composição da comunidade bacteriana. Tal fato já foi discutido por Delgado-Baquerízo e colaboradores (2017), em que, inicialmente, as forças que

direcionaram a composição da comunidade microbiana foram as características estequiométricas (C:N:P) do solo, posteriormente, a vegetação.

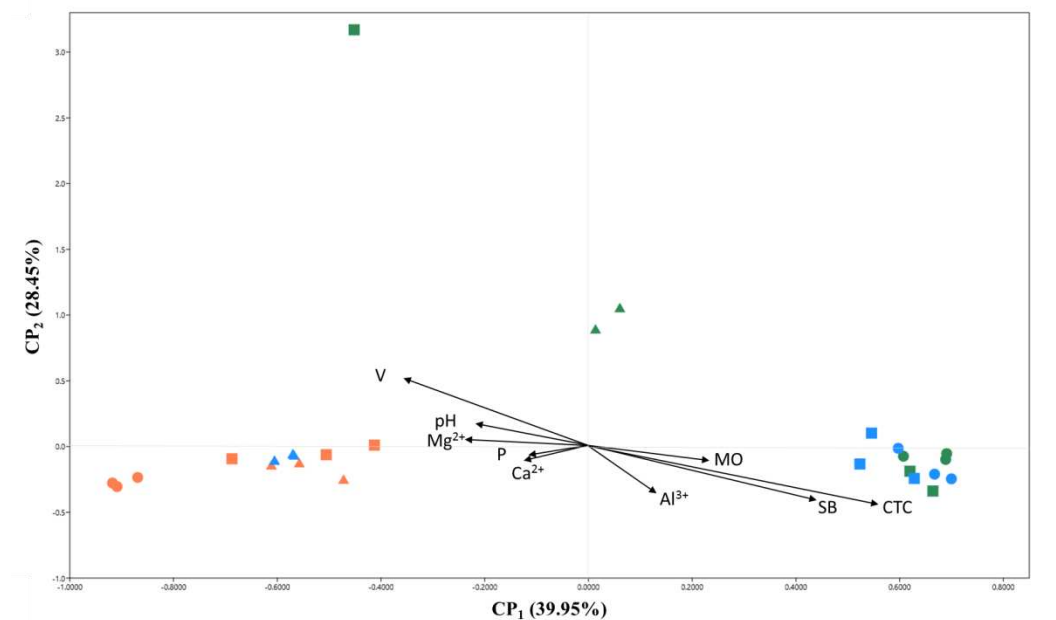


Figura 6. Análise de correspondência canônica (CCA) relacionando a composição da comunidade bacteriana em nível de gênero (95% de similaridade) com as variáveis ambientais - em verde área de floresta (UND), em laranja área com revegetação natural (REC1) e em azul área submetida à programa de revegetação (REC2) – Círculos representam a 1ª coleta, quadrado a 2ª coleta e triângulo a 3ª coleta.

O solo é um ambiente complexo, possui diversos micro habitats com diferentes características físico-químicas, o que permite a existência de alta diversidade no local. Com a deposição de rejeito nas áreas afetadas, o ambiente ficou mais homogêneo, o que provocou a diminuição da diversidade bacteriana (Tabela 2).

A diversidade é composta pelo número de espécies em um local definido e o quanto similar as espécies são em abundância e, em um ambiente estabilizado, a

tendência é que haja similaridade de abundância entre as diferentes espécies, termo conhecido como equitabilidade (Magurran *et al.*, 2004). Quando o ambiente sofre um distúrbio, a tendência é que a equitatividade entre as espécies seja alterada no ambiente, surgindo a dominância de determinadas espécies em detrimento de outras e, com isso, a diminuição da diversidade. Ao analisar a estrutura da comunidade microbiana das áreas estudadas, em nível de gênero (95% de similaridade), percebe-se que há dominância de determinados gêneros, como *Acidobacterium*, *Rhodoplanes*, *Stella*, *Prostheco bacter* e *Gemmata*, nas áreas afetadas com o rejeito de mineração REC1 e REC2, quando comparado com a região UND. Também pode ser observado a influência do tempo na diversidade de espécies, a dominância é maior na coleta 1 (fevereiro/2017) e diminui gradativamente nas coletas subsequentes, sendo menor na última coleta.

É possível mensurar essa diversidade por meio de índices. O índice de Chao é um estimador de riqueza, esse índice indica qual é a riqueza estimada para determinado ambiente, quanto maior o valor do índice maior é a riqueza estimada desse ambiente (Magurran *et al.*, 2004). O índice de Shannon é um índice que mensura a diversidade, quanto maior o valor desse índice maior é a diversidade desse ambiente (Magurran *et al.*, 2004). O índice Evennes é um índice de equitatividade, ele varia de 0 a 1 e quanto mais próximo do valor 1 maior é a similaridade de abundância entre as espécies desse ambiente (Magurran *et al.*, 2004). O índice Berger-Parker calcula a dominância de espécies, que está relacionado com a equitatividade, o valor dele também varia de 0 a 1, porém quanto mais próximo do valor 1 indica que maior é a dominância de determinadas espécies no ambiente (Magurran *et al.*, 2004).

Na Tabela 2 é possível observar que a floresta mostrou ser o ambiente mais diverso entre as áreas. Entre as áreas afetadas pelo rejeito, REC2 apresentou maior diversidade que REC1, mostrando-se mais próxima às áreas de florestas, indicando mais uma vez a importância da revegetação de ambientes impactados na aceleração do processo de recuperação. As áreas afetadas apresentaram ao longo das 3 coletas valores mais elevados do índice Berger-Parker que observado na área referência, o que mostra a dominância de determinados gêneros nas áreas impactadas, indicando que apesar de demonstrarem melhora no decorrer das coletas, essas áreas ainda sofrem o efeito da deposição do rejeito.

Tabela 2. Índices de diversidade (n=3), em nível de espécie (97% de similaridade) para as diferentes áreas – floresta (UND), revegetação natural (REC1) e com programa de revegetação (REC2), nos diferentes tempos de coletas. $\pm$ representa o erro padrão.

		Taxa		Shannon		Berger-Parker		Evenness		Chao	
Coleta 1	UND	1136.3	± 139.9	5.58	± 0.06	0.046	± 0.005	0.239	± 0.019	1346.0	± 133.7
	REC1	877.0	± 27.6	3.91	± 0.02	0.117	± 0.003	0.057	± 0.001	1179.0	± 38.3
	REC2	1176.3	± 41.9	5.20	± 0.07	0.075	± 0.006	0.156	± 0.013	1404.0	± 74.0
Coleta 2	UND	771.7	± 180.4	5.03	± 0.22	0.062	± 0.008	0.210	± 0.016	1005.2	± 157.1
	REC1	531.3	± 104.2	3.94	± 1.06	0.194	± 0.152	0.171	± 0.078	808.1	± 80.5
	REC2	769.3	± 62.7	4.38	± 0.08	0.099	± 0.002	0.105	± 0.010	1049.7	± 101.1
Coleta 3	UND	555.0	± 143.9	4.11	± 0.05	0.077	± 0.014	0.207	± 0.024	842.3	± 140.1
	REC1	304.3	± 80.9	3.98	± 0.11	0.104	± 0.017	0.122	± 0.057	382.0	± 97.3
	REC2	492.3	± 48.2	3.92	± 0.48	0.117	± 0.035	0.116	± 0.034	858.0	± 55.6

Quando é analisada a composição da comunidade bacteriana em nível de filo é possível observar a grande dominância do filo Proteobacteria, principalmente nas áreas afetadas pela deposição do rejeito. Os filos mais abundantes (Figura 7A) na

área REC1 foram Proteobacteria (48,0%), Verrucomicrobia (15,1%), Planctomycetes (13,4%), Acidobacteria (7,8%), Bacteroidetes (4,9%) e Actinobacteria (4,9%), na área REC2 foram Proteobacteria (41,3%), Chloroflexi (12,1%), Planctomycetes (10,5%), Actinobacteria (8,7%), Acidobacteria (8,6%) e Firmicutes (4,7%), na área de UND foram Proteobacteria (38,6%), Actinobacteria (19,2%), Chloroflexi (11,2%), Planctomycetes (6,7%), Bacteroidetes (6,3%) e Acidobacteria (5,7%).

Nesse trabalho o filo Proteobacteria foi significativamente o mais numeroso em todas as áreas analisadas (Figura 8A). Na área REC1 ao decorrer das coletas, a abundância de Proteobacteria aumentou de forma significativa, entretanto, na área REC2 a abundância permaneceu sem muita alteração, apresentando valores semelhantes ao encontrado na área de floresta (UND). Li e colaboradores (2014) ao estudarem áreas impactadas com rejeito de mineração, também observaram a presença desse filo em alta abundância. Há estudos demonstrando que Proteobacteria é o filo mais comum e ubíquo no solo (Kuffner *et. al.*, 2012; Chen *et. al.*, 2013) e já foi descrito como o mais abundante em áreas de florestas, porém, sem caracterizar uma relação de dominância em detrimento aos outros filios (Zifcakova *et. al.*, 2016).

Observa-se também um aumento do filo Acidobacteria também elevou sua abundância no decorrer das coletas nas áreas afetadas com a deposição de rejeito, resultado também encontrado em Li *et. al.* (2014) ao realizar o estudo de cronosequências em áreas de recuperação de minas, os sítios mais antigos de recuperação apresentavam aumento de Acidobacteria, mostrando que a abundância desse filo vai aumentando com o passar do tempo de recuperação das áreas impactadas.

Filos que apresentaram abundância mais elevadas nas áreas impactadas pelo rejeito, como por exemplo, Proteobacteria, Planctomycetes e Acidobacteria, mostraram maior influência das variáveis pH, fósforo e saturação por base (Figura 7B), que coincidentemente foram as variáveis que apresentaram maior correlação com as áreas afetadas pelo rejeito (Figura 2), indicando que nos estágios iniciais da recuperação de uma área impactada os fatores mais importante para modular a composição da comunidade microbiana é, possivelmente, as características físico-químicas que esse ambiente apresenta (Li *et. al.*, 2014; Delgado-Baquerizo *et. al.*, 2017).

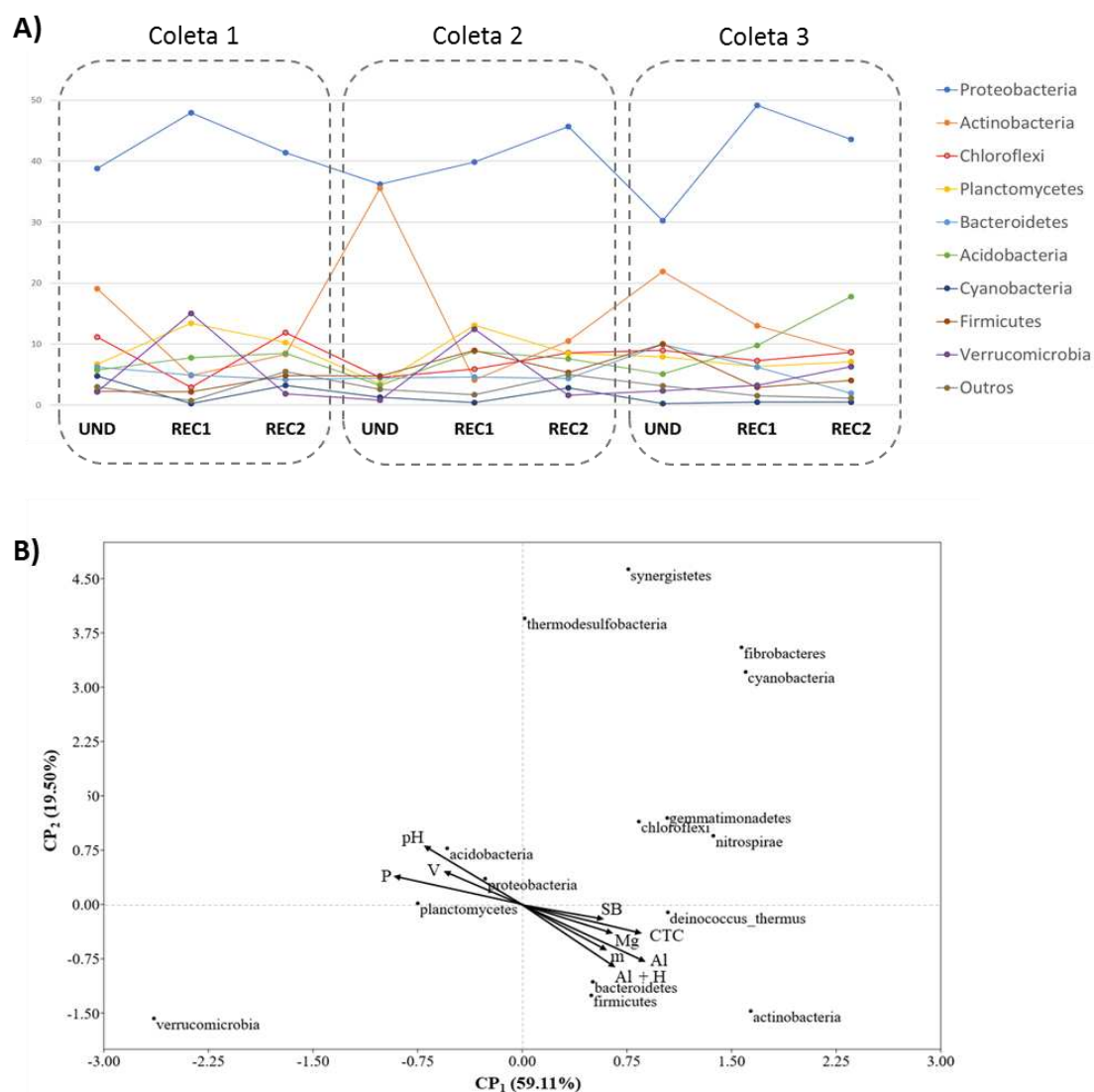


Figura 7. A) Média das abundâncias relativa (n=3) em nível de filo (80% de similaridade) para as diferentes áreas – floresta (UND), revegetação natural (REC1) e com programa de revegetação (REC2), nos diferentes tempos de coletas B) Análise de correspondência canônica (CCA) relacionando a distribuição dos filós com as variáveis ambientais em todas as áreas.

Quando um ambiente mais consolidado é analisado, como a área de floresta, também podemos observar esse efeito, os filós que tiveram abundância elevada nessa área, Actinobacteria e Chloroflexi, apresentaram maior influência das variáveis CTC, alumínio e soma de bases, que possuem elevada correlação com a área UND. Porém,

o filo Proteobacteria, também, apresentou elevada abundância na área UND, contudo, não apresentou grande influência das variáveis ambientais mais correlacionadas com essa área. Isso evidencia que os fatores físico-químicos possuem um papel importante na modulação da composição da comunidade, entretanto existem outros fatores, que também exercem grande influência (Li *et. al.*, 2014; Delgado-Baquerizo *et. al.*, 2017).

3.3. Análise do perfil funcional putativo

Corroborando com os resultados observados neste estudo, trabalhos recentes vêm mostrando que o potencial metabólico de comunidades microbianas em um ambiente está estreitamente relacionado com as condições ambientais, porém a variação taxonômica entre os grupos funcionais não consegue ser explicada somente pelas condições ambientais (Raes *et. al.*, 2011; Louca *et. al.*, 2016; Nelson *et. al.*, 2016). Portanto, existem outros mecanismos que potencialmente podem explicar a variação taxonômica entre os grupos funcionais que incluem interações bióticas (Ex. competição), deriva populacional aleatória, ordem de colonização aleatória e outros (Ofiteru *et. al.*, 2010; Burke *et. al.*, 2011; Lima-Mendez *et. al.*, 2015).

Os gêneros *Aerococcus*, *Rheinheimera*, *Acinetobacter*, *Oceanobacillus* e *Propionibacterium* foram os cinco gêneros bacterianos que possuíram maiores pesos para compor o componente principal 1 (Tabela S2) e ,com isso, foram os gêneros que tiveram maior influencia para separar as áreas afetadas com o rejeito de mineração das áreas não afetadas (Figura 4). De acordo com a literatura, espécies destes gêneros estão associadas a ambientes de rejeitos, salinos, alcalinos e de alta concentração de metal ou compostos recalcitrantes (Long *et. al.*, 2015; Schröder *et. al.*, 2016; Mendez *et. al.*, 2017; Dey *et. al.*, 2018; Rezaei-Somee *et. al.*, 2018). Com isso há a indicação

de que, possivelmente, a deposição do rejeito serviu como fonte de espécies alóctones que foram capazes de colonizar essas áreas, o que possivelmente foi uma das causas para tal diferença na composição da comunidade bacteriana entre as áreas afetadas e não afetadas.

Há vários estudos em ambientes construídos (Ex. biorreatores) mostrando estabilidade funcional do ambiente, apesar de apresentarem uma alta variabilidade taxonômica (Ofiteru *et. al.*, 2010; Vanwonterghem *et. al.*, 2015). E em ambientes naturais, também, é possível observar esse efeito, como no estudo que mostra que há um *core* gênico no intestino humano, apesar da rotatividade taxonômica (Huttenhower *et. al.*, 2012). Comparando o perfil funcional putativo observado neste estudo entre as áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito foi possível separar as funções que apresentaram, ou não, diferenças significativas entre as áreas (Figura 9).

É possível observar que funções que são fundamentais para o ecossistema como um todo, relacionadas com os principais ciclos biogeoquímicos, tais como degradação da celulose e lignina, fermentação, fixação de nitrogênio, amonificação, fototrofia e quimiotrofia não apresentaram diferença significativa entre as áreas afetadas e não afetadas pela deposição do rejeito (Figura 8A). Essas funções são essenciais para a manutenção do metabolismo das células bactérias para obtenção de carbono, nitrogênio e energia para crescimento e sobrevivência.

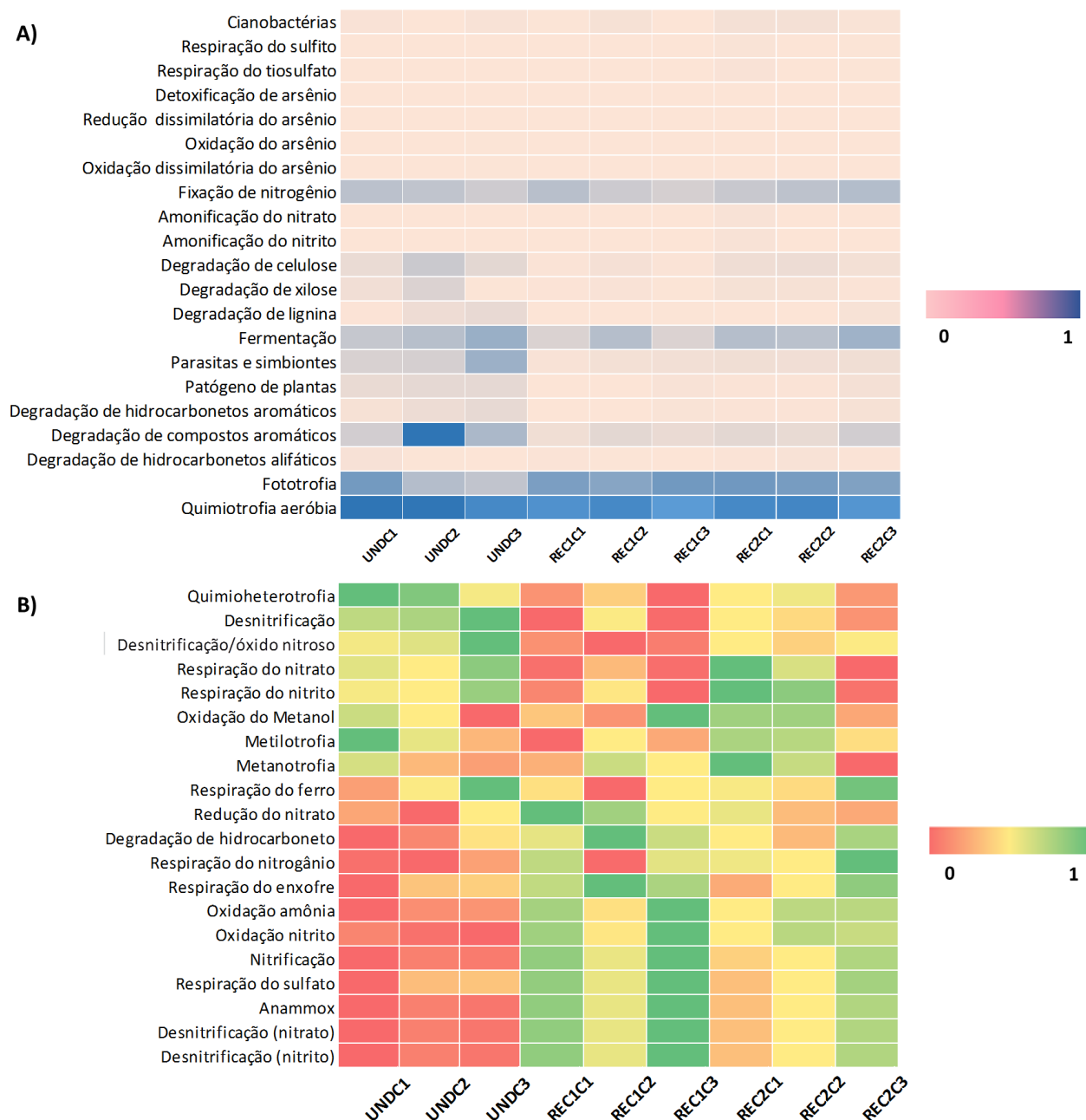


Figura 8. Heatmap da abundância relativa de funções metabólicas putativas para as diferentes áreas – floresta (UND), revegetação natural (REC1) e submetida à programa de revegetação (REC2), nos diferentes tempos de coletas. **A)** Funções que não se diferenciam pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) entre a área referência UND e as áreas afetadas REC1 e REC2. **B)** Funções que se diferenciam pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) entre a área referência UND e as áreas afetadas REC1 e REC2

As funções metabólicas da comunidade são alteradas por restrições energéticas e estequiométricas, como a disponibilidade de receptores de elétrons para a respiração e proporção de fontes de Carbono:Fósforo:Nitrogênio (Raes *et. al.*, 2011; Delgado-Baguerizo *et. al.*, 2017). Pode-se notar que as funções relacionadas com a respiração alteraram-se nas áreas afetadas com o rejeito de mineração, aumentando o metabolismo relacionado com a respiração anaeróbica pela utilização do nitrato, sulfato e ferro como aceptores finais de elétrons (Figura 8B). Esse fato é, possivelmente, consequência de dois fatores: o primeiro é que o rejeito apresenta alta disponibilidade desses aceptores finais de elétrons alternativos e segundo, é a dificuldade de difusão do oxigênio pelo perfil do tecnossolo, uma vez que ele apresenta maior compactação quando comparado com os solos das áreas não afetadas (Silva, 2017).

Um aspecto que não pode ser esquecido é a resiliência do solo, se houver mais de uma espécie com a capacidade de realizar determinada função esse ambiente fica menos susceptível a impactos ambientais, por isso a riqueza de espécies é de grande importância para a manutenção da multifuncionalidade dos ecossistemas (Mendes *et. al.*, 2015). As áreas de florestas, de forma geral, apresentaram maior diversidade, principalmente riqueza, isso a torna um ambiente mais estruturado e menos susceptível à impactos, quando comparadas com as áreas afetadas pelo rejeito.

4. Conclusões

De modo geral, as áreas de florestas apresentaram maiores valores para esses atributos e também maior atividade enzimática por biomassa. A fosfatase ácida, β -

glicosidase e carbono da biomassa microbiana foram os indicadores mais sensíveis para demonstrar as diferenças entre as áreas.

Em termos de estrutura da comunidade microbiana, as áreas estudadas também se diferem, sendo que a área REC2 encontra-se mais próxima a UND quando comparada com REC1, evidenciando a importância da implementação de programas de revegetação para iniciar o processo de recuperação de áreas impactadas, por meio do estabelecimento da microbiota do solo.

As variáveis químicas tiveram grande relação com as atividades metabólicas desempenhadas pelos microrganismos, entretanto foi observado que não é o único fator que modula a comunidade bacteriana. Há indícios de que a inoculação de microrganismos trazidos pelo rejeito tem sido um fator importante para composição da comunidade bacteriana.

Apesar das áreas afetadas com o rejeito de mineração terem melhorado ao longo do tempo, as áreas de florestas, de forma geral, apresentam maior diversidade de espécies, principalmente, riqueza, quando comparadas com as áreas afetadas pelo rejeito. Assim, as áreas afetadas pelo rejeito REC1 e REC2 se mostram ainda vulneráveis aos efeitos da deposição de rejeito de minério, observadas pela diminuição significativa das atividades microbiológicas que foram testadas nesse trabalho e pela diminuição da diversidade microbiana.

Agradecimentos

Os autores são gratos à FAPEMIG, CNPq e CAPES/PROEX001 pelo apoio financeiro e AGROFLOR LTDA pelo apoio técnico na escolha dos pontos de amostragem na região de Paracatu de Baixo, Mariana-MG.

Referências

- AGROFLOR. Contenção de carreamento de sedimentos por meio de revegetação nas áreas afetadas pelo rejeito. p. 62, 2016.
- BANNING, Natasha C. et al. Soil microbial community successional patterns during forest ecosystem restoration. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM. 00764-11, 2011.
- BARTLETT, Richmond J.; ROSS, DONALD S. Colorimetric determination of oxidizable carbon in acid soil solutions. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, n. 4, p. 1191-1192, 1988.
- BIANCHINI, A. Relatório: avaliação do impacto da lama/pluma Samarco sobre os ambientes costeiros e marinhos (ES e BA) com ênfase nas unidades de conservação 1ª expedição do navio de pesquisa Soloncy Moura do CEPSUL. **ICMBio, Brasília**, 2016.
- BOWKER, Lindsay Newland. Samarco dam failure: Largest by far in recorded history. **Bowker Associates, Science & Research In The Public Interest**, v. 12, 2015.
- BROCKETT, Beth FT; PRESCOTT, Cindy E.; GRAYSTON, Sue J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 9-20, 2012.

- BURKE, Catherine et al. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 34, p. 14288-14293, 2011.
- CARNAVAL, Ana Carolina et al. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785-789, 2009.
- CARVALHO, Teotonio Soares et al. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. **Ecology**, v. 97, n. 10, p. 2760-2771, 2016.
- CENINI, Valeria L. et al. Chronic nitrogen fertilization and carbon sequestration in grassland soils: evidence of a microbial enzyme link. **Biogeochemistry**, v. 126, n. 3, p. 301-313, 2015.
- CENINI, Valeria L. et al. Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 96, p. 198-206, 2016.
- CHEN, Lin-xing et al. Shifts in microbial community composition and function in the acidification of a lead/zinc mine tailings. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 2431-2444, 2013.
- DANGI, Sadikshya R. et al. Soil microbial community recovery in reclaimed soils on a surface coal mine site. **Soil Science Society of America Journal**, v. 76, n. 3, p. 915-924, 2012.
- DE CARVALHO FILHO, A., Curi, N., Shinzato, E. Relações solo-paisagem no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais. **Pesqui. Agropecuária Bras.** v. 45, p. 903–916, 2010.
- DE CARVALHO FILHO, A., Inda, A.V., Fink, J.R., Curi, N. Iron oxides in soils of diferente lithological origins in Ferriferous Quadrilateral (Minas Gerais, Brazil). **Appl. Clay Sci.** v. 118, p. 1–7, 2015.
- DEFELIPO, B. V.; RIBEIRO, A. C. **Análise química do solo: metodologia. Viçosa: UFV**, 1981.

- DELGADO-BAQUERIZO, Manuel et al. It is elemental: soil nutrient stoichiometry drives bacterial diversity. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 1176-1188, 2017.
- DEY, Priyadarshini; DAS, Ranjit; KAZY, Sufia K. Benzene Biodegradation During Growth by *Aerococcus* sp. Isolated from Oil Sludge. In: **Urban Ecology, Water Quality and Climate Change**. Springer, Cham, 2018. p. 305-319.
- EMBRAPA. Conceito de fertilidade do solo e manejo adequado para regiões tropicais. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. 2010.
- ESCH, Ellen H.; LIPSON, David; CLELAND, Elsa E. Direct and indirect effects of shifting rainfall on soil microbial respiration and enzyme activity in a semi-arid system. **Plant and Soil**, v. 411, n. 1-2, p. 333-346, 2017.
- FAUCON, Michel-Pierre; HOUBEN, David; LAMBERS, Hans. Plant functional traits: soil and ecosystem services. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 5, p. 385-394, 2017.
- FINKENBEIN, Petra et al. Soil enzyme activities as bioindicators for substrate quality in revegetation of a subtropical coal mining dump. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 56, p. 87-89, 2013.
- GTF. Avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da barragem de Fundão em Mariana-MG. **Relatório Secretaria do Estado de Minas Gerais**. 2016.
- HAHN, Aria S.; QUIDEAU, Sylvie A. Long-term effects of organic amendments on the recovery of plant and soil microbial communities following disturbance in the Canadian boreal forest. **Plant and Soil**, v. 363, n. 1-2, p. 331-344, 2013.
- HINOJOSA, M.B., et. al.. Soil moisture pretreatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. **Soil Biology and Biochemistry** v. 36, p. 1559–1568, 2004.
- HUTTENHOWER, Curtis et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207, 2012.

- IBAMA. Impactos sociais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. **Laudo técnico preliminar** . 2015. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/ambientais/laudotecnico_preliminar.pdf.
- KARLEN, D. L.; ANDREWS, S. S.; DORAN, J. W. Soil quality: current concepts and applications. **Advances in Agronomy**, v. 74, p. 1-40, 2001.
- KUFFNER, Melanie et al. Effects of season and experimental warming on the bacterial community in a temperate mountain forest soil assessed by 16S rRNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 3, p. 551-562, 2012.
- LANGE, Markus et al. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e96182, 2014.
- LANGE, Markus et al. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. **Nature Communications**, v. 6, p. 6707, 2015.
- LEWIS, Dawn E. et al. Soil functional diversity analysis of a bauxite-mined restoration chronosequence. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 4, p. 710-723, 2010.
- LEWIS, Dawn E. et al. Microbial and geochemical assessment of bauxitic un-mined and post-mined chronosequence soils from Mocho Mountains, Jamaica. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 3, p. 738-749, 2012.
- LI, Chenhui et al. Soil microbial community restoration in Conservation Reserve Program semi-arid grasslands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 118, p. 166-177, 2018.
- LI, Yang et al. Ecological restoration alters microbial communities in mine tailings profiles. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25193, 2016.
- LIAO, Hongkai et al. Dynamics of soil microbial recovery from cropland to orchard along a 20-year chronosequence in a degraded karst ecosystem. **Science of The Total Environment**, v. 639, p. 1051-1059, 2018.

- LIMA-MENDEZ, Gipsi et al. Determinants of community structure in the global plankton interactome. **Science**, v. 348, n. 6237, p. 1262073, 2015.
- LONG, Xiufeng et al. *Oceanobacillus damuensis* sp. nov. and *Oceanobacillus rekensis* sp. nov., isolated from saline alkali soil samples. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 3, p. 731-739, 2015.
- LOPES, André et al. Interpretation of microbial soil indicators as a function of crop yield and organic carbon. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 2, p. 461-472, 2013.
- LOUCA, Stilianos; PARFREY, Laura Wegener; DOEBELI, Michael. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1272-1277, 2016.
- MAGURRAN, A.. *Measuring Biological Diversity*. Oxford, RU: Blackwell Publishing. Schemske, DW y N. Brokaw. 1981. "Treefalls and the distribution of. ica de Costa Rica, v. 9, n. 1, p. 17, 2004.
- MENDES, Lucas W. et al. Soil-borne microbiome: linking diversity to function. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 1, p. 255-265, 2015.
- MÉNDEZ, Valentina et al. Novel hydrocarbonoclastic metal-tolerant *Acinetobacter* and *Pseudomonas* strains from Aconcagua river oil-polluted soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 1074-1087, 2017.
- NANNIPIERI, Paolo et al. Role of phosphatase enzymes in soil. In: **Phosphorus in action**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 215-243.
- NELSON, Michaeline B.; MARTINY, Adam C.; MARTINY, Jennifer BH. Global biogeography of microbial nitrogen-cycling traits in soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 29, p. 8033-8040, 2016.
- OFİTERU, Irina Dana et al. Combined niche and neutral effects in a microbial wastewater treatment community. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 35, p. 15345-15350, 2010.

- RAES, Jeroen et al. Toward molecular trait-based ecology through integration of biogeochemical, geographical and metagenomic data. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 473, 2011.
- RANA, S. et al. Soil microbial community composition in reclaimed soil under different vegetation in Wyoming minelands. **Proceedings America Society of Mining and Reclamation**, p. 653-661, 2007.
- REN, Chengjie et al. Differential responses of soil microbial biomass and carbon-degrading enzyme activities to altered precipitation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 115, p. 1-10, 2017.
- REZAEI SOMEE, Maryam et al. Bioremediation of oil-based drill cuttings by a halophilic consortium isolated from oil-contaminated saline soil. **3 Biotech**, v. 8, p. 1-13, 2018.
- SÁ, João Carlos et al. Soil carbon fractions and biological activity based indices can be used to study the impact of land management and ecological successions. **Ecological Indicators**, v. 84, p. 96-105, 2018.
- SAMARCO. Atualização do Plano de Recuperação Ambiental Integrado. 2016. Disponível em: .
- SANTOS, Jessé Valentim et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6735-6748, 2016.
- SILVA, Gilson et al. Caracterização química, física e mineralógica de estéreis e rejeito da mineração de ferro da Mina de Alegria, Mariana-MG. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 1, 2006.
- SILVA, Lucas. Rompimento da barragem do Fundão em Mariana-MG: Caracterização e qualidade física de tecnossolo formado pela deposição de rejeito. **Universidade Federal de Viçosa**. 2017.
- SCHRÖDER, Josephin et al. Draft genome sequence of *Rheinheimera* sp. strain SA_1 isolated from iron backwash sludge in Germany. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. e00853-16, 2016.

- TABATABAI, M. A. et al. Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and biochemical properties. **Soil Science Society of America**, Madison, Wis, p. 985-1017, 1994.
- TEIXEIRA, Anita Fernanda dos Santos et al. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings: Inoculum potential, density, and diversity of spores related to soil properties. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 5, p. 511-525, 2017.
- TERESINHA, Leila et al. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. **Journal of Environmental Management**, 2018.
- THAKUR, Madhav Prakash et al. Plant diversity drives soil microbial biomass carbon in grasslands irrespective of global environmental change factors. **Global Change Biology**, v. 21, n. 11, p. 4076-4085, 2015.
- TURNER, Benjamin L. Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6485-6493, 2010.
- UPADHYAY, Neha et al. Tolerance and reduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. MNU16 isolated from contaminated coal mining soil. **Frontiers in Plant science**, v. 8, p. 778, 2017.
- VANCE, Eric D.; BROOKES, Peter C.; JENKINSON, David S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.
- VANWONTERGHEM, Inka et al. Deterministic processes guide long-term synchronised population dynamics in replicate anaerobic digesters. **The ISME Journal**, v. 8, n. 10, p. 2015, 2014.
- ZHANG, Chongbang et al. Structure and function of microbial communities during the early stages of revegetation of barren soils in the vicinity of a Pb/Zn Smelter. **Geoderma**, v. 136, n. 3-4, p. 555-565, 2006.

- ZHANG, Chao et al. Rhizosphere soil microbial activity under different vegetation types on the Loess Plateau, China. **Geoderma**, v. 161, n. 3-4, p. 115-125, 2011.
- ZHANG, Chao et al. Effect of different vegetation types on the rhizosphere soil microbial community structure in the Loess Plateau of China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 11, p. 2103-2113, 2013.
- ŽIFČÁKOVÁ, Lucia et al. Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 288-301, 2016.
- WAHSHA, Mohammad et al. Microbial enzymes as an early warning management tool for monitoring mining site soils. **Catena**, v. 148, p. 40-45, 2017.
- WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis Springer-Verlag New York. 2009.
- WANG, Li-ping et al. Selection experiments for the optimum combination of AMF-plant-substrate for the restoration of coal mines. **Mining Science and Technology (China)**, v. 19, n. 4, p. 479-482, 2009.
- XIAO, Lie et al. Long-term effects of vegetational restoration on soil microbial communities on the Loess Plateau of China. **Restoration Ecology**, v. 24, n. 6, p. 794-804, 2016.
- XIONG, Xinni; TSANG, Daniel CW; OK, Y. S. Chemical Characterization of Mine Sites. **Spoil to Soil: Mine Site Rehabilitation and Revegetation**, 2017.

Material Suplementar

Tabela S1. Média dos valores das características químicas do solo (n=3) para as diferentes áreas – floresta (UND), revegetação natural (REC1) e com programa de revegetação (REC2), nos diferentes tempos de coletas.

	Fevereiro/17			Setembro/17			fevereiro/18		
	UND	REC1	REC2	UND	REC1	REC2	UND	REC1	REC2
pH	5,3	7,5	7,3	5,93	6,5	8	4,5	7,3	6,63
P⁺	3,4	7,87	6,83	4,57	9,07	8,43	1,7	7,5	7,2
Ca²⁺	2,2	1,07	1,03	1,63	1,2	0,87	0,83	0,83	0,847
Mg²⁺	0,9	0,07	0,1	0,6	0,27	0,07	0,41	0,04	0,097
Al³⁺	0,6	0	0	0,2	0,1	0	0,7	0	0
Al+H	4,3	0,17	0,17	3,027	1,37	0	6,82	0,66	0,99
SB	3,3	1,2	1,2	2,4	1,8	1,6	1,37	0,93	1,003
CTCt	3,9	1,2	1,2	2,7	1,9	1,6	2,26	0,93	1,003
CTCT	7,6	1,4	1,4	5,47	3,17	1,6	8,21	1,59	1,99
V	38,6	87,6	87,7	58,7	77	100	16,6	60	50,27
m	26	0	0	9,3	4,6	0	43,4	0	0
M.O.	3,1	0,96	1,35	2,98	1,15	1,25	3,18	0,49	0,627

Tabela S2. Eigenvalues referentes à CCA relacionando a estrutura da comunidade microbiana em nível de gênero (95% de similaridade) com as variáveis ambientais para as diferentes áreas – floresta (UND), revegetação natural (REC1) e com programa de revegetação (REC2), nos diferentes tempos de coletas.

Gênero	PC1	PC2	Gênero	PC1	PC2	Gênero	PC1	PC2
<i>aerococcus</i>	5.86	-0.52	<i>REC2_1-C3</i>	-0.18	0.18	<i>halanaerobacter</i>	-0.27	0.05
<i>rheinheimera</i>	5.84	-0.51	<i>sulfitobacter</i>	-0.18	0.34	<i>prosthecobacter</i>	-0.27	-0.78
<i>acinetobacter</i>	5.78	-0.53	<i>candidatus zinderia</i>	-0.18	0.08	<i>hyphomicrobium</i>	-0.27	0.40
<i>oceanobacillus</i>	5.72	-0.53	<i>sneathiella</i>	-0.18	0.54	<i>sphingomonas</i>	-0.27	0.26
<i>propionibacterium</i>	5.15	-0.38	<i>saccharibacter</i>	-0.18	0.11	<i>stenotrophomonas</i>	-0.27	0.75
<i>UND_2-C5</i>	4.29	-0.34	<i>ktedonobacter</i>	-0.18	-0.66	<i>eubacterium</i>	-0.27	0.52
<i>paracoccus</i>	4.04	-0.29	<i>kibdelosporangium</i>	-0.18	-0.06	<i>bosea</i>	-0.27	0.71
<i>sphingobacterium</i>	3.66	-0.33	<i>pseudaminobacter</i>	-0.18	-0.46	<i>ottowia</i>	-0.27	0.22
<i>staphylococcus</i>	3.25	-0.64	<i>solimonas</i>	-0.18	0.15	<i>sphaerobacter</i>	-0.28	0.32

<i>thermus</i>	2.71	-0.21	<i>REC2_3-C3</i>	-0.18	0.14	<i>labrys</i>	-0.28	-0.16
<i>delftia</i>	2.38	1.11	<i>kordiimonas</i>	-0.18	0.38	<i>dyella</i>	-0.28	-0.27
<i>pseudomonas</i>	1.48	0.15	<i>burkholderia</i>	-0.18	-0.12	<i>armatimonas</i>	-0.28	0.54
<i>agrobacterium</i>	0.93	0.31	<i>xanthomonas</i>	-0.19	-0.47	<i>prosthecomicrobium</i>	-0.28	0.39
<i>corynebacterium</i>	0.88	-0.69	<i>caenispirillum</i>	-0.19	0.06	<i>ensifer</i>	-0.28	0.23
<i>williamsia</i>	0.71	8.73	<i>methylibium</i>	-0.19	0.22	<i>roseospirillum</i>	-0.28	-0.04
<i>m</i>	0.58	0.22	<i>isosphaera</i>	-0.19	-0.53	<i>candidatus solibacter</i>	-0.28	-0.47
<i>bordetella</i>	0.58	-0.15	<i>paenibacillus</i>	-0.19	-0.63	<i>wolinella</i>	-0.28	0.48
<i>UND_2-C4</i>	0.53	6.11	<i>REC1_3-C4</i>	-0.19	-0.39	<i>aeromicrobium</i>	-0.28	0.35
<i>amorphus</i>	0.51	0.15	<i>rhizobium</i>	-0.19	-0.35	<i>ohtaekwangia</i>	-0.29	0.31
<i>Al</i>	0.48	0.24	<i>desulfovirga</i>	-0.19	0.10	<i>geoalkalibacter</i>	-0.29	0.35
<i>pseudoclavibacter</i>	0.48	-0.77	<i>parvibaculum</i>	-0.19	0.09	<i>c xiphinematobacter</i>	-0.29	0.39
<i>Al+H</i>	0.45	0.31	<i>chthoniobacter</i>	-0.19	-0.09	<i>synechococcus</i>	-0.29	0.39
<i>riemerella</i>	0.44	-0.94	<i>UND_3-C3</i>	-0.19	0.35	<i>sporomusa</i>	-0.29	0.19
<i>nocardioiodes</i>	0.43	6.51	<i>sedimenticola</i>	-0.19	-0.86	<i>herbaspirillum</i>	-0.29	0.14
<i>shewanella</i>	0.42	0.21	<i>flexibacter</i>	-0.19	0.30	<i>hirschia</i>	-0.29	0.73
<i>citricoccus</i>	0.38	-1.28	<i>bdellovibrio</i>	-0.19	0.03	<i>inhella</i>	-0.29	0.50
<i>diaminobutyricimonas</i>	0.37	1.17	<i>phenylobacterium</i>	-0.19	-0.29	<i>phaselicystis</i>	-0.29	0.26
<i>thiorhodococcus</i>	0.33	-0.41	<i>thermomonas</i>	-0.19	-0.24	<i>comamonas</i>	-0.29	0.54
<i>sporosarcina</i>	0.32	-1.10	<i>anaeromyxobacter</i>	-0.19	-0.05	<i>singulisphaera</i>	-0.29	-0.66
<i>CTCT</i>	0.30	0.28	<i>marmoricola</i>	-0.19	1.65	<i>inquilinus</i>	-0.29	0.25
<i>thalassococcus</i>	0.26	0.87	<i>dethiobacter</i>	-0.19	-0.44	<i>patulibacter</i>	-0.29	0.45
<i>ornatilinea</i>	0.26	0.72	<i>stigmatella</i>	-0.20	0.00	<i>heliorestis</i>	-0.30	-0.55
<i>lysinibacillus</i>	0.26	-1.05	<i>pseudonocardia</i>	-0.20	0.55	<i>streptacidiphilus</i>	-0.30	-0.66
<i>rhodoligotrophos</i>	0.25	0.79	<i>UND_2-C3</i>	-0.20	0.30	<i>actinoallomurus</i>	-0.30	-0.74
<i>alcanivorax</i>	0.22	0.41	<i>reyranella</i>	-0.20	-0.06	<i>edaphobacter</i>	-0.30	-0.91
<i>brevundimonas</i>	0.20	-0.74	<i>nitrosomonas</i>	-0.20	0.18	<i>ferruginibacter</i>	-0.30	0.38
<i>shigella</i>	0.19	0.13	<i>UND_3-C5</i>	-0.20	0.07	<i>actinospica</i>	-0.30	-0.68
<i>thermanaerotherix</i>	0.19	-0.91	<i>azonexus</i>	-0.20	-0.12	<i>methylocella</i>	-0.30	-0.45
<i>pimelobacter</i>	0.16	0.12	<i>candidatus babelia</i>	-0.20	-0.24	<i>geotherix</i>	-0.30	0.13
<i>marinobacter</i>	0.16	0.16	<i>gloeobacter</i>	-0.20	0.13	<i>xenophilus</i>	-0.30	1.10
<i>bacillus</i>	0.16	-0.86	<i>rhodomicrobium</i>	-0.20	-0.65	<i>caldilinea</i>	-0.30	0.17
<i>natronocella</i>	0.16	0.38	<i>holophaga</i>	-0.20	-0.68	<i>rubrobacter</i>	-0.30	0.44
<i>candidatus thiobios</i>	0.14	0.39	<i>REC2_3-C5</i>	-0.20	-0.31	<i>methyloversatilis</i>	-0.30	0.12

<i>cellulomonas</i>	0.14	1.08	<i>Ca</i>	-0.20	0.03	<i>gaiella</i>	-0.30	0.61
<i>proteiniphilum</i>	0.14	0.49	<i>REC1_1-C5</i>	-0.20	-0.30	<i>acidipila</i>	-0.30	-0.50
<i>blastomonas</i>	0.12	-1.08	<i>aquicola</i>	-0.21	0.17	<i>rhodothermus</i>	-0.30	-0.79
<i>REC1_2-C5</i>	0.10	-0.37	<i>cystobacter</i>	-0.21	-0.20	<i>heliobacillus</i>	-0.30	-0.79
<i>roseovarius</i>	0.10	0.37	<i>rickettsia</i>	-0.21	-0.09	<i>lechevalieria</i>	-0.30	0.52
<i>thioalkalipira</i>	0.08	0.02	<i>byssovorax</i>	-0.21	-0.11	<i>loktanella</i>	-0.31	0.57
<i>chlorobium</i>	0.08	0.81	<i>legionella</i>	-0.21	-0.18	<i>desulfotomaculum</i>	-0.31	-0.51
<i>rhodovulum</i>	0.08	0.14	<i>devosia</i>	-0.21	0.15	<i>alteromonas</i>	-0.31	0.51
<i>nitrosococcus</i>	0.06	0.30	<i>frankia</i>	-0.21	0.23	<i>lutispora</i>	-0.31	0.25
<i>defluviimonas</i>	0.06	0.00	<i>caulobacter</i>	-0.21	-0.18	<i>stella</i>	-0.31	-0.73
<i>oceanibacterium</i>	0.06	0.31	<i>pelosinus</i>	-0.21	0.38	<i>afipia</i>	-0.31	-0.10
<i>geopsychrobacter</i>	0.04	-0.61	<i>virgisporangium</i>	-0.21	-0.19	<i>methyloferula</i>	-0.31	-0.73
<i>psychroserpens</i>	0.04	0.66	<i>lysobacter</i>	-0.21	0.20	<i>flavisolibacter</i>	-0.31	0.28
<i>UND_3-C4</i>	0.04	-0.08	<i>clostridium</i>	-0.21	0.25	<i>rhodococcus</i>	-0.31	0.40
<i>lewinella</i>	0.04	0.24	<i>nitrosovibrio</i>	-0.21	-0.62	<i>acidimicrobium</i>	-0.31	0.07
<i>hoeflea</i>	0.01	0.01	<i>REC1_3-C5</i>	-0.21	-0.33	<i>iamia</i>	-0.31	0.39
<i>desulfomicrobium</i>	0.01	0.23	<i>c. saccharimonas</i>	-0.22	0.07	<i>filomicrobium</i>	-0.31	0.51
<i>parvularcula</i>	0.01	0.19	<i>dongia</i>	-0.22	0.22	<i>congregibacter</i>	-0.31	1.12
<i>dactyloporangium</i>	0.01	0.07	<i>candidatus odysella</i>	-0.22	-0.11	<i>camptylonemopsis</i>	-0.31	1.07
<i>lutimaribacter</i>	0.01	0.14	<i>thalassospira</i>	-0.22	0.30	<i>nisaea</i>	-0.31	0.65
<i>pilimelia</i>	0.00	0.88	<i>opitutus</i>	-0.22	0.03	<i>fimbriimonas</i>	-0.32	0.26
<i>agaricola</i>	0.00	-0.49	<i>kofleria</i>	-0.22	0.00	<i>desulfatibacillum</i>	-0.32	-0.78
<i>arthrobacter</i>	0.00	0.37	<i>klebsiella</i>	-0.22	0.48	<i>jatrophihabitans</i>	-0.32	-0.67
<i>thioalkalivibrio</i>	0.00	0.08	<i>spiroplasma</i>	-0.22	0.03	<i>halothermothrix</i>	-0.32	0.32
<i>CTCt</i>	0.00	0.15	<i>tistrella</i>	-0.22	0.03	<i>microbacterium</i>	-0.32	0.55
<i>halochromatium</i>	0.00	0.15	<i>tetrasphaera</i>	-0.22	0.20	<i>actinoplanes</i>	-0.32	0.42
<i>pseudoalteromonas</i>	-0.01	-0.39	<i>roseobacter</i>	-0.22	0.23	<i>c. hodgkinia</i>	-0.32	0.52
<i>nitrospira</i>	-0.01	-0.28	<i>petrimonas</i>	-0.22	0.38	<i>niabella</i>	-0.32	-0.07
<i>Mg</i>	-0.01	0.15	<i>ilumatobacter</i>	-0.22	0.27	<i>chitinophaga</i>	-0.33	-0.05
<i>aliihoeflea</i>	-0.01	0.52	<i>steroidobacter</i>	-0.22	-0.28	<i>bacteriovorax</i>	-0.33	0.60
<i>vibrio</i>	-0.02	0.21	<i>candidatus koribacter</i>	-0.23	-0.50	<i>kribbella</i>	-0.33	0.34
<i>microlunatus</i>	-0.02	1.07	<i>christensenella</i>	-0.23	-0.41	<i>actinocorallia</i>	-0.33	0.57
<i>nitrobacter</i>	-0.02	0.16	<i>gemmatimonas</i>	-0.23	0.15	<i>hippea</i>	-0.33	0.59
<i>microbulbifer</i>	-0.02	0.18	<i>thermaerobacter</i>	-0.23	0.31	<i>chelatooccus</i>	-0.33	0.62

<i>bizionia</i>	-0.03	0.53	<i>neorhizobium</i>	-0.23	0.61	<i>flavitalea</i>	-0.33	0.13
<i>algisphaera</i>	-0.04	0.12	<i>aquicella</i>	-0.23	-0.11	<i>P</i>	-0.33	-0.28
<i>prochlorococcus</i>	-0.04	-0.49	<i>actinokineospora</i>	-0.23	1.15	<i>pedobacter</i>	-0.33	0.18
<i>tistlia</i>	-0.04	1.36	<i>virgibacillus</i>	-0.23	-0.29	<i>magnetococcus</i>	-0.33	0.41
<i>thiothrix</i>	-0.04	0.21	<i>blastopirellula</i>	-0.23	0.08	<i>anaerolinea</i>	-0.33	0.64
<i>candidatus entotheonella</i>	-0.05	0.25	<i>cronobacter</i>	-0.23	1.01	<i>tsukamurella</i>	-0.34	0.45
<i>methyломicrobium</i>	-0.05	0.83	<i>pedosphaera</i>	-0.23	-0.34	<i>zavarzinella</i>	-0.34	0.23
<i>victivallis</i>	-0.05	0.31	<i>niastella</i>	-0.23	0.03	<i>polaromonas</i>	-0.34	0.40
<i>owenweeksia</i>	-0.06	0.72	<i>variovorax</i>	-0.23	0.00	<i>roseiflexus</i>	-0.34	0.58
<i>ralstonia</i>	-0.06	-0.69	<i>streptomyces</i>	-0.23	-0.12	<i>kouleothrix</i>	-0.34	0.59
<i>lactobacillus</i>	-0.06	0.64	<i>REC1_3-C3</i>	-0.23	-0.43	<i>nocardia</i>	-0.34	0.12
<i>tepidamorphus</i>	-0.06	-0.23	<i>ferrimicrobium</i>	-0.23	-0.62	<i>defluviococcus</i>	-0.34	0.42
<i>dokdonella</i>	-0.07	-0.08	<i>leptothrix</i>	-0.23	0.13	<i>actinophytocola</i>	-0.34	0.58
<i>cryptosporangium</i>	-0.07	1.86	<i>thermodesulfobium</i>	-0.23	0.29	<i>sediminibacterium</i>	-0.34	0.17
<i>nitratireductor</i>	-0.07	0.14	<i>rhodocyclus</i>	-0.23	0.32	<i>arthrospira</i>	-0.34	0.35
<i>dechloromarinus</i>	-0.07	0.35	<i>methylosinus</i>	-0.23	-0.22	<i>candidatus chloroploca</i>	-0.34	0.69
<i>luteolibacter</i>	-0.08	-0.23	<i>azospira</i>	-0.23	0.39	<i>alsobacter</i>	-0.34	0.32
<i>campylobacter</i>	-0.08	-1.76	<i>coxiella</i>	-0.23	0.04	<i>mitsuaria</i>	-0.35	0.45
<i>chromatocurvus</i>	-0.08	-0.22	<i>nordella</i>	-0.23	0.20	<i>microvirga</i>	-0.35	0.53
<i>phycisphaera</i>	-0.08	0.06	<i>solirubrobacter</i>	-0.23	0.24	<i>sporichthya</i>	-0.35	0.67
<i>enhydrobacter</i>	-0.08	0.10	<i>dehalogenimonas</i>	-0.23	0.20	<i>paracraurococcus</i>	-0.35	0.40
<i>porticoccus</i>	-0.08	0.02	<i>aquamicrobium</i>	-0.23	0.24	<i>knoellia</i>	-0.35	0.96
<i>pasteuria</i>	-0.09	0.57	<i>cupriavidus</i>	-0.24	0.39	<i>metallibacterium</i>	-0.35	0.84
<i>rhodopirellula</i>	-0.09	0.50	<i>planctomyces</i>	-0.24	0.07	<i>terrabacter</i>	-0.35	0.41
<i>bythopirellula</i>	-0.09	0.02	<i>ramlibacter</i>	-0.24	-0.06	<i>aquimonas</i>	-0.35	0.71
<i>maricaulis</i>	-0.09	0.34	<i>achromobacter</i>	-0.24	1.04	<i>roseimicrobium</i>	-0.35	-0.84
<i>geothermobacter</i>	-0.09	-0.37	<i>rhodobium</i>	-0.24	-0.24	<i>pseudoxanthomonas</i>	-0.36	0.78
<i>skermanella</i>	-0.10	0.22	<i>acidisphaera</i>	-0.24	-0.65	<i>desulfovibrio</i>	-0.36	0.33
<i>thermoleophilum</i>	-0.10	0.38	<i>sandaracinus</i>	-0.24	0.22	<i>azohydromonas</i>	-0.36	0.51
<i>woodsholea</i>	-0.10	-0.04	<i>pirellula</i>	-0.24	0.39	<i>glycomyces</i>	-0.36	0.44
<i>leisingera</i>	-0.10	-0.13	<i>REC1_2-C3</i>	-0.24	-0.45	<i>nakamurella</i>	-0.36	-0.07
<i>georgenia</i>	-0.10	-0.30	<i>cardiobacterium</i>	-0.24	-0.07	<i>caloramator</i>	-0.36	0.29
<i>actinomadura</i>	-0.11	-0.26	<i>bradyrhizobium</i>	-0.24	-0.43	<i>phycococcus</i>	-0.36	0.58

<i>saccharophagus</i>	-0.11	-0.02	<i>piscinibacter</i>	-0.24	0.22	<i>blastococcus</i>	-0.36	0.51
<i>rickettsiella</i>	-0.11	-0.20	<i>thiorhodospira</i>	-0.24	0.43	<i>rubritepida</i>	-0.36	0.32
<i>tumebacillus</i>	-0.11	-0.19	<i>REC1_1-C3</i>	-0.24	-0.44	<i>levilinea</i>	-0.37	0.52
<i>leifsonia</i>	-0.11	-0.21	<i>micavibrio</i>	-0.24	0.20	<i>nastoc</i>	-0.37	0.67
<i>UND_1-C3</i>	-0.12	0.23	<i>nonomuraea</i>	-0.24	-0.41	<i>sphingopyxis</i>	-0.37	0.69
<i>azospirillum</i>	-0.12	0.94	<i>oleomonas</i>	-0.24	-0.49	<i>nannocystis</i>	-0.37	0.46
<i>UND_1-C4</i>	-0.12	0.04	<i>sorangium</i>	-0.24	-0.02	<i>acidovorax</i>	-0.37	0.33
<i>conexibacter</i>	-0.12	0.39	<i>geobacter</i>	-0.24	0.27	<i>agromyces</i>	-0.37	0.61
<i>bauldia</i>	-0.12	0.10	<i>sinorhizobium</i>	-0.24	0.24	<i>subaequorebacter</i>	-0.37	0.85
<i>REC1_2-C4</i>	-0.12	-0.32	<i>verrucomicrobium</i>	-0.24	-0.49	<i>salicola</i>	-0.37	0.82
<i>mycoplana</i>	-0.12	0.64	<i>fontimonas</i>	-0.24	0.17	<i>chthonomonas</i>	-0.38	0.18
<i>methyloceanibacter</i>	-0.12	0.07	<i>alcaligenes</i>	-0.24	0.16	<i>modestobacter</i>	-0.38	0.59
<i>sphingomicrobium</i>	-0.12	0.19	<i>aciditerrimonas</i>	-0.25	0.10	<i>catelliglobosipora</i>	-0.38	0.44
<i>rhodanobacter</i>	-0.12	-0.31	<i>dehalococcoides</i>	-0.25	0.33	<i>cyanobacterium</i>	-0.38	0.43
<i>roseicyclus</i>	-0.13	0.34	<i>ectothiorhodospira</i>	-0.25	-0.03	<i>calothrix</i>	-0.38	0.96
<i>REC2_3-C4</i>	-0.13	0.04	<i>nitriliruptor</i>	-0.25	0.68	<i>bifissio</i>	-0.38	0.45
<i>vampirovibrio</i>	-0.13	-0.18	<i>ideonella</i>	-0.25	0.06	<i>kallotenue</i>	-0.38	0.59
<i>syntrophus</i>	-0.13	-0.13	<i>acrocarpospora</i>	-0.25	-0.32	<i>candidatus hepatoplasma</i>	-0.38	0.79
<i>ferrovum</i>	-0.13	0.15	<i>terrimonas</i>	-0.25	0.30	<i>vasilyevaea</i>	-0.39	0.49
<i>azoarcus</i>	-0.13	-0.17	<i>blastochloris</i>	-0.25	-0.26	<i>kineococcus</i>	-0.39	0.62
<i>methylococcus</i>	-0.13	0.07	<i>gemmata</i>	-0.25	-0.24	<i>catenuloplanes</i>	-0.39	0.40
<i>actinomycetospora</i>	-0.13	0.16	<i>luedemannella</i>	-0.25	-0.14	<i>leptolyngbya</i>	-0.39	1.13
<i>acetivibrio</i>	-0.13	-0.19	<i>sphingosinicella</i>	-0.25	0.29	<i>denitratisoma</i>	-0.40	0.61
<i>planomicrobium</i>	-0.14	0.24	<i>mizugakiibacter</i>	-0.25	-0.22	<i>ferrihrix</i>	-0.40	0.56
<i>derxia</i>	-0.14	-0.02	<i>rhodoplanes</i>	-0.25	-0.41	<i>coralloccoccus</i>	-0.40	0.41
<i>mesorhizobium</i>	-0.14	0.00	<i>chryseolinea</i>	-0.25	0.62	<i>oscillatoria</i>	-0.40	0.61
<i>granulicella</i>	-0.14	-0.14	<i>marinicella</i>	-0.25	-0.12	<i>desmonostoc</i>	-0.40	0.63
<i>candidatus cyrtobacter</i>	-0.14	-0.02	<i>sphingobium</i>	-0.25	0.09	V	-0.40	-0.27
<i>thermo flavimicrobium</i>	-0.14	-0.06	<i>thermacetogenium</i>	-0.25	0.24	<i>ehrichia</i>	-0.40	0.78
<i>REC2_1-C4</i>	-0.14	0.14	<i>kaistia</i>	-0.25	0.34	<i>aminobacter</i>	-0.40	0.10
<i>mucilaginibacter</i>	-0.15	-0.50	<i>wolbachia</i>	-0.25	0.13	<i>aurantimonas</i>	-0.41	0.97
<i>motilibacter</i>	-0.15	0.69	<i>escherichia</i>	-0.25	-0.32	pH	-0.41	-0.26
<i>REC2_2-C5</i>	-0.15	-0.30	<i>smaragdicroccus</i>	-0.26	0.32	<i>altererythrobacter</i>	-0.42	0.73
<i>c. phaeoamarinobacter</i>	-0.15	0.71	<i>kutzneria</i>	-0.26	-0.35	<i>oligoflexus</i>	-0.42	0.67

<i>UND_1-C5</i>	-0.15	0.09	<i>geobacillus</i>	-0.26	-0.02	<i>deinococcus</i>	-0.42	0.38
<i>actinomyces</i>	-0.15	0.25	<i>kaistobacter</i>	-0.26	0.32	<i>quadrishpaera</i>	-0.43	0.59
<i>bellilinea</i>	-0.15	0.27	<i>haliangium</i>	-0.26	0.05	<i>archangium</i>	-0.43	0.77
<i>REC1_1-C4</i>	-0.15	-0.34	<i>helicobacter</i>	-0.26	0.19	<i>aridibacter</i>	-0.44	0.56
<i>micromonospora</i>	-0.15	0.36	<i>methylobacterium</i>	-0.26	0.46	<i>oscillochloris</i>	-0.45	0.68
<i>thermodesulfobacterium</i>	-0.15	-0.04	<i>peredibacter</i>	-0.26	0.54	<i>krasilnikovia</i>	-0.45	0.50
<i>novosphingobium</i>	-0.15	-0.45	<i>phylobacterium</i>	-0.26	0.22	<i>desulfobacca</i>	-0.45	0.97
<i>SB</i>	-0.16	0.06	<i>chloroflexus</i>	-0.26	0.40	<i>amycolatopsis</i>	-0.45	0.73
<i>thermoanaerobacter</i>	-0.16	-0.02	<i>polyangium</i>	-0.26	0.12	<i>larkinella</i>	-0.45	0.71
<i>myxococcus</i>	-0.16	0.06	<i>aquabacterium</i>	-0.26	0.46	<i>chroococciopsis</i>	-0.45	0.63
<i>longilinea</i>	-0.16	0.43	<i>rhodobacter</i>	-0.26	0.38	<i>gottschalkia</i>	-0.45	0.54
<i>flavobacterium</i>	-0.16	-0.33	<i>pleomorphomonas</i>	-0.26	0.14	<i>belnapia</i>	-0.45	0.87
<i>cryocola</i>	-0.16	-0.11	<i>borrelia</i>	-0.27	0.23	<i>saccharothrix</i>	-0.46	0.86
<i>sterolibacterium</i>	-0.16	0.21	<i>hyalangium</i>	-0.27	0.28	<i>rhodocytophaga</i>	-0.46	1.17
<i>dechloromonas</i>	-0.16	0.01	<i>methylobacter</i>	-0.27	0.63	<i>rubellimicrobium</i>	-0.46	0.85
<i>roseomonas</i>	-0.16	-0.06	<i>adhaeribacter</i>	-0.27	0.43	<i>diaphorobacter</i>	-0.46	0.95
<i>candidatus microthrix</i>	-0.16	0.18	<i>chondromyces</i>	-0.27	0.30	<i>microcoleus</i>	-0.47	1.09
<i>halia</i>	-0.16	0.08	<i>kineosporia</i>	-0.27	0.28	<i>herpetosiphon</i>	-0.47	0.91
<i>candidatus vidania</i>	-0.17	0.35	<i>starkeya</i>	-0.27	0.32	<i>desulfocurvus</i>	-0.47	0.88
<i>REC2_2-C4</i>	-0.17	0.04	<i>massilia</i>	-0.27	0.39	<i>noviherbaspirillum</i>	-0.48	0.84
<i>rhodovibrio</i>	-0.17	-0.49	<i>ochrobactrum</i>	-0.27	0.18	<i>craurococcus</i>	-0.48	0.48
<i>nitrospira</i>	-0.17	0.28	<i>aureimonas</i>	-0.27	0.66	<i>segetibacter</i>	-0.49	0.93
<i>pelotomaculum</i>	-0.17	0.04	<i>terriglobus</i>	-0.27	-0.04	<i>dyadobacter</i>	-0.51	1.30
<i>pseudanabaena</i>	-0.17	0.18	<i>pseudolabrys</i>	-0.27	-0.40	<i>kitasatospora</i>	-0.52	0.60
<i>acetobacterium</i>	-0.17	-0.17	<i>brevibacterium</i>	-0.27	0.85	<i>oxalicibacterium</i>	-0.53	1.00
<i>truepera</i>	-0.17	0.57	<i>kinetoplastibacterium</i>	-0.27	0.43	<i>jishengella</i>	-0.54	0.64

CAPÍTULO 2

Distribuição de atributos microbiológicos e reconhecimento de padrões em solos impactados com rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem do Fundão, Mariana-MG

Helena Santiago Lima^a, Livia Carneiro Fidélis Silva^b, Maria Catarina Megumi Kasuya^c, Cynthia Canêdo da Silva^{d*}.

^a Pós-graduação, Estudante, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (hsantiagolima@gmail.com)

^b Ph. D., pesquisadora, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. (livia.silva@ufv.br)

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

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

*Autor correspondente: e-mail: ccanedo@ufv.br Av. Peter Henry Rolfs, s/n - Campus Universitário, Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Viçosa - MG, 36570-900, Tel.: +55 (31) 3899-2973.

Resumo: As atividades de mineração são conhecidas por resultarem em danos extensivos ao solo, causando distúrbios no ambiente, incluindo nas comunidades microbianas. Prever como a comunidade microbiana e sua atividade metabólica se comportam mediante a um impacto ambiental é muito importante para se realizar o monitoramento do real impacto nas áreas, bem como auxiliar nas tomadas de decisão dos processos de recuperação. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo monitorar o solo nos primeiros 100 quilômetros afetados pelo rompimento da barragem do Fundão, através da avaliação das características químicas e microbiológicas dessas áreas. Os resultados mostraram que mesmo, depois de três anos do rompimento da barragem, as áreas afetadas pela deposição do rejeito de mineração ainda se encontram distantes das áreas utilizadas como referencia neste estudo, tanto nas características químicas do solo, quanto nas microbiológicas, sendo as áreas mais próximas do local do rompimento da barragem as mais afetadas. Dentre os indicadores de qualidade do solo avaliados, os microbiológicos foram mais eficientes em demonstrar mudanças nas áreas impactadas. E, através da utilização de aprendizado de máquinas para o reconhecimento de padrões entre as áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito de mineração, foi possível separar as duas áreas, sendo a matéria orgânica e o carbono da biomassa microbiana as principais variáveis consideradas para a construção do modelo.

Palavras-chave: aprendizado de máquina, matéria orgânica, respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana.

1. Introdução

As atividades de mineração são conhecidas por resultarem em danos extensivos ao solo, causando distúrbios drásticos na paisagem, alterando o ambiente e a comunidade microbiana do solo, interrompendo, assim, a estabilidade funcional desse ambiente (Wang *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2016).

Em novembro de 2015 ocorreu à ruptura da barragem do Fundão, localizada no município de Mariana-MG, liberando um volume estimado de 43 milhões de m³ de rejeito de mineração na Bacia do Rio Doce, que ocupa grande parte do bioma Mata Atlântica que é considerado um *hotspot* de biodiversidade mundial (IBAMA, 2015; GFT, 2015; Samarco, 2016; Bowker, 2015). Antes atingir o Oceano Atlântico, onde a lama dispersou-se por quilômetros pela costa brasileira, ela percorreu 668 quilômetros, passando pelos estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Bianchini, 2016), o que gerou grandes prejuízos socioeconômicos e ambientais.

Os microrganismos, por serem sensíveis às condições ambientais, possivelmente foram os indivíduos mais afetados e, por seu papel chave na saúde dos ecossistemas, devem ser levados em consideração em qualquer plano de recuperação ambiental (Massaccesi *et al.*, 2015; Kohler *et al.*, 2016). Os microrganismos são fundamentais para a manutenção da multifuncionalidade dos solos, pois participam de diversas funções, como ciclagem de nutrientes, formação de associações biológicas com plantas, animais e outros microrganismos e no desempenho de serviços ambientais, especialmente necessários após perturbações antrópicas.

Para a recuperação do ambiente impactado por ações antrópicas não basta remover o contaminante, é preciso, também, restaurar o funcionamento dos ecossistemas que estava estabelecido anteriormente. Sendo assim, torna-se crucial

para os programas de recuperação ambiental, o monitoramento constante e avaliação de desempenho das atividades microbianas nos solos impactados.

Prever como a comunidade microbiana e sua atividade metabólica se comporta mediante um impacto ambiental é fundamental para realizar o monitoramento do real impacto nessas áreas, bem como auxiliar nas tomadas de decisão para otimizar o processo de recuperação. Para isso, é importante entender a relação entre ambiente e comunidade microbiana, ou seja, como o ambiente influencia a comunidade e, por sua vez, como a comunidade influencia o ambiente (Ruuskanen *et al.*, 2018). Atualmente, de forma geral, os trabalhos utilizam análise multivariada para explicar a relação entre comunidade microbiana e variáveis ambientais, neste trabalho vamos propor a utilização de aprendizado de máquina para reconhecimento de alterações de padrões em relação a área afetada e suas variáveis.

Esse trabalho teve como objetivo monitorar os 100 primeiros quilômetros afetados pelo rompimento da barragem do Fundão, por meio da avaliação das características químicas e microbiológicas dessas áreas. E, também, a construção de um modelo preditivo, por meio de aprendizado de máquina, que permita o reconhecimento de padrões que diferem entre as áreas afetadas e não afetadas pela deposição do rejeito, com o intuito de direcionar ações futuras de gestão ambiental para a reabilitação dessas áreas impactadas.

2. Material e Métodos

2.1. Local de estudo e amostragem

As coletas de amostras de solo foram realizadas ao longo dos primeiros 100 quilômetros afetados pela deposição de rejeito de mineração, em diversas planícies que sofreram inundação, nos municípios de Mariana e Barra Longa, estado de Minas Gerais, que sofreram ou não a intervenção de programas de revegetação, totalizando 84 pontos de coletas, divididos em 7 talhões distintos nomeados de M03, B36, M8, B65, B82, B98 e B139. Também, foram coletados 3 pontos de solo em matas adjacentes, que não foram diretamente afetadas pela lama do rejeito e 3 pontos de áreas não afetadas diretamente pelo rejeito que possui vegetação natural (Controle Regeneração) para serem utilizadas como referência.

A amostragem foi realizada pelo corpo técnico da Golder Associates, nos meses de fevereiro (2017 e 2018) e outubro (2017), representando as estações chuvosas e secas, respectivamente. Cada amostra composta foi constituída de 3 subamostras coletadas numa área de 1,5 m², na profundidade de 0 a 15 cm, acomodadas em sacos plásticos e estocadas a 10 °C, para análises químicas e enzimáticas.

Por problemas técnicos não foi possível realizar a amostragem do talhão B36 em fevereiro de 2018.

2.2. Análises químicas e físicas do solo

As análises químicas de rotina foram realizada em parceria com a empresa Golder Associates, seguindo a seguinte metodologia:

O pH foi determinado em água (relação 1:2,5 w/v), com o auxílio de um potenciômetro. Potássio (K) e fósforo (P) foram extraídos por solução bi-ácida composta por ácido sulfúrico e ácido hidrocloreídrico e determinados por fotometria de chama. Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Alumínio (Al) foram extraídos com uma solução neutra de cloreto de potássio (KCl , 1 mol L^{-1}), o cálcio e magnésio foram medidos com espectrofotômetro de absorção atômica (Varian) com a adição de cloreto de estrôncio a 0,05, e o alumínio foi medido por titulação com hidróxido de sódio. A acidez potencial (H + Al) foi extraída utilizando solução neutra de acetato de cálcio (1N) por titulação e hidróxido de sódio (NaOH). A saturação de bases (V), capacidade de troca catiônica (CTC) e a soma de bases (SB) foram calculadas. A matéria orgânica (M.O.) foi quantificada pelo método colorimétrico e a medição do carbono orgânico foi obtida através da aproximação $\text{C.O.} = \text{M.O.} / 1,724$ (Defelipo & Ribeiro, 1981).

Os dados dos fatores físicos do solo, teor de areia, silte e argila, foram gentilmente cedidos pela empresa Golder Associates.

2.3. Indicadores de Qualidade do solo

2.3.1. Carbono da Biomassa microbiana

O carbono da biomassa microbiana foi quantificado através do método da fumigação - extração proposto por Vance *et al.* (1987). Cada amostra foi pesada em duas subamostras contendo 10 g cada (massa úmida), a primeira subamostra, utilizada como controle e a segunda foi utilizada para o processo de fumigação. No dessecador foram adicionados as amostras para fumigação, 25 mL de clorofórmio e

em um frasco separado 5 g de NaOH, logo após, aplicou-se o vácuo e as amostras foram incubados por 48 horas.

Após o período de incubação as amostras foram retiradas do dessecador, essas amostras juntamente com as amostras controles que estavam estocadas foram preparadas para o processo de extração do carbono. Para obtenção do extrato foram adicionado 25 mL de K_2SO_4 na concentração de 0,5M, em seguida as amostras foram agitadas a 250 rpm durante o período de 1 hora. Após o período de agitação as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e os sobrenadantes foram filtrados.

O extrato filtrado posteriormente foi submetido a reação com permanganato de potássio proposta por Bartlett e Ross (1994) e em seguida foi realizado a medição em espectrofotômetro no comprimento de onda de 495nm.

Para obtenção dos valores foi feito uma curva de calibração com ácido oxálico nas concentrações de 0, 6, 12, 18 e 24 mg L⁻¹ de carbono Os valores obtidos foram corrigidos utilizando os controles e a umidade do solo.

2.3.2. Respiração basal do solo

A respiração basal do solo (C-CO₂) foi medida utilizando o equipamento respirômetro automatizado com detector infravermelho (*Sable Systems – 54 Mod. TR-RM8 Respirometer Multiplexer*, USA), seguindo o proposto por Heinemeyer *et al.* (1989), para isso foi adicionado 50 g de solo úmido de cada amostra em recipientes com capacidade de 500 mL que foram acoplados no respirômetro. As amostras ficaram incubadas durante um período de 96 h na temperatura de 25 °C.

O quociente metabólico (qCO_2) foi calculado pela razão (respiração basal do solo)/(carbono da biomassa microbiano) proposto por Anderson e Domsch (1993)

2.4.Extração de DNA total do solo

Foi extraído, de cada amostra, o DNA total do solo. Para isso, foi utilizado 0,5g e a extração foi realizada usando o Kit *Nucleospin Soil* (Macherey-Nagel Laboratories), seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra foi realizado a extração em triplicata, totalizando 810 amostras. A qualidade do DNA foi checada em eletroforese de gel de agarose 1%, corado com *Gel Red* (Biotium, USA) e quantificado em *Nanodrop* (Nanodrop ND-100, Nanodrop Technologies Inc.). As amostras estão na etapa de envio para sequenciamento.

2.5.Análises estatísticas

Para os dados gerados a partir dos experimentos de carbono da biomassa microbiana e respiração basal do solo, inicialmente foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk (SHAPIRO & WILK, 1965), como os dados não seguiram distribuição normal todos os grupos foram comparados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis (KRUSKAL, 1952). Depois foram realizadas múltiplas comparações com o mesmo conjunto de dados aplicando o teste não paramétrico de Dunn (DUNN, 1958). Todas as análises estatísticas serão feitas no *software* R. Valores com $P \leq 0,05$ serão considerados para indicar diferença estatística a 95 % de confiança.

As análises multivariadas (Análise de Correspondência Canônica) e a correlação de Pearson foram feitas utilizando o *software* PAST.

2.6. Aprendizado de máquinas

Para realizar a construção do modelo preditivo foram utilizados todos os dados químicos, microbiológicos e físicos. Foram utilizadas 212 amostras, que foram divididas em duas classes, i) Rejeito: amostras que foram afetadas pela deposição de rejeito e ii) Solo: amostras que não foram afetadas pela deposição de rejeito. Dessas amostras foram separadas 70% para o grupo de treino e 30% para o grupo de validação do modelo.

Foi utilizado o algoritmo Random Forest (Breiman *et al.*, 2001; Liaw and Wiener, 2002) com 5.000 árvores, usando o pacote Range 0.7.0 (Wright and Ziegler, 2015).

3. Resultados e discussão

3.1. Avaliação dos indicadores microbiológicos de qualidade do solo

A análise de correspondência canônica (CCA) construída com dados físico-químicos e biológicos foi sensível para separar as amostras, explicando 84,29% da variação dos dados entre as áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito (PC1 71,78% e PC2 12,51%) (Figura 1).

As variáveis microbiológicas e o tempo foram as que possuíram maior influência na separação das amostras, quando comparadas com as variáveis

químicas. Sendo que a primeira coleta está sendo mais influenciada pelo quociente metabólico (qCO_2) e respiração basal do solo ($C-CO_2$), enquanto a última coleta esta sendo mais influenciada pelo carbono da biomassa microbiana (CBM) (Figura 1).

As áreas de florestas apresentaram maior valor de carbono da biomassa microbiana (CBM) do que todas as outras amostras afetadas pelo rejeito de mineração (Figura 2A), de forma geral, esse padrão pode ser observado para a respiração basal do solo (RBS) (Figura 2B).

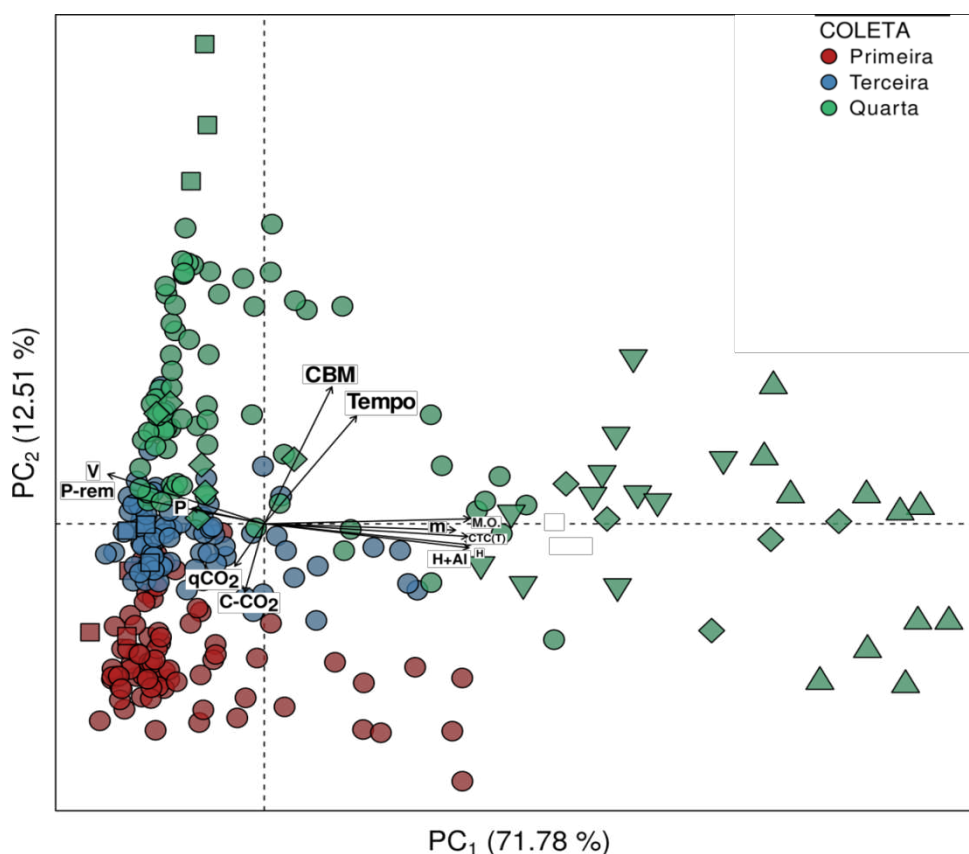


Figura 1. Análise de correspondência canônica (CCA) relacionando os atributos microbiológicos do solo com as variáveis ambientais, nas diferentes nas 3 épocas coletas. Formas de losango representam áreas de florestas, círculos planícies afetadas pelo rejeito, triângulos áreas afetadas com o rejeito revegetada por pastagem, quadrado áreas de rejeito. V = saturação por base, P = fósforo, m =

saturação por alumínio, Al = alumínio, CTC (t) = capacidade de troca catiônica efetiva, CTC (T) = capacidade de troca catiônica potencial, Mg = magnésio, SB = soma de bases e Ca = cálcio, P-rem = fósforo remanescente, qCO₂ = quociente metabólico, C-CO₂ = respiração basal do solo, CBM = carbono da biomassa microbiana.

O crescimento de vegetação em ambientes impactados proporciona melhoria nas características físico-químicas do solo, como a produção de exsudatos radiculares e agregação do solo, o que favorece diretamente a comunidade microbiana local (Carvalho *et al.*, 2016; Teixeira *et al.*, 2017). Na Figura 1 pode ser observada maior relação do CBM, como um fator importante na separação das amostras afetadas pelo rejeito pertencentes à terceira coleta. Um dos fatores que pode explicar a maior influência do CBM na terceira coleta é o crescimento progressivo da vegetação nessas áreas (Tabela S2), sendo que na última coleta a vegetação estava mais abundante quando comparado à primeira coleta e isso proporcionou melhores condições para o crescimento microbiano.

O restabelecimento da comunidade microbiana é fundamental para a retomada da multifuncionalidade do solo e com isso o sucesso na recuperação de ambientes impactados (Skirycz *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016), sendo assim, o tempo torna-se crucial para a recuperação das áreas, pois influencia diretamente no crescimento da vegetação, que esta diretamente relacionada com o aumento do CBM. (Figura 2A).

Os solos são ambientes que se caracterizam por apresentarem grande complexidade, o que torna a resposta de respiração basal frente a um impacto ambiental muito variável. Com isso, a utilização das respostas respiratórias como

indicador de impacto ambiental deve ser feita em conjunto de outras variáveis, como o quociente metabólico (qCO_2), por exemplo (Romero-Freire *et. al.*, 2016).

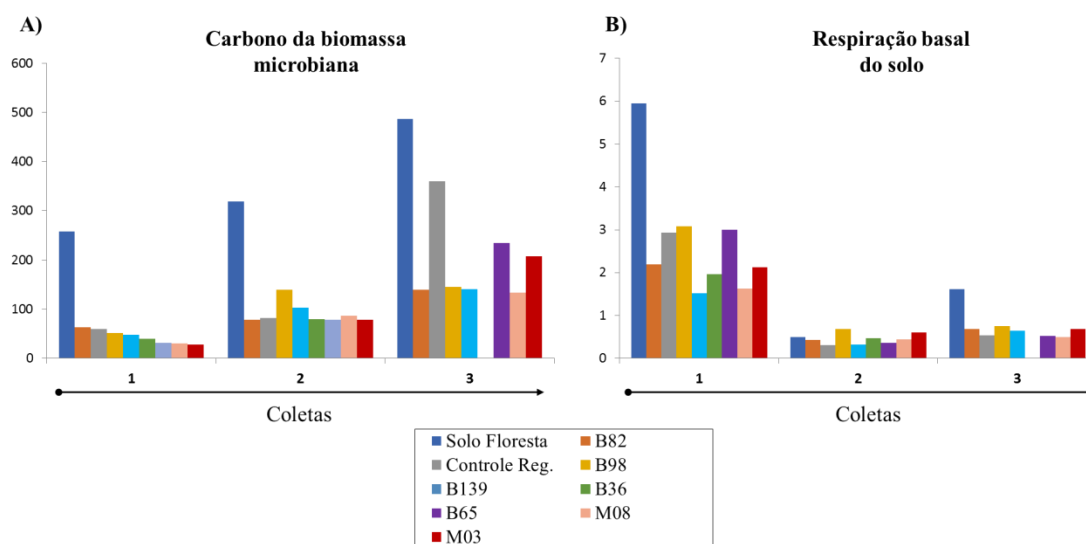


Figura 2. Média dos valores dos indicadores microbiológicos do solo dos diferentes talhões, nas diferentes coletas. **A)** Carbono da biomassa microbiana ($\mu g/g$). **B)** Respiração basal do solo ($\mu mol/g$).

A respiração basal do solo foi menor nas áreas afetadas com o rejeito quando comparado com as áreas de florestas, utilizadas como referência (Figura 2B). As áreas de florestas possuem vegetação mais densa, o que está diretamente relacionada com o aumento da taxa respiratória do solo (Yang *et. al.*, 2017), pois a presença de plantas proporciona efeitos benéficos sobre as propriedades do solo, pela atividade de exsudatos radiculares, permitindo o aumento da biomassa microbiana (Massaccesi *et al.*, 2015). A redução da taxa respiratória, mediante um impacto ambiental, já foi observada por outros autores e pelo nosso grupo ao estudar as áreas afetadas no município de Paracatu de Baixo, resultados que podem ser observados no Capítulo 1 deste trabalho. Essa redução pode estar relacionada com alterações nas características

físico-químicas do ambiente, tornando-o menos propício para o crescimento da biomassa microbiana (Wakelin *et al.*, 2010; Zornoza *et al.*, 2015).

Para o quociente metabólico (qCO_2), as áreas de floresta apresentaram valores menores que as áreas afetadas (Tabela 1). O qCO_2 é um índice que expressa a taxa de respiração por unidade de biomassa microbiana, logo quanto menor a perda de $C-CO_2$, que não é revertido para o crescimento celular, maior é a eficiência metabólica desse ambiente (Quadros *et. al.*, 2016). Portanto, apesar das amostras de florestas apresentarem elevada respiração basal do solo quando comparada com as áreas afetadas (Figura 2B), esse gasto energético está sendo convertido em crescimento da biomassa, mostrando, assim, eficiência metabólica desse ambiente. As amostras afetadas pelo rejeito apresentaram elevados valores de qCO_2 , logo baixa eficiência metabólica, que é característico de ambientes submetidos a algum tipo de impacto (Carneiro *et. al.*, 2008).

Tabela 1. Média dos valores do quociente metabólico (qCO_2) (n=12), para as diferentes amostras.

Área Amostral	qCO_2 ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ de solo)		
	1	2	3
Solo Floresta	0.0200	0.0015	0.0033
B82	0.0417	0.0056	0.0049
B139	0.0442	0.0032	0.0048
B36	0.0658	0.0059	-----
Controle Reg.	0.0667	0.0038	0.0015
B98	0.0817	0.0049	0.0052
M08	0.0833	0.0052	0.0041
M03	0.1855	0.0079	0.0035
B65	0.2383	0.0047	0.0024

Ao mapear os pontos de coleta é possível observar que aqueles localizados mais próximos ao local do rompimento da barragem do Fundão foram os que tiveram

os atributos microbiológicos do solo mais afetados, quando comparado com os mais distantes (Figura 3).

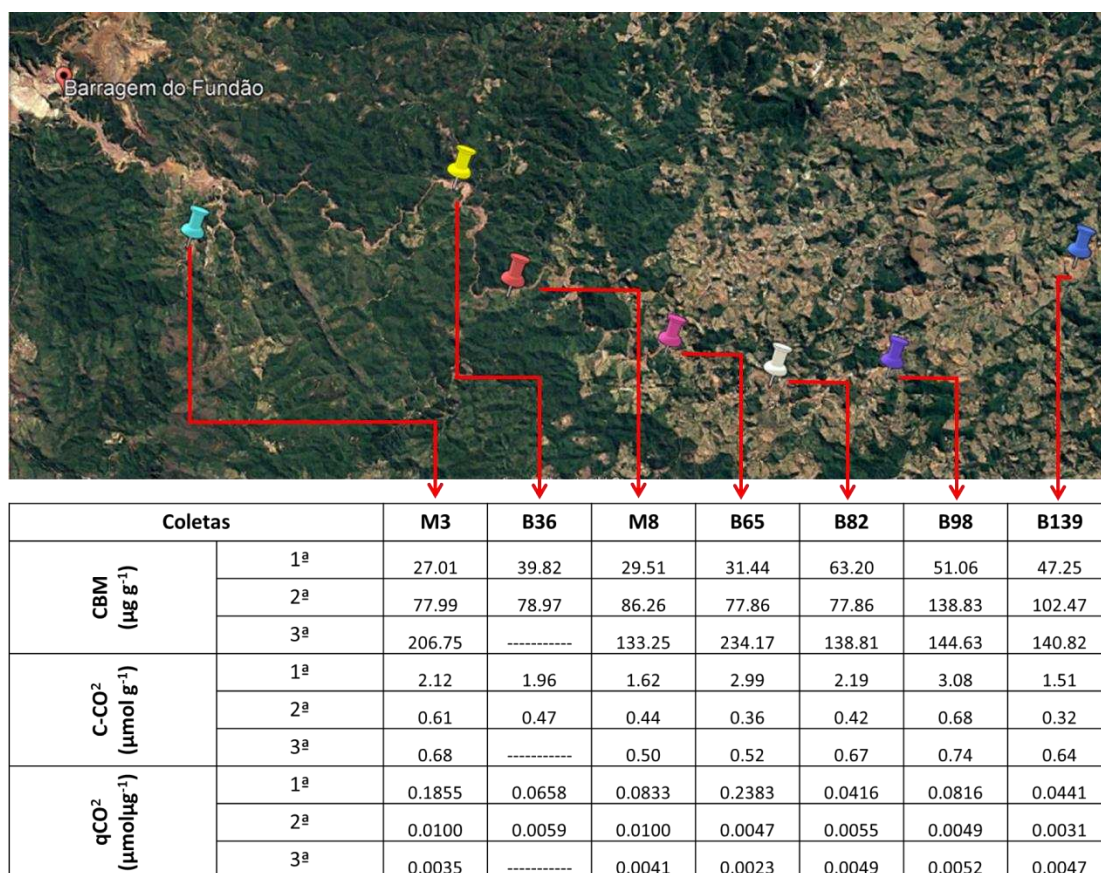


Figura 3. Média dos valores dos indicadores microbiológicos do solo dos diferentes talhões, espacializados ao longo do local do rompimento da barragem. Ponto vermelho = localização do rompimento da barragem de Fundão, demais pontos = localização das áreas afetadas.

Todas as amostras afetadas pela deposição do rejeito tiveram alterações significativas em sua composição química, principalmente nos valores de pH, matéria orgânica e nitrogênio (Tabela S1), os quais são comprovadamente fundamentais na modulação da atividade microbiana (Balogh *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2010; Azarbad *et al.*, 2013). As alterações drásticas nas características químicas das áreas mais próximas ao local do rompimento da barragem é um dos principais fatores

que influenciaram de forma negativa os atributos microbiológicos. Conforme a amostragem das áreas se afasta do local do rompimento ocorre redução do impacto, mais ainda é possível verificar o forte efeito da deposição de rejeito em toda a área afetada.

3.2. Correlação entre características químicas e atributos microbiológicos do solo

A respiração basal do solo (RBS) foi descrita como sendo correlacionada positivamente com a biomassa microbiana (Figura 4), conforme observado também por Romero-Freire e colaboradores (2016). Logo as variáveis que influenciaram o CBM, sejam elas negativas ou positivas, também influenciaram a RBS. A matéria orgânica, nitrogênio, CTC(t), CTC (T) e acidez potencial foram as variáveis que apresentaram maior correlação positiva com os atributos microbiológicos do solo, enquanto o pH apresentou correlação negativa (Figura 4).

O pH apresentou valores mais alcalinos nas áreas afetadas pelo rejeito (Tabela S1) comparado com as áreas de floresta, como já foi dito no Capítulo 1 deste trabalho, o rejeito que depositou-se nessas áreas possuem em sua composição substâncias que são de caráter alcalino, como hidróxido de sódio, fazendo com que esse ambiente apresente tendência mais alcalina do que naturalmente é encontrado (Silva *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2017). O pH é caracterizado por ter a capacidade de influenciar a comunidade microbiana em diversos aspectos, com alteração nas funções metabólicas essenciais e regulação da disponibilização dos nutrientes (Azarbad *et al.*, 2013; Rousk *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016). Epelde *et al.* (2010) também

demostrou que o elevado pH do solo influenciou negativamente a atividade microbiana local, em solo impactado pela atividade de mineração.

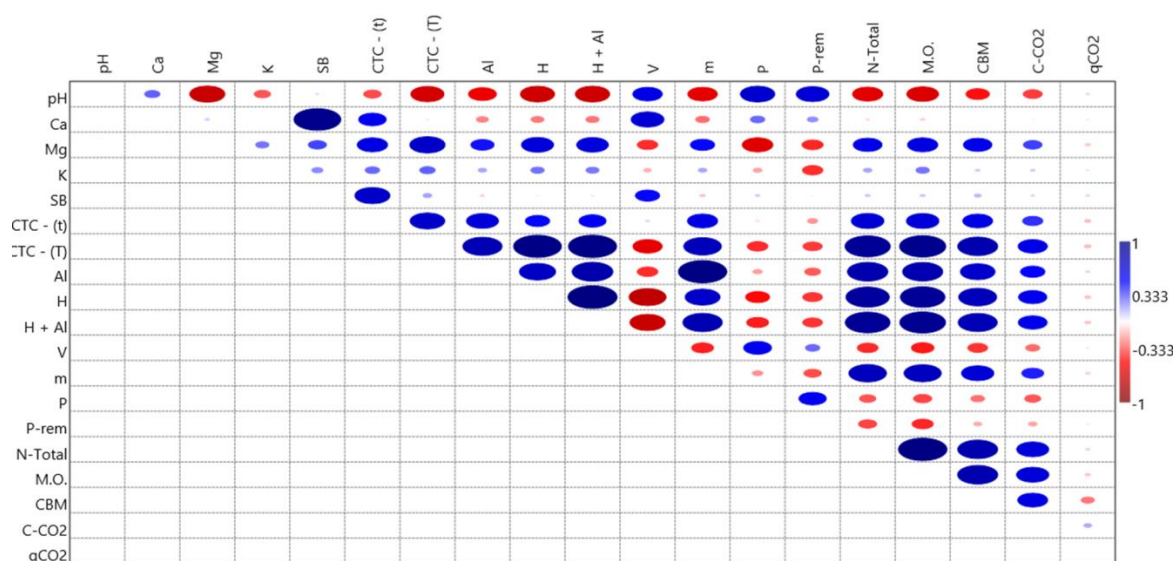


Figura 4. Correlação de Pearson entre as variáveis químicas e microbiológicas do solo. Ca = cálcio, Mg = magnésio, K = potássio, SB = soma de bases, CTC (t) = capacidade de troca catiônica efetiva, CTC (T) = capacidade de troca catiônica potencial, Al = alumínio, H = hidrogênio, H+Al = Acidez potencial, V = saturação por base, m = saturação por alumínio, P = fósforo, P-rem = fósforo remanescente, N-Total = nitrogênio, MO = matéria orgânica, CBM = carbono da biomassa microbiana, C-CO2 = respiração basal do solo e qCO2 = quociente metabólico.

A matéria orgânica teve correlação positiva com os atributos microbiológicos do solo (Figura 4), sendo um dos principais fatores que explica a diferença de carbono da biomassa microbiana e, conseqüentemente, a respiração basal do solo, entre as áreas afetadas pelo rejeito de mineração e as áreas de floresta (Figura 2A), as quais apresentaram teores de matéria orgânica inferiores às áreas de florestas. Rejeitos de mineração têm, como característica baixo teor de matéria orgânica e como conseqüências baixa concentração de nutrientes (Wang *et al.*, 2011). Com a

deposição do rejeito de mineração nessas áreas houve o soterramento do horizonte A do solo, horizonte onde há o maior acúmulo de matéria orgânica. A matéria orgânica traz vários benefícios para aumentar a qualidade do solo, geralmente implica maior disponibilidade de nutrientes, principalmente carbono, provenientes da mineralização de compostos orgânicos, sendo assim influencia de forma direta a comunidade microbiana (Straathof *et al.*, 2014; Xiao *et al.* 2015; Yang *et al.*, 2017).

A CTC apresentou alta correlação com a matéria orgânica do solo (Figura 4). Este fator caracteriza a capacidade de retenção de cátions por um solo, sendo assim pode ser considerada a capacidade do solo em reter nutrientes, alimentando assim a capacidade desse solo em sustentar a vida em seu ecossistema. A matéria orgânica presente no solo possui em sua superfície elevada concentração de cargas livres, sendo considerada a substância que mais eleva a CTC de um solo (Embrapa, 2010). Logo, assim como a matéria orgânica, a CTC teve correlação positiva com os atributos microbiológicos do solo. Como as áreas afetadas com rejeito de mineração apresentaram baixa CTC, efetiva e potencial, quando comparada com as áreas de floresta, essa também é uma característica que influenciou a diferença dos atributos microbiológicos entre as áreas afetadas ou não pela deposição do rejeito (Figura 2).

Os microrganismos do solo são fundamentais para a manutenção dos ecossistemas, por isso, para que haja a recuperação de um ambiente impactado é necessário, primeiramente, a recuperação das atividades e da estrutura da comunidade microbiana (Kohler *et al.*, 2016). A revegetação de um solo impactado traz efeitos benéficos para o solo e, como consequência, para a comunidade microbiana, sendo a primeira estratégia para programas de recuperação de ambientes impactados. Os resultados de atributos microbiológicos do solo apresentaram um

padrão de resposta mediante a localização em relação ao ponto do rompimento da barragem (Figura 3), e foi demonstrado que as características químicas do solo tiveram papel fundamental, influenciando esse padrão de resposta (Figura 4). Porém, a quantidade de biomassa vegetal não teve o mesmo padrão de resposta em relação aos atributos microbiológicos do solo, pois, nem sempre, as regiões onde se verificaram maior biomassa vegetal apresentaram maiores valores para os atributos microbiológicos do solo (Tabela S2 e Figura 2). Há trabalhos mostrando que essa relação nem sempre é direta, ela pode ser positiva, neutra ou negativa (Eisenhauer *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2008; Rottstock *et al.*, 2014), essa relação vai além da presença ou ausência de biomassa vegetal, e sim da diversidade de fitomorfologias que se encontram no ambiente (Fanin *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2014, 2015).

3.3. Correlação entre áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito por meio de índices de qualidade do solo

A correlação entre as áreas afetadas e as áreas de floresta aumentou com o passar do tempo, como pode ser visto na rede de correlação construída com os fatores físico-químicos e microbiológicos do solo (Figura 5), mostrando, mais uma vez, a importância do tempo e todas as melhorias que advem dele para a recuperação das áreas afetadas.

Esse padrão pode ser avaliado numericamente, na primeira coleta a correlação média entre as áreas afetadas pelo rejeito de mineração e as áreas de florestas eram de, aproximadamente, 41%, porém, na terceira coleta, essa correlação aumentou para, aproximadamente, 64% (Figura 5B).

Os atributos microbiológicos apresentaram resposta mais rápida à alterações ambientais, quando comparado com os atributos físico-químicos do solo, sendo assim se tornam importantes indicadores de qualidade do solo, que podem ser utilizados em programas de recuperação de áreas impactadas (Dilly *et al.*, 2018).

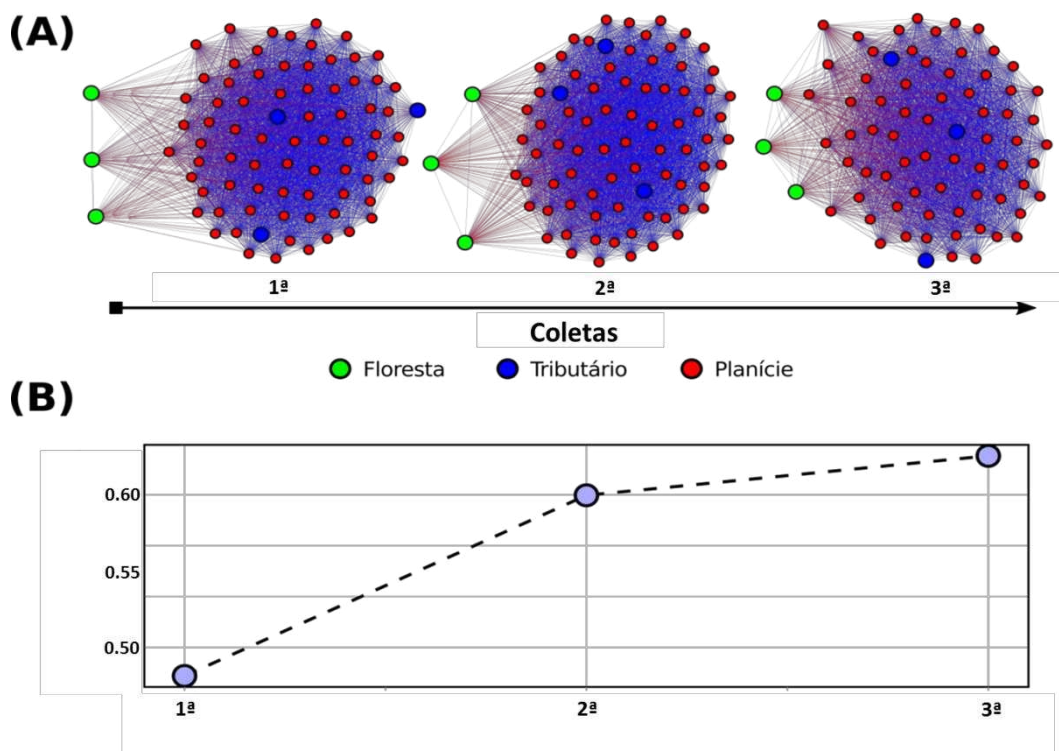


Figura 5. A) Rede de correlação entre as áreas afetadas e não afetadas pela deposição do rejeito, utilizando os atributos físicos, químicos e microbiológicos do solo. B) Valor da correlação média entre as áreas afetadas e não afetadas pela deposição do rejeito.

Foi possível observar o aumento da correlação entre as áreas afetadas com o rejeito das áreas de floresta com o passar do tempo (Figura 5), porém, o conhecimento de que mudanças na comunidade microbiana e em suas atividades podem preceder mudanças detectáveis nas propriedades físico-químicas do solo, fornece sinais precoces de estresse ambiental ou evolução de ecossistemas em

processo de recuperação (Dangi *et al.*, 2012). Por isso, ao separar a contribuição das variáveis químicas, físicas e microbiológicas do solo é possível observar que somente os microbiológicos tiveram aumento de correlação significativa, entre a primeira e a última coleta, com as áreas de florestas (Figura 6). Isso fortalece a necessidade de utilizar os indicadores microbiológicos como ferramenta para avaliar e monitorar a recuperação dessas áreas impactadas com o rejeito de mineração.

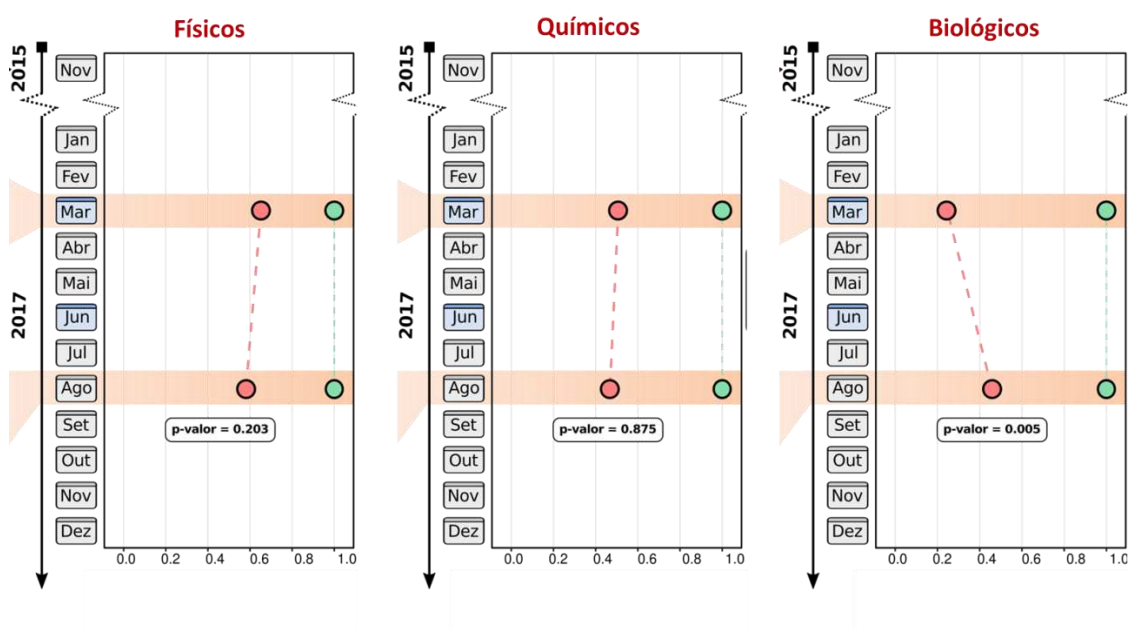


Figura 5. Correlação média dos atributos físicos, químicos e microbiológicos entre as áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito. Círculos vermelhos representam as áreas de rejeito, círculos verde representam áreas de florestas.

3.4. Construção do modelo preditivo através de aprendizagem de máquinas

Prever como a comunidade microbiana e sua atividade metabólica se comporta mediante um impacto ambiental é fundamental para realizar o monitoramento do real impacto nessas áreas, bem como auxiliar nas tomadas de decisões para otimizar o processo de recuperação. Para isso, é importante entender a relação entre ambiente e comunidade microbiana, ou seja, como o ambiente influencia a comunidade e vice-versa. Adicionalmente às análises de multivariadas, a utilização de modelos de aprendizado de máquina tem se tornado cada vez mais presente para realizar essas predições (Kuang *et. al*, 2013; Pasolli *et. al*, 2016).

Assim, aplicando a metodologia de aprendizado de máquina foi possível verificar que, dentre todos os atributos físico-químicos e microbiológicos fornecidos para a construção do modelo preditivo, o teor de matéria orgânica e o carbono da biomassa microbiana foram as variáveis mais importantes para separar as áreas de rejeitos daquelas de solo natural, na construção da árvore de decisão (Figura 6).

Com base no modelo, áreas de florestas foram classificadas como possuindo valores de matéria orgânica acima de 3,1% e carbono da biomassa microbiana acima de 123,0 µg/g, as demais áreas, com valores abaixo desse critério, para as respectivas variáveis foram classificadas como áreas de rejeito. Assim, foi possível classificar, corretamente, 114 amostras das 148 amostras utilizadas no grupo de treino, caracterizando um erro de 0,2297 para o ajuste do modelo.

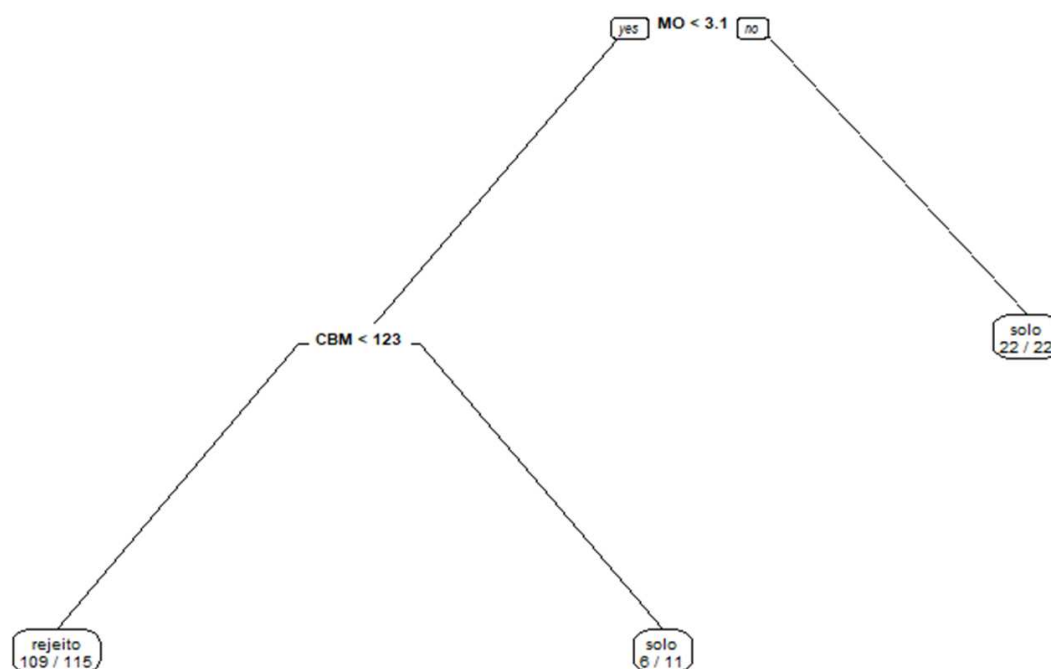


Figura 6. Árvore de decisão para a classificação das amostras afetadas e não afetadas pelo rejeito. MO representa a matéria orgânica e CBM representa o carbono da biomassa microbiana.

Ao longo das coletas, algumas amostras afetadas com o rejeito ultrapassaram o valor de 123,0 $\mu\text{g/g}$ de carbono da biomassa microbiana (Tabela S1), isso mostra o início da recuperação dessas áreas, uma vez que atributos microbiológicos do solo são sensíveis para detectar mudanças ambientais. Porém nenhuma amostra atingiu 3,1% de teor de matéria orgânica (Tabela S1), uma vez que fatores químicos demoram mais tempo para responder ao processo de recuperação de áreas impactadas quando comparados a fatores microbiológicos (Figura 5). Logo, espera-se que no futuro haja o aumento do valor de teor de matéria orgânica. Mediante esses resultados, foi possível propor que esses valores possam ser utilizados futuramente como índices para avaliar o grau de recuperação dessas áreas afetadas com o rejeito de mineração. Vale ressaltar que esses critérios, *a priori*, se adequam somente às

áreas dos primeiros 100 km afetados com o rompimento da barragem do Fundão, porém, com o incremento de dados, é possível realizar extrapolações para novas áreas.

4. Conclusões

Mesmo após três anos do rompimento da Barragem do Fundão em Mariana-MG, as áreas afetadas pela deposição do rejeito de mineração ainda encontram-se distantes das áreas de florestas não afetadas diretamente pelo rejeito, tanto nas características químicas do solo, quanto nas microbiológicas. Porém quando se compara as amostragens é possível observar uma melhora das áreas afetadas ao longo do tempo.

As áreas mais próximas ao local do rompimento da barragem tiveram suas características microbiológicas mais afetadas do que as mais afastadas, e esse padrão de resposta está diretamente correlacionada com as alterações das características químicas desse ambiente. As variáveis ambientais que tiveram maior influência nas atividades microbiológicas foram o pH, matéria orgânica e CTC.

A revegetação de áreas impactadas é muito importante para que haja a recuperação das atividades e da estrutura da comunidade microbiana, porém não basta somente à presença de biomassa vegetal, nota-se a necessidade de uma diversidade de plantas para a recuperação do ambiente.

Os indicadores microbiológicos de qualidade do solo foram mais eficientes em demonstrar mudanças nas áreas impactadas, fortalecendo a necessidade de sua

utilização como ferramenta para avaliar a recuperação dessas áreas impactadas com o rejeito de mineração.

Através da aplicação de aprendizado de máquinas para o reconhecimento de padrões entre as áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito de mineração, foi possível realizar a separação entre as duas áreas, sendo os pontos de corte: teor de matéria orgânica (3,1%) e carbono da biomassa microbiana (123 $\mu\text{g/g}$). É possível propor que esses valores sejam utilizados futuramente como índices de avaliação do grau de recuperação dessas áreas impactadas pelo rejeito de mineração nos primeiros 100 km do rompimento da barragem do Fundão e com o incremento de dados será possível extrapolar para demais áreas.

Agradecimentos

Os autores são gratos à FAPEMIG, CNPq e CAPES/PROEX001 pelo apoio financeiro e GOLDER ASSOCIATES Inc. pelo apoio técnico na escolha dos pontos de amostragem, coletas e análises físico-químicas, vegetal e microbiológicas.

Referências

AZARBAD, Hamed et al. Microbial community structure and functioning along metal pollution gradients. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 9, p. 1992-2002, 2013.

- BALOGH, J. et al. Dependence of soil respiration on soil moisture, clay content, soil organic matter, and CO₂ uptake in dry grasslands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1006-1013, 2011.
- BIANCHINI, A. Relatório: avaliação do impacto da lama/pluma Samarco sobre os ambientes costeiros e marinhos (ES e BA) com ênfase nas unidades de conservação 1a expedição do navio de pesquisa Soloncy Moura do CEPSUL. **ICMBio, Brasília**, 2016.
- BOWKER, Lindsay Newland. Samarco dam failure: Largest by far in recorded history. **Bowker Associates, Science & Research In The Public Interest**, v. 12, 2015.
- CARNEIRO, Marco Aurélio Carbone et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossequências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 621-632, 2008.
- CARVALHO, Teotonio Soares et al. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. **Ecology**, v. 97, n. 10, p. 2760-2771, 2016.
- DANGI, Sadikshya R. et al. Soil microbial community recovery in reclaimed soils on a surface coal mine site. **Soil Science Society of America Journal**, v. 76, n. 3, p. 915-924, 2012.
- DILLY, Oliver; POMPILI, Letizia; BENEDETTI, Anna. Soil micro-biological indicators separated land use practices in contrast to abiotic soil properties at the

- 50km scale under summer warm Mediterranean climate in northern Italy. **Ecological Indicators**, v. 84, p. 298-303, 2018.
- EISENHAUER, Nico et al. Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. **Ecology**, v. 91, n. 2, p. 485-496, 2010.
- EPELDE, Lur et al. Interactions between plant and rhizosphere microbial communities in a metalliferous soil. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1576-1583, 2010.
- FANIN, Nicolas et al. Does variability in litter quality determine soil microbial respiration in an Amazonian rainforest?. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1014-1022, 2011.
- GTF. Avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da barragem de Fundão em Mariana-MG. **Relatório Secretaria do Estado de Minas Gerais**. 2016.
- IBAMA. Impactos sociais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais. **Laudo técnico preliminar** . 2015. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/ambientais/laudotecnico_preliminar.pdf.
- JOHNSON, David; PHOENIX, Gareth K.; GRIME, J. Philip. Plant community composition, not diversity, regulates soil respiration in grasslands. **Biology Letters**, v. 4, n. 4, p. 345-348, 2008.
- KOHLER, J. et al. Suitability of the microbial community composition and function in a semiarid mine soil for assessing phytomanagement practices based on

- mycorrhizal inoculation and amendment addition. **Journal of Environmental Management**, v. 169, p. 236-246, 2016.
- KUANG, Jia-Liang et al. Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. **The ISME Journal**, v. 7, n. 5, p. 1038, 2013.
- LANGE, Markus et al. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. **PloS One**, v. 9, n. 5, p. e96182, 2014.
- LANGE, Markus et al. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. **Nature Communications**, v. 6, p. 6707, 2015.
- LI, Renyi et al. Biodegradation of isoproturon in agricultural soils with contrasting pH by exogenous soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 149-159, 2016.
- LIN, Changcun et al. Influences of major nutrient elements on Pb accumulation of two crops from a Pb-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, n. 1-3, p. 202-208, 2010.
- MASSACCESI, L. et al. Rhizosphere effect of three plant species of environment under periglacial conditions (Majella Massif, central Italy). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89, p. 184-195, 2015.
- PASOLLI, Edoardo et al. Machine learning meta-analysis of large metagenomic datasets: tools and biological insights. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 7, p. e1004977, 2016.

- QUADROS, Patricia Dorr et al. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. **Applied Soil Ecology**, v. 98, p. 195-203, 2016.
- ROMERO-FREIRE, A. et al. Is soil basal respiration a good indicator of soil pollution?. **Geoderma**, v. 263, p. 132-139, 2016.
- ROTTSTOCK, Tanja et al. Higher plant diversity promotes higher diversity of fungal pathogens, while it decreases pathogen infection per plant. **Ecology**, v. 95, n. 7, p. 1907-1917, 2014.
- ROUSK, Johannes et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, v. 4, n. 10, p. 1340, 2010.
- RUUSKANEN, Matti O. et al. Physicochemical drivers of microbial community structure in sediments of Lake Hazen, Nunavut, Canada. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- SAMARCO. Atualização do Plano de Recuperação Ambiental Integrado. 2016. Disponível em: <http://www.samarco.com/wp-content/uploads/2016/10/prai-agosto.pdf>
- SANTOS, Jessé Valentim et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6735-6748, 2016.
- SILVA, Gilson et al. Caracterização química, física e mineralógica de estéreis e rejeito da mineração de ferro da Mina de Alegria, Mariana-MG. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 36, n. 1, 2006.

- SKIRYCZ, Aleksandra et al. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 653, 2014.
- STRAATHOF, Angela L. et al. Dynamics of soil dissolved organic carbon pools reveal both hydrophobic and hydrophilic compounds sustain microbial respiration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 79, p. 109-116, 2014.
- TEIXEIRA, Anita Fernanda dos Santos et al. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings: Inoculum potential, density, and diversity of spores related to soil properties. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 5, p. 511-525, 2017.
- XIAO, Ye; HUANG, Zhigang; LU, Xianguo. Changes of soil labile organic carbon fractions and their relation to soil microbial characteristics in four typical wetlands of Sanjiang Plain, Northeast China. **Ecological Engineering**, v. 82, p. 381-389, 2015.
- XIONG, Xinni; TSANG, Daniel CW; OK, Y. S. Chemical Characterization of Mine Sites. **Spoil to Soil: Mine Site Rehabilitation and Revegetation**, 2017.
- ZHANG, Chong-Bang et al. Effects of plant diversity on nutrient retention and enzyme activities in a full-scale constructed wetland. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1686-1692, 2010.
- ZORNOZA, R. et al. Main factors controlling microbial community structure and function after reclamation of a tailing pond with aided phytostabilization. **Geoderma**, v. 245, p. 1-10, 2015.

WAKELIN, Steven Alan et al. Structural and functional response of soil microbiota to addition of plant substrate are moderated by soil Cu levels. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 4, p. 333-342, 2010.

WANG, Li-ping et al. Selection experiments for the optimum combination of AMF-plant-substrate for the restoration of coal mines. **Mining Science and Technology (China)**, v. 19, n. 4, p. 479-482, 2009.

WANG, Jiang et al. Different spontaneous plant communities in Sanmen Pb/Zn mine tailing and their effects on mine tailing physico-chemical properties. **Environmental Earth Sciences**, v. 62, n. 4, p. 779-786, 2011.

YANG, Wenhao et al. Biomass, activity and structure of rhizosphere soil microbial community under different metallophytes in a mining site. **Plant and Soil**, p. 1-18, 2017.

Material Suplementar

Tabela S1. Média dos valores das características químicas do solo (n=12) para os diferentes talhões.

	Coleta	M03	B36	M08	B65	B82	B98	B139	Controle	Floresta
pH (H ₂ O)	1 ^a	6.07	7.28	6.70	6.99	6.48	5.86	6.08	7.02	4.76
	3 ^a	6.23	6.90	7.48	6.92	6.44	5.89	6.49	8.34	4.15
	4 ^a	5.99	-----	6.82	6.21	6.16	6.23	5.90	7.48	4.12
Ca ²⁺ cmol _c /dm ³	1 ^a	0.86	0.98	1.21	0.97	0.86	1.37	1.04	1.04	1.02
	3 ^a	1.50	1.15	1.30	1.05	0.96	1.70	1.03	1.67	0.95
	4 ^a	1.57	-----	1.33	1.17	1.23	1.77	1.01	1.58	1.28
Mg ²⁺ cmol _c /dm ³	1 ^a	0.10	0.05	0.07	0.08	0.10	0.15	0.18	0.07	0.36
	3 ^a	0.21	0.07	0.07	0.09	0.10	0.24	0.17	0.07	0.23
	4 ^a	0.10	-----	0.07	0.10	0.14	0.18	0.24	0.05	0.27
K ⁺ cmol _c /dm ³	1 ^a	0.12	0.05	0.08	0.06	0.04	0.08	0.07	0.04	0.12
	3 ^a	0.35	0.07	0.14	0.19	0.10	0.20	0.19	0.09	0.12
	4 ^a	0.11	0.00	0.04	0.05	0.08	0.08	0.14	0.04	0.16
SB cmol _c /dm ³	1 ^a	1.08	1.08	1.36	1.11	1.00	1.60	1.29	1.16	1.50
	3 ^a	2.05	1.29	1.51	1.33	1.15	2.14	1.40	1.83	1.30
	4 ^a	1.78	-----	1.44	1.31	1.44	2.03	1.38	1.67	1.71
CTC(t) cmol _c /dm ³	1 ^a	1.08	1.08	1.36	1.11	1.00	1.60	1.54	1.16	2.90
	3 ^a	2.12	1.29	1.51	1.33	1.15	2.14	1.68	1.83	2.66
	4 ^a	1.78	-----	1.44	1.31	1.47	2.03	1.57	1.67	3.31
CTC(T) cmol _c /dm ³	1 ^a	2.50	2.23	2.10	2.67	3.07	3.45	3.54	1.49	10.20
	3 ^a	3.63	1.84	1.79	2.05	1.99	3.82	2.82	1.93	9.16
	4 ^a	2.85	-----	1.74	1.91	2.25	3.08	2.89	1.67	10.28
Al ³⁺ cmol _c /dm ³	1 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	1.40
	3 ^a	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	1.37
	4 ^a	0.00	-----	0.00	0.00	0.02	0.00	0.18	0.00	1.60
H ⁺ cmol _c /dm ³	1 ^a	1.43	1.14	0.74	1.56	2.08	1.85	2.00	0.33	7.30
	3 ^a	1.50	0.55	0.28	0.73	0.83	1.68	1.14	0.10	6.50
	4 ^a	1.07	-----	0.30	0.60	0.78	1.05	1.32	0.00	6.97
H + Al cmol _c /dm ³	1 ^a	1.43	1.14	0.74	1.56	2.08	1.85	2.25	0.33	8.70
	3 ^a	1.58	0.55	0.28	0.73	0.83	1.68	1.43	0.10	7.87
	4 ^a	1.07	-----	0.30	0.60	0.81	1.05	1.51	0.00	8.57
V (%)	1 ^a	45.92	50.48	65.55	41.82	33.54	48.57	41.04	74.03	16.40
	3 ^a	57.18	75.52	83.49	65.88	61.93	60.03	58.63	95.90	16.60
	4 ^a	62.15	-----	81.54	70.64	68.22	68.78	53.93	100.00	20.37
m (%)	1 ^a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.69	0.00	47.80
	3 ^a	5.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.82	0.00	59.13
	4 ^a	0.00	-----	0.00	0.00	1.77	0.00	8.29	0.00	50.47
P mg/dm ³	1 ^a	4.83	10.72	8.06	7.31	4.67	5.17	6.33	6.87	3.23
	3 ^a	29.72	9.74	9.63	7.64	6.12	8.50	6.02	7.33	2.13

	4 ^a	19.53	-----	8.49	5.62	5.07	8.68	3.70	6.03	3.47
P-rem mg/L	1 ^a	20.76	38.20	34.75	36.29	35.32	31.17	25.68	36.23	21.27
	3 ^a	31.03	38.38	35.70	37.46	37.13	38.55	27.33	32.97	27.93
	4 ^a	30.26	-----	37.75	36.57	36.30	35.53	24.07	35.43	27.97
N-Total	1 ^a	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.04	0.03	0.01	0.22
	3 ^a	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05	0.03	0.02	0.18
	4 ^a	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M.O. (%)	1 ^a	0.36	0.12	0.23	0.23	0.37	0.88	0.64	0.30	5.94
	3 ^a	0.71	0.33	0.21	0.39	0.55	1.37	0.67	0.78	4.34
	4 ^a	0.63	-----	0.39	0.51	0.76	0.98	0.85	0.39	5.65

Tabela S2. Média dos valores de biomassa vegetal (n=12) para os diferentes talhões.

Biomassa vegetal			
Áreas	1 ^a coleta	2 ^a coleta	3 ^a coleta
B98	13.66	14.52	14.43
B36	13.64	23.92	22.30
B65	13.60	13.07	23.92
B82	9.67	16.16	6.64
M08	7.29	6.31	4.01
M03	6.39	5.94	11.43
Controle	5.16	4.07	5.23
B139	5.06	9.47	8.48

*Dados fornecidos pela empresa Golder Associates.

Tabela S3. Média dos valores das características físicas do solo (n=12) para os diferentes talhões.

Área Amostrada	1^a Coleta				2^a Coleta				3^a Coleta			
	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila
M03	94.92	375.92	356.42	172.50	92.67	447.67	328.67	131.00	97.92	391.50	357.58	153.00
B36	60.42	366.42	450.00	123.08	70.33	388.92	418.75	122.00	101.33	411.83	370.67	116.17
M08	49.08	393.42	443.50	113.92	47.50	403.00	426.17	123.33	55.75	422.92	410.17	111.17
B65	45.17	406.75	416.25	131.75	62.75	424.75	393.25	119.25	57.33	445.50	401.42	95.75
B82	58.33	431.58	371.42	138.83	74.67	387.75	402.83	134.75	85.92	454.92	343.50	115.67
B98	73.67	341.00	410.78	174.33	79.44	384.00	381.67	154.89	78.33	339.11	412.56	170.00
B139	136.58	275.92	315.00	272.50	144.67	326.50	317.17	211.67	157.00	257.83	308.92	276.25
Controle	40.00	491.67	378.33	90.33	36.67	386.67	440.67	136.00	50.33	407.00	420.33	122.33
Floresta	349.67	132.00	146.67	371.33	477.67	134.33	79.33	308.67	444.00	123.00	86.00	347.00

*Dados fornecidos pela empresa Golder Associates.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após mais de três anos do rompimento da Barragem do Fundão em Mariana-MG, as áreas afetadas pela deposição do rejeito de mineração ainda mostram diferenças marcantes quando comparadas com as áreas de florestas não afetadas pelo rejeito usadas como referência. Apesar das áreas afetadas com o rejeito de mineração apresentarem uma melhora com o tempo, elas se mostram ainda sofrendo o efeito da deposição de rejeito que afetou de forma significativa as atividades microbiológicas que foram avaliadas neste trabalho e a estrutura da comunidade bacteriana, sendo assim, o monitoramento dessas áreas continuam sendo de extrema importância até que o reestabelecimento do ecossistema seja atingido. Os indicadores microbiológicos de qualidade do solo foram mais eficientes em demonstrar mudanças nas áreas impactadas, fortalecendo a necessidade de utilizar os indicadores microbiológicos como ferramenta para avaliar a recuperação dessas áreas impactadas com o rejeito de mineração.

É necessário encontrar valores que possam ser utilizados como referência para avaliar se o ambiente está recuperando ou não, o que atualmente é um grande desafio encontrar padrões precisos que representem de fato a real situação da área. A utilização de aprendizado de máquinas para o reconhecimento de padrões entre as áreas afetadas e não afetadas pelo rejeito de mineração, permitiu a separação das duas áreas, sendo o ponto de corte o teor de matéria orgânica (3,1%) e carbono da biomassa microbiana (123 $\mu\text{g/g}$). É possível propor que esses valores sejam utilizados futuramente como índices para avaliar o grau de recuperação dessas áreas

afetadas com o rejeito de mineração nos primeiros 100 km do rompimento da barragem do Fundão.

Assim, as perspectivas futuras é aumentar os dados referentes a essas áreas para incluir no ajuste do modelo para torna-lo mais robusto e com isso direcionar ações futuras de gestão ambiental para a reabilitação dessas áreas impactadas e daquelas que possam vir no futuro.