



RAQUEL MILAGROS RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**BENEFICIAL MICROORGANISMS IN SITES UNDER
INTERFERENCE OF IRON ORE MINING AT EASTERN
AMAZON**

LAVRAS-MG

2019

RAQUEL MILAGROS RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**BENEFICIAL MICROORGANISMS IN SITES UNDER INTERFERENCE OF IRON
ORE MINING AT EASTERN AMAZON**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Doutor

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro

Orientador

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

Coorientadora

LAVRAS-MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rodríguez Rodríguez, Raquel Milagros.

Beneficial microorganisms in sites under interference of iron
ore mining at Eastern Amazon / Raquel Milagros Rodríguez
Rodríguez. - 2019.
77 p.

Orientador(a): Marco Aurélio Carbone Carneiro.

Coorientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Amazônia. 2. Micorrizas Arbusculares e Bactérias Fixadoras
de Nitrogênio. 3. Mineração de Ferro. I. Carbone Carneiro, Marco
Aurélio. II. de Souza Moreira, Fatima Maria. III. Título.

RAQUEL MILAGROS RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

**BENEFICIAL MICROORGANISMS IN SITES UNDER INTERFERENCE OF IRON
ORE MINING AT EASTERN AMAZON**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, para obtenção do título de Doutor

APROVADA em 28 de fevereiro de 2019

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira	UFLA
Prof. Dr. Teotônio Soares de Carvalho	UFLA
Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos	UNESP
Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonseca Souza Soares	UFSC

Prof. Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro
Orientador

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira
Coorientadora

LAVRAS-MG

2019

DEDICO

*A mi familia, pequeña en número pero inmensa en amor y complicidad:
madre, abuela, hermano y esposo, POR COMPARTIR MIS SUEÑOS,
POR SER MI FUERZA, SOPORTE E INSPIRACIÓN SIEMPRE!!!*

.....

*Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me ha dado la risa y me ha dado el llanto
Así yo distingo dicha de quebranto
Los dos materiales, que forman mi canto
y el canto de ustedes que es el mismo canto
y el canto de todos que es mi propio canto*

Gracias a la vida que me ha dado tanto

Violeta Parra (1917-1967)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente:

Ao Brasil que por meio do Programa de Estudante Convênio da Capes (PECPG-CAPES) possibilitou a realização do meu Doutorado no país.

Ao Prof. J.O. Siqueira por ter sido o primeiro a me abrir as portas para a realização dos meus estudos na UFLA.

Ao meu orientador Prof. M.A.C. Carneiro por aceitar me orientar, por sua confiança e contribuições na minha formação acadêmica e profissional.

À Prof. F.M.S. Moreira por sua disponibilidade e orientação no mundo pouco explorado por mim da FBN.

Ao DCS-UFLA pela excelente infraestrutura oferecida para a realização da pesquisa e aos Prof. da Pós-Graduação pelos conhecimentos transmitidos nas diferentes áreas de ciências do solo.

Às demais agências de fomento CNPq e FAPEMIG pela disponibilidade de recursos.

Ao ITV/Vale pela colaboração e disponibilidade do material de estudo utilizado.

À banca pela disponibilidade e contribuições dadas.

A todos os técnicos e servidores do DCS, que de algum modo me auxiliaram durante minha estadia, em especial a Dirce, Pezão, Livia, Roberto, Betânia e Geila.

Aos técnicos do Sector de Microbiologia Marlene, Manoel e Paulo por toda a assistência oferecida durante meu trabalho.

A Amanda Azarias pela disponibilidade e ajuda imprescindível no campo das análises moleculares.

Ao hoje Prof. Teo pela sua disponibilidade e auxílio nas minhas dúvidas estatísticas.

Ao Emerson Vilela pela sua ajuda na realização dos mapas

A Gláucia Moreira e Gabriela Meirelles por me disponibilizar materiais e auxílio em temas de biologia molecular e ecologia, respetivamente.

A Marcia Rufini por ter me disponibilizado sempre os livros da SBCS que muito me auxiliaram durante as aulas das pós-graduação.

Ao Prof. D. Janos pela sua acessibilidade e ajuda fornecida respeito as análises de glomalina.

Ao Prof. Alfredão pelo carinho e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos e anedotas.

A todos os colegas do Sector de Microbiologia, pela ajuda e convivência nas diferentes etapas da minha estadia. Agradeço especialmente a esses com que tive a sorte de compartilhar além do trabalho pesado, risadas, sinceridade, desabafo: Daniela Pedroso, Flávio Araújo, Karl Kermmelmeier, Jessé Valentim e Jordana Castro. Vocês cinco fizeram a minha caminhada mais

leve, me ajudando no meu crescimento pessoal e profissional. Fico feliz e grata de saber que o vínculo é além desta etapa que termina.

Agradeço também a essas famílias brasileiras que quase literalmente adotaram a mim e meu esposo: Juliana e família, Consu e Demétrius, Rosângela e família, Tida e família, e a Barbara-filha que no caso nos adotou como pais. OBRIGADA MESMO PELO CARINHO, AJUDA E AMIZADE SINCERA, ainda quando termos muito pouco a lhes oferecer.

Ao Instituto de Ecología y Sistemática, meu lugar de procedência, onde iniciei minha vida profissional e os estudos com Micorrizas Arbusculares, ao que devo muito da minha formação.

A meus amigos e colegas cubanos, por sempre torcerem por mim, em especial ao Chino, Ilsa, Nelis, Erick, Jacqueline, meu eterno orientador e amigo Jorge Sánchez e minha madrinha científica Maira Camino.

Agradeço muito mesmo a Osbel, pela cumplicidade, paciência e ajuda, por ser amigo, marido, técnico particular, psicólogo e ainda pior que orientador me cobrando resultados. Obrigada não só respeitar minha paixão doida pelo que faço, senão por me apoiar, incentivar e embarcar junto nas minhas aventuras.

A minha mãe "mi gordi maravillosa", por ser meu tudo, por estar sempre para mim e meu irmão, por fazer dos nossos sonhos o seu, por seu amor, cumplicidade e apoio incondicional sempre.

A minha vó, pela sua alegria imensa, por cada oração, por também me amar e me apoiar sempre.

Enfim, agradeço a Deus, à vida, ao Universo que conspiraram para que fosse neste lugar do mundo, neste instante e após esta caminhada, que eu pudesse alcançar este sonho, que longe de ser um ponto de chegada, é um novo ponto de partida para novos desafios, com a certeza que as coisas nunca saem como planejamos, senão bem melhor ainda do esperado.

RESUMO

Os microorganismos do solo e sua interação com as plantas são componentes chaves no funcionamento adequado dos ecossistemas terrestres. Especificamente, fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) e endofíticas constituem forças motrizes para o estabelecimento das plantas nos diferentes ambientes e portanto, na recuperação ambiental de ecossistemas degradados. Com a finalidade de conhecer aspectos ecológicos desses grupos microbianos em ecossistemas ferruginosos naturais e reabilitados da Amazônia oriental brasileira, o presente estudo se propôs a avaliá-los em três sítios de mineração de ferro na Serra Norte da FLONA de Carajás, no Estado de Pará. Para isso foram desenvolvidos dois trabalhos nos sítios de mineração de Arenito II, Noroeste II e Sul IV. O primeiro estudo objetivou avaliar o efeito da reabilitação sobre as comunidades de FMA e sua relação com as principais propriedades químicas e físicas do solo, selecionando-se áreas não reabilitadas, reabilitadas e nativas dentro de cada sítio. Em geral, observou-se alta densidade de esporos e diversidade de FMAs, elevadas taxas de colonização micorrízica, bem como aumento nos teores de glomalina com o avanço da reabilitação, com particularidades dentro de cada sítio. As principais propriedades do solo relacionadas com as variáveis micorrízicas foram pH, textura, matéria orgânica e CTC. Em conclusão, as ações de reabilitação empreendidas propiciaram a recuperação das comunidades micorrízicas nos três sítios estudados, processo ainda em andamento, sobretudo para Noroeste II e Sul IV com menor tempo de intervenção e mais difícil manejo, quando comparados com Arenito II. O segundo estudo propôs conhecer, isolar e caracterizar cultural e geneticamente as BFNNL e endofíticas de nódulos nas áreas nativas correspondentes dos três sítios de mineração. Para isso foram realizados experimentos de captura com *Macroptilium atropurpureum* e *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* como plantas iscas, obtendo-se nodulação apenas na primeira. A maior eficiência das comunidades bacterianas dos nódulos de *M. atropurpureum* foi observada no Arenito II, expressa pela maior nodulação, produção de biomassa e índice de suficiência de nitrogênio. No total foram obtidas 52 estirpes bacterianas (incluindo nodulíferas e endofíticas): 32 em Arenito II, 12 em Noroeste II e oito em Sul IV. O principal gênero nodulífero encontrado nas três áreas foi *Bradyrhizobium*, enquanto *Paraburkholderia* encontrou-se apenas no Arenito II. Em ambos casos se amplificou o fator de nodulação *nodD1*. Bactérias endofíticas dos gêneros *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Leifsonia* e *Methylobacterium* foram também isoladas dos nódulos. Este último gênero rizobial não amplificou o *nodD1*. No Arenito II estiveram presentes os quatro gêneros endofíticos, no Noroeste II *Leifsonia* e *Methylobacterium* e no Sul IV *Paenibacillus* e *Methylobacterium*. Finalmente, a maior diversidade e eficiência das BFNNL e bactérias endofíticas de nódulos foi observada no Arenito II. Dispõe-se também de 31 estirpes nodulíferas e 21 endofíticas para futuras investigações. Em resumo, o presente estudo aporta conhecimentos básicos acerca de microorganismos benéficos chaves em ecossistemas ferruginosos degradados, reabilitados e nativos da Amazônia oriental brasileira. Constitui um ponto de partida para novas pesquisas na região e disponibiliza estirpes bacterianas nativas para estudo e avaliação das suas potencialidades biotecnológicas.

Palavras chaves: Micorrizas arbusculares. Fixação simbiótica de nitrogênio. Bactérias endofíticas de nódulos. Mineração de ferro

ABSTRACT

Soil microorganisms and their interaction with plants are key components in the proper functioning of terrestrial ecosystems. Specifically, arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), legume-nodulating nitrogen-fixing bacteria (LNNFB) and endophytes are driving forces for the establishment of plants in different environments and, therefore, for the environmental recovery of degraded ecosystems. In order to know ecological aspects of these microbial groups in the ferruginous ecosystems of the eastern Brazilian Amazon, the present study proposed to evaluate them in three sites of iron mining in the Serra Norte of FLONA of Carajás, State of Pará. For this, two works were developed on mining sites Sandstone II, II Northwest and South IV. The first study aimed to evaluate the effect of rehabilitation on the AMF communities, and their relation with the main chemical and physical soil properties, selecting areas not rehabilitated, rehabilitated and native within each site. In general, there were high density and diversity of AMF, mycorrhizal colonization rates, as well as increased levels of glomalin with the progress of rehabilitation, with particularities within each site. The main soil properties related to mycorrhizal variables were pH, soil texture, organic matter content and CEC. In conclusion, the rehabilitation actions carried out at the iron ore sites studied provide the recovery of the AMF communities, process still in progress, especially for the Northwest II and South IV sites with less time of intervention and more difficult management, when compared with Sandstone II. The second study proposed to know, isolate and characterize cultural and genetically the LNNFB and endophytic nodule bacteria in the native areas of the three mining sites. For this, capture experiments were carried out with *Macroptilium atropurpureum* and *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* as trap plants, obtaining nodulation only in the first one. The higher efficiency of the bacterial communities of the *M. atropurpureum* nodules was observed in Sandstone II, expressed by the higher nodulation, biomass production and nitrogen sufficiency index. Fifty-two bacterial strains (including symbiotic and endophytic) were obtained: 32 in Sandstone II, 12 in Northwest II and eight in S-IV. The main noduliferous genus found in the three areas was *Bradyrhizobium*, while *Paraburkholderia* was recorded only in Sandstone II. In both cases, the *nodD1* nodulation factor was amplified. Endophytic bacteria of the genus *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Leifsonia* and *Methylobacterium* were isolated from the nodules. The four endophytic genera were found in Sandstone II, *Leifsonia* and *Methylobacterium* in Northwest II and *Paenibacillus* and *Methylobacterium* in South IV. Finally, the greater diversity and efficiency of LNNFB and endophytic nodule bacteria was observed in Sandstone II. It is also available 31 nodulating strains and 21 endophytic strains for future investigations. In summary, the present study provides basic knowledge about key beneficial microorganisms in degraded, rehabilitated and native ferruginous ecosystems of the Brazilian eastern Amazon. It is a starting point for new research in the region and provides native bacterial strains for study and evaluation of their biotechnological potentialities.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza. Symbiotic nitrogen fixation. Endophytic nodule bacteria.

Iron mining

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	14
SEGUNDA PARTE	17
2. ARTIGOS	17
2.1 ARTIGO – ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI RESPOND TO REHABILITATION ACTIONS IN IRON MINING AREAS IN THE EASTERN BRAZILIAN AMAZON	17
REFERENCES.....	42
ANEXO.....	47
2.2 ARTIGO - RHIZOBIAL AND ENDOPHYTIC NODULE BACTERIA OF RAINFORESTS OF EASTERN BRAZILIAN AMAZON	49
REFERENCIAS	69
ANEXO.....	75
TERCEIRA PARTE.....	76
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	76

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia brasileira inclui os Estados de Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, abrangendo mais do 60% da região Amazônica continental e cerca do 59% do país. Embora seu patrimônio natural seja apenas parcialmente conhecido, reconhece-se como umas das regiões mais biodiversas do mundo, com um alto grau de endemismo vegetal e animal (IBGE, 2003). Do mesmo modo, apresenta diversos ambientes geológicos com uma grande variedade de depósitos minerais, tais como ferro, manganês, alumínio, cobre, zinco, níquel, cromo, titânio, fosfato, ouro, prata, platina, paládio, ródio, estanho, tungstênio, nióbio, tântalo, zircônio, terras-raras, urânio e diamante (DOS SANTOS, 2002).

O complexo montanhoso Serra dos Carajás, localizado nos domínios da unidade geomorfológica homônima do Sudeste Paraense, é considerada a mais rica região mineral do Brasil e uma das mais expressivas do planeta. Os processos extrativos estão relacionados ao ferro, cobre, níquel, ouro, manganês, areia, pedreiras de gnaiss e ametista. Especificamente relacionado aos depósitos de ferro, a região apresenta 10,7% das reservas do minério do país, cujo teor é em torno de 64,8% (DO CARMO; KAMINO, 2015; ICMBIO, 2017). Esta província mineral está inserida quase na sua totalidade dentro dos limites da Floresta Nacional de Carajás (FLONA de Carajás), importante unidade de conservação e uso sustentável da Amazônia Oriental brasileira.

Embora a mineração constitui uma fonte de commodities (metais, indústria de minerais e combustíveis) essenciais no fornecimento de muitos bens e serviços de consumo, geração de empregos e divisas estrangeiras (NRC 2002), traz consigo consideráveis impactos ao ambiente, causando danos diretos ao solo e a vegetação (PALMER et al., 2010, HUANG et al., 2015). Isto resulta na perda da biodiversidade, e em muitos casos, a produção de condições ambientalmente adversas que dificulta a regeneração natural dos ecossistemas afetados (MANSOURIAN; VALLAURI; DUDLEY, 2005). Portanto, a reabilitação das áreas degradadas considerando o planejamento e gestão ambiental constitui um importante campo de estudo e evolução da indústria de minerais na sua transição para operações ambientalmente responsáveis (SÁNCHEZ, 2007). Neste sentido no Brasil, a reabilitação dos sistemas impactados pela mineração de ferro visando a conservação da biodiversidade e a reconstituição

das funções e serviços ecossistêmicos, são aspectos chaves e atuais de estudo, aplicação e avaliação (MATIAS et al., 2009; GIANNINI et al., 2017; GASTAUER et al., 2018).

O solo e sua biodiversidade são os principais responsáveis por sustentar os bens e serviços ligados ao bem-estar humano e a sustentabilidade nos sistemas terrestres, relacionados direta ou indiretamente às funções e processos do solo (MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005; WALL et al., 2012). Assim, os microrganismos do solo e sua relação com as plantas constituem importantes forças motrizes durante a recuperação ambiental, destacando-se as simbioses com fungos micorrízicos arbusculares e as bactérias fixadoras de nitrogênio (ZOBEL; OPIK, 2014; WILDMAN, 2015).

Os fungos micorrízicos arbusculares constituem um grupo de fungos do solo pertencentes ao Filo Glomeromycota (SHÜBLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001; TEDERSOO et al., 2018). Eles estão presente nos mais variados ambientes (STÜRMER; BEVER; MORTON, 2018) e em associação simbiótica mutualista com a maioria das plantas (BRUNDRETT, 2009). O estabelecimento da associação permite às plantas complementar a função do sistema radicular mediante a absorção de nutrientes de baixa mobilidade, tais como fósforo, zinco, ferro e cobre (JOHNSON; GEHRING; JANSA, 2017), incrementa sua tolerância ao excesso de metais pesados (HILDEBRANDT; REGVAR; BOTHE, 2007) e ao estresse hídrico (AUGÉ; TOLER; SAXTON, 2015), bem como resistência ao ataque de patógenos e herbivoria (SIKES; COTTENIE; KLIRONOMOS, 2009; KEMPEL et al., 2010). Os FMA intervêm ainda no desenvolvimento da estrutura física do solo (RILLIG, 2004; DAYNES et al., 2013), o qual relaciona-se com sua fertilidade, conteúdo de água e resistência a erosão (JOHNSON; GEHRING; JANSA, 2017).

Por sua parte, as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) encontram-se em vários filos de Bacteria e Archaea, podendo ser de vida livre, associativas ou simbióticas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MADIGAN et al., 2015). Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) formam associações simbióticas com membros de Fabaceae, sendo representantes das Subclasses α e β Proteobacteria do Filo Proteobacteria (SADOWSKY; GRAHAM; SUGAWARA, 2013; MADIGAN et al., 2015). O papel das BFNNL está relacionado fundamentalmente à nutrição nitrogenada das plantas. No entanto elas podem ser também solubilizadoras de fosfatos (MARRA et al., 2011), produtoras de fitohormônios de crescimento (ZAHIR et al. 2010), bem como de sideróforos. Esses últimos, além de auxiliar na absorção de ferro, diminui a toxicidade por Al (Rogers et al., 2001) e metais pesados (SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011; HESSE et al., 2018). BFNNL também podem

induzir resistência sistêmica contra patógenos (SISTANI et al., 2017), bem como tolerância a estresses abióticos (ZAHIR et al., 2010). Os nódulos, estruturas hipertróficas formadas principalmente nas raízes das plantas hospedeiras e especializadas fixação biológica simbiótica de nitrogênio, são também habitat de outras bactérias endofíticas, fixadoras ou não, as quais podem aportar benefícios a ambos simbiontes, bem como serem oportunistas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MEYER et al., 2015).

Associações simbióticas de FMA e BFN diferem quanto à sua especificidade e obrigatoriedade. Os FMA são biotróficos obrigatórios com baixa ou nula especificidade, enquanto as BFNNL são saprófitos no solo, cuja especificidade pode variar de altamente específicas até altamente promíscuas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Contudo, bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas e fungos micorrízicos arbusculares são grupos microbianos intimamente envolvidos no estabelecimento das plantas no solo e conseqüentemente importantes na reabilitação de ecossistemas degradados (WILDMAN, 2015).

Vários trabalhos acerca das simbioses de FMA e BFN em ecossistemas ferruginosos naturais e reabilitados do Brasil têm sido desenvolvidos, não obstante concentrados no Quadrilátero Ferrífero (TRINDADE; GRAZZIOTTI; TÓTOLA, 2000; MATIAS et al., 2009; CASTRO et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2018; SILVA, 2018). Portanto, a extensão dos mesmos aos diferentes sistemas ferruginosos do país, e em especial da Amazônia brasileira são necessários.

Diante do exposto, e com a finalidade de conhecer aspectos ecológicos acerca das comunidades de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias fixadoras de nitrogênio em ecossistemas ferruginosos amazônicos, o presente estudo se propôs avaliar ambos grupos microbianos em três sítios de mineração de ferro da Serra Norte da FLONA de Carajás no Estado de Pará. Foram desenvolvidos então dois trabalhos de investigação visando:

- i. Avaliar a ocorrência e resposta das comunidades de FMA às ações de reabilitação empreendidas em três sítios de mineração de ferro da região.
- ii. Conhecer, isolar e caracterizar as comunidades de BFNNL e endofíticas dos nódulos das áreas nativas de referências dos três sítios de mineração em estudo

REFERÊNCIAS

- AUGÉ, R. M.; TOLER, H. D.; SAXTON, A. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. **Mycorrhiza**. v. 25, p. 13-24, 2015.
- BRUNDRETT, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant Soil**. v. 320, p. 37-77, 2009.
- CASTRO, J.L.; SOUZA, M. G.; RUFINI, M.; GUIMARÃES, A.A.; RODRIGUES, T. L.; MOREIRA, F.M.S. Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. **R. Bras. Ci. Solo**. v. 41, 2017.
- DAYNES, C. N. et al. Development and stabilisation of soil structure via interactions between organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 57, p. 683-694, 2013
- DO CARMO, F.F.; KAMINO, L.H.Y. (Ed.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais**. Belo Horizonte: 3i Editora, 2015.
- DOS SANTOS, B. A. Recursos minerais da Amazônia. **Estudos Avançados** v. 16, no.45, p. 123-152, 2002.
- GASTAUER, M. et al. Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1409-1422, 2018.
- GIANNINI, T. et al. Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. **Austral Ecology**, v. 42, p. 510-521, 2017.
- GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 6726–6733, 2012.
- HESSE, E.; et al. Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. **Ecology Letters**, v. 21, p. 117-127, 2018.
- HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; & BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**. v. 68, p. 139-146, 2007.
- HUANG, Y. et al. Effect of coal mining on vegetation disturbance and associated carbon loss. **Environ Earth Sci** v.73, p. 2329-2342, 2015.
- IBGE. 2003. Geoestatísticas de Recursos Naturais da Amazônia Legal RJ, Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- ICMBIO. 2017. Plano de Pesquisa Geossistemas Ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás. Brasília.
- KEMPEL, A.; SCHMIDT, A. K.; BRANDL, R.; SCHÄDLER, M. Support from the underground: Induced plant resistance depends on arbuscular mycorrhizal fungi. **Functional Ecology**. v. 24, p. 293-300, 2010.

MADIGAN, M.T. et al. (eds). **Brock Biology of Microorganisms**. 14th ed. Pearson Education, Inc, 2015.

MANSOURIAN, S.; VALLAURI, D.; DUDLEY, N. (eds). **Forest Restoration in Landscapes: Beyond Planting Trees**. New York: Springer, 2005.

MARRA, L.M; OLIVEIRA, S.M; SOARES, C.R.F.S.; MOREIRA, F.M.S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)** v. 68, p. 603-609, 2001

MATIAS, S. R et al. Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 259-266, 2009.

MEYER, S. E. D.; BEUF, K. D.; VEKEMAN, B.; WILLEMS, A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). **Soil Biology & Biochemistry**. v. 83, p.1-11, 2015.

Millennium Ecosystem Assessment. **Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis**. Washington DC: World Resources Institute, 2005.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. (eds) **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2da ed. Lavas, MG: UFLA, 2006.

NRC. **Evolutionary and Revolutionary Technologies for Mining**. Washington, DC: The National Academies Press. National Research Council, 2002.

PALMER, M.A et al. Mountaintop Mining Consequences. *Science* v. 327, p. 148-149, 2010.

RILLIG MC. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Can J Soil Sci**. v. 84, p. 355-363, 2004.

ROGERS, N. J. et al. Alleviation of Aluminum Toxicity to Rhizobium Leguminosarum Bv. Viciae by the Hydroxamate Siderophore Vicibactin. **BioMetals** v. 14, p. 59-66, 2001.

SADOWSKY, M.J; GRAHAM, P.H.; SUGAWARA, M. Root and Stem Nodule Bacteria of Legumes. In: Rosenberg, E. et al (eds). **The Prokaryotes-Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations**. Springer, 2013. p 401-425.

SÁNCHEZ, L. E. Mineração e meio ambiente. In **Tendências tecnológicas Brasil 2015: geociências e tecnologia mineral**, 196-213 Rio de Janeiro: CETEM/MCT <http://mineralis.cetem.gov.br/handle/cetem/1290>, 2007.

SCHALK, I. J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 2844-2854, 2011.

SHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and distribution. **Mycological Research**. v. 105, p. 1413-1425, 2001.

SIKES, B. A.; COTTENIE, K.; KLIRONOMOS, J. N. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. **Journal of Ecology**. v. 97, p. 1274-1280, 2009.

SILVA, A.O. Soil quality indicators showed recovery of an iron mining area compared to adjacent phytophysiognomies. 2018 (Doutorado em Ciências do Solo) - Departamento de Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SISTANI, N. R. et al. Rhizobium Impacts on Seed Productivity, Quality, and Protection of Pisum Sativum Upon Disease Stress Caused by Didymella Pinodes: Phenotypic, Proteomic, and Metabolomic Traits. *Frontiers in Plant Science* 8, 2017.

STÜRMER, S. L.; BEVER, J. D.; & MORTON, J. B. Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): a phylogenetic perspective on species distribution patterns. **Mycorrhiza**. v. 28, p. 587-603.

TEDERSOO, L. et al. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Diversity**. v. 90, p. 135-159, 2018.

TEIXEIRA, A.F.S.; KEMMELMEIER, K.; MARASCALCHI, M. N.; STÜRMER, S. L.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S. 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, p. 511-525, 2017.

TRINDADE, A. V.; GRAZZIOTTI, P. H.; & TÓTOLA, M. R. Utilização de características microbiológicas na avaliação da degradação ou recuperação de uma área sob mineração de Ferro. **R. Bras. Ci. Solo**. v. 24, p. 683-68, 2000.

VIEIRA, C.K.; MARASCALCHI, M.N.; RODRIGUES, A.V.; ARMAS, R.D.; STÜRMER, S.L. Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. **Journal of Environmental Sciences**. v. 67. p. 330-34, 2018.

Wall, D. H. et al. (eds). **Soil Ecology and Ecosystem Services**. Oxford University Press, 2012.

WILDMAN, H. Improving Mine Rehabilitation Success Through Microbial Management. **Journal of Environmental Solutions for Oil, Gas, and Mining**. v.1, p. 32-46, 2015.

ZAHIR, Z. A. et al. Substrate-Dependent Auxin Production by Rhizobium Phaseoli Improves the Growth and Yield of Vigna Radiata L. Under Salt Stress Conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* v. 20, p. 1288-94, 2010.

ZOBEL, M.; OPIK, M. Plant and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities – which drives which? **Journal of Vegetation Science**. 2014.

SEGUNDA PARTE

2. ARTIGOS

2.1 ARTIGO – ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI RESPOND TO REHABILITATION ACTIONS IN IRON MINING AREAS IN THE EASTERN BRAZILIAN AMAZON

Raquel Milagros Rodríguez-Rodríguez¹, Karl Kemmelmeier¹, Daniela de Fátima Pedroso¹, Flávio Araújo Pinto¹, Jessé Valentim dos Santos², Markus Gastauer³, Cecílio Fróis Caldeira Junior³, Silvio Junior Ramos³, Jose Oswaldo Siqueira^{1,3}, Marco Aurélio Carbone Carneiro¹

¹ Departamento de Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais - Campus Bambuí, Bambuí - MG

³ Instituto Tecnológico Vale, Belém, PA, Brasil

Artigo formatado conforme as normas da Revista *Land Degradation & Development*

RESUMO:

A reabilitação e manejo de áreas mineradas é um tema de grande importância e atualidade, onde a resposta das comunidades microbianas e em especial dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) aos processos de reabilitação constitui uma importante ferramenta de avaliação. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da reabilitação sobre as comunidades de FMAs, e relação com as principais propriedades químicas e físicas do solo, em três sítios de mineração de ferro da Serra Norte de Carajás no Estado do Pará, Brasil. Para isso, áreas não reabilitadas, reabilitadas e nativas dentro de cada sítio, foram avaliadas quanto a densidade e diversidade de esporos, colonização micorrízica, glomalina facilmente extraível (GFE) e glomalina total extraível (GTE). Em geral, foi observada uma alta densidade de esporos e diversidade de FMAs, elevada colonização micorrízica, bem como o aumento nos teores de glomalina com o avanço da reabilitação, com particularidades dentro de cada sítio. A relação GFE/GTE mostrou-se como um interessante parâmetro, de fácil interpretação e comparação da resposta dos FMAs à reabilitação, indicando o equilíbrio ou não dos ambientes reabilitados, independente dos valores absolutos das variáveis. As principais propriedades do solo relacionadas com as variáveis micorrízicas foram pH, textura do solo, teor de matéria orgânica e CTC. Em conclusão, as ações de reabilitação empreendidas nos sítios de mineração de ferro estudados da Serra Norte de Carajás na Amazônia brasileira propiciaram a recuperação das comunidades de FMA, processo ainda em andamento, sobretudo para os sítios Noroeste II e Sul IV com menor tempo de intervenção e mais difícil manejo, quando comparados com Arenito II.

PALAVRAS CHAVEIS: Colonização micorrízica, densidade de esporos, glomalina, relação EEG/ETG, diversidade de fungos micorrízicos arbusculares

ABSTRACT:

The rehabilitation and management of mining areas is a relevant and current topic, where the response of microbial communities and especially arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to the rehabilitation processes, is an important evaluation tool. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of the rehabilitation on the AMF communities, and their relation with the main chemical and physical soil properties, in three iron ore sites of the Serra Norte de Carajás-PA in the Brazilian Amazon. For that, unrehabilitated, rehabilitated and native areas within each site were evaluated for spore density and diversity, mycorrhizal colonization, easily extractable glomalin (EEG), and extractable total glomalin (ETG). In general, high density and diversity of AMF and mycorrhizal colonization were observed, as well as the increase in glomalin levels with the progress of rehabilitation, with particularities within each site. In general, high density and diversity of AMF and mycorrhizal colonization were observed, as well as the increase in glomalin concentrations with the progress of rehabilitation. The EEG / ETG ratio was an interesting parameter, easy to interpret and compare the response of the AMF to the rehabilitation, indicating the balance or not of the rehabilitated environments, independent of the absolute values of the variables. The main soil properties related to mycorrhizal variables were pH, soil texture, organic matter content and CEC. In conclusion, the rehabilitation actions carried out at the iron ore sites studied provide the recovery of the AMF communities, process still in progress, especially for the Northwest II and South IV sites with less time of intervention and more difficult management, when compared with Sandstone II.

KEYWORDS: mycorrhizal colonization; spore density; glomalin; ratio EEG/ETG; arbuscular mycorrhizal diversity

INTRODUCTION

Brazil has a huge mineral wealth, ranking among the largest producers and exporters of ore in the world, where iron leads, with 60% of its production (Sánchez, 2007; Carmo & Kamino, 2015). Among its main ferruginous systems stands out the Serra dos Carajás mountain complex, located in the domains of the geomorphological unit of the same name in the Southeast of Pará, considered the richest mineral region in Brazil and one of the most expressive on the planet (Carmo & Kamino, 2015; ICMBIO, 2017). This mineral province is almost entirely within the limits of the Carajás National Forest (FLONA de Carajás), an important conservation and sustainable use unit of the Brazilian Amazon. Therefore, it is necessary to reconcile the conservation of biodiversity and economic exploitation, both of strategic importance for the Brazilian State (ICMBIO, 2017).

The rehabilitation of degraded areas considering environmental planning and management is a field of rapid evolution of the minerals industry in its transition to environmentally responsible operations (Sánchez, 2007). In this sense, the rehabilitation of the systems impacted by iron mining aiming at the conservation of biodiversity and the reconstitution of ecosystem functions and services are key and current aspects of study, application and evaluation in Brazil (Matias et al., 2009; Giannini et al., 2017; Gastauer et al., 2018).

The soil and its biodiversity are mainly responsible for sustaining goods and services related to human well-being and sustainability in terrestrial systems, related directly or indirectly to soil functions and processes (Millennium Ecosystem Assessment 2005; Wall et al., 2012). Thus, soil microorganisms and their relationship with plants are important driving forces in the environmental recovery process (Zobel & Opik, 2014; Wildman, 2015).

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), Phylum Glomeromycota (Shüßler et al., 2001; Tedersoo et al., 2018), are an important component of the soil microbiota. They are present in the most diverse environments (Stürmer et al., 2018) and in symbiotic mutualist association with most plants (Brundrett, 2009). The association establishment allows plants to supplement nutrient uptake, such as phosphorus and cationic micronutrients (Johnson et al., 2017), increases their tolerance to excess of heavy metal (Hildebrandt et al., 2007) and water stress (Augé et al., 2015), as well as resistance to pathogen attack and herbivory (Sikes et al., 2009; Kempel et al., 2010). The AMF are also involved in the development of soil physical structure (Rillig, 2004; Daynes et al., 2013), related to their fertility, water content and reduction of erosion (Johnson

et al., 2017). In summary, the AMF are a determining factor in soil quality, through its effect on plant community ecology and ecosystem processes (Rillig, 2004).

The role of AMF in the rehabilitation of degraded areas has been previously pointed out, with emphasis on their aid in colonization and establishment of plants in new environments (Maltz & Treseder, 2015; Cortese & Bunn, 2017), as well as their contribution to the accumulation and stabilization of soil carbon (Kumar et al., 2018). In Brazil, several works on the AMF in iron mining areas have been carried out, mainly concentrated in the Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. The analysis of the AMF community (Teixeira et al., 2000; Teixeira et al., 2017; Viera et al., 2018), soil inoculum potential (Teixeira et al., 2017; Viera et al., 2018), the response of plants to mycorrhizal inoculation in tailings mining and its establishment in the field (Matias et al., 2009) have been the main topics discussed.

Studies about arbuscular mycorrhiza in Brazilian Amazon ferruginous systems have not been previously reported. However, rehabilitation of mine lands has been developed with positive results in vegetation recovery (Giannini et al., 2017; Gastauer et al., 2018). Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of rehabilitation on the AMF communities, and their relation with the main chemical and physical properties of the soil, in three iron ore sites of the Serra Norte de Carajás in the State of Pará.

MATERIAL AND METHODS

Characterization of the study site

The present study was developed at three Iron ore sites (Sandstone II, Northwest II and South IV) of the Carajás Mineral Complex in the Serra Norte region of FLONA de Carajás, Parauapebas municipality, State of Pará (Figure 1). The climate of the region is tropical type Aw according to the classification of Köppen-Geinger, with average temperature of 26.2°C and accumulated rainfall of up to 1900 mm year⁻¹.

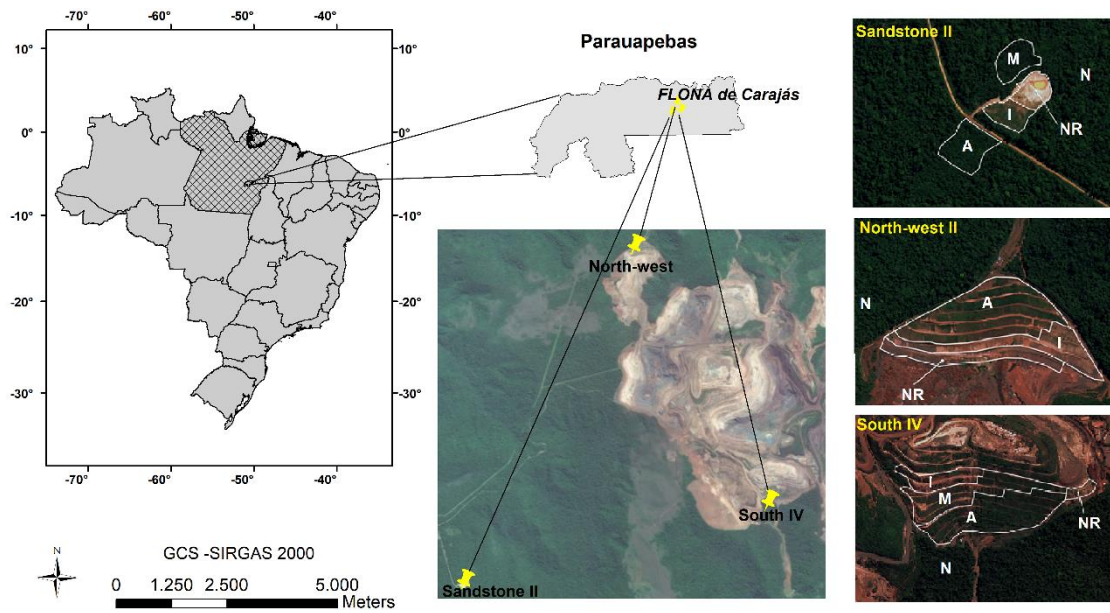


Figure 1. Mining Sites Sandstone II, II Northwest and South IV, and their respective sampled areas: non-rehabilitated area (NR), in initial rehabilitation stage (I), in intermediate rehabilitation stage (M), in advanced rehabilitation stage (A) and native reference area (N), located in the Northern Sierra of Carajás FLONA, Parauapebas municipality, State of Pará, Brazil.

At each mining site, areas were selected at different stages of rehabilitation (initial, intermediate and advanced, when present), as well as an unrehabilitated area and a native reference area. The classification of the stages was carried out considering the time of intervention and the management within each site.

The mined areas of Sandstone II were pits filled with granite barren, coming from a nearby mine and later covered by a topsoil layer of vegetation suppression areas. For their revegetation, seedlings of native species were planted and commercial and native seed cocktail was applied. Meanwhile, the sterile piles of the Northwest II and South IV sites are active sterile deposits filled with heterogeneous material from several mine sites of the Carajás Mineral Complex. The main characteristics of the different areas under study are summarized in Table 1.

Table 1. Identification and characterization of the study areas of the three iron mining sites of the Carajás Mineral Complex.

SITE	AREA	ESTAGE	INTERVENTION YEAR	SIZE (ha)	CHARACTERIZATION
Sandstone II	ST-NR	Non-rehabilitated	-	0.9	Only deposition of topsoil
	ST-I	Initial	2013	1.45	Deposition of topsoil Seeding of native species (cocktail). Subsequent enrichment with seedlings with cover fertilization Open Vegetation with Small Trees and Shrubs
	ST-M	Intermediate	2006	0.80	Deposition of topsoil Seeding of native species (cocktail). Subsequent enrichment with seedlings with cover fertilization Arboreal and shrub vegetation, with continuous canopy
	ST-A	Advanced	2004	3.12	Deposition of topsoil Seeding of native species (cocktail). Later enrichment with seedlings with fertilization of toppings Shrub and tree vegetation with a very closed canopy
	ST-N	Native	-	-	Rain Forest
North-west II	NW-NR	Non-rehabilitated	-	1.03	Exposed soil
	NW-I	Initial	2013/14	1.66	Liming and fertilization Seeding of commercial and native species Predominantly herbaceous vegetation
	NW-A	Advanced	2011	0.65	Seeding of commercial and native species Arboreal vegetation with canopy closed
	NW-N	Native	-	-	Rain Forest
South IV	S-NR	Non-rehabilitated	-	0.48	Exposed soil
	S-I	Initial	2016	0.32	Liming and fertilization Seeding of commercial and native species Vegetation predominantly herbaceous, with few shrubs
	S-M	Intermediate	2012	6.63	Liming and fertilization Seeding of commercial and native species Shrub vegetation with canopy still open
	S-A	Advanced	2008/09	9.45	Liming and Fertilizing Seeding of commercial and native species Shrub and tree vegetation with relatively closed canopy
	S-N	Native	-	-	Rain Forest

Chemical and physical soil sampling and analysis

The samplings were carried out in October 2016 (dry season). Soil samples were collected in the superficial layer (0-20 cm) in the selected areas (three plots per area) comprising 42 composite samples for the three mining sites under study. To form each composite sample, five sampling points were randomly distributed within plots of 10 x 20 m. The distance between the plots was at least 30 m. Part of the soil was air dried and sieved in a 2 mm mesh for its chemical and physical characterization, and another separated and stored at 4 °C for mycorrhizal evaluations.

The chemical and physical characterization of the soil (Table 2) was performed according to the methods described and standardized by EMBRAPA (2017), and included pH in H₂O (1: 2.5 v/v), P, K and Fe available (Mehlich 1 extractor), available Ca²⁺, Mg²⁺ and Al³⁺ (KCl 1 mol L⁻¹ extractor), H + Al (SMP extractor), organic carbon (Walkley-Black method) and granulometry (Bouyoucos method).

Table 2. Chemical and physical properties of the areas in the rehabilitation stage: Initial (I), Intermediate (M) and Advanced (A), and unrehabilitated (NR) and Native (N) areas, of the three mining sites studied.

SITE	AREA	pH _{H2O}	SOM ^a g Kg ⁻¹	Pmg dm ³	K	Ca	Mg	V ^b %	CEC ^c cmol _c dm ³	Znmg dm ³	Fe	Mn	Cu	Sand %	Silt %	Clay %
Sandstone	ST-NR	5.17	2.66	4.90	140.40	1.50	0.20	60.28	3.46	0.63	114.03	35.07	13.93	70.90	12.77	16.33
II	ST-I	5.00	34.33	2.43	95.33	1.13	0.33	24.60	7.01	0.73	226.70	78.17	0.73	55.93	9.07	35.00
	ST-M	4.80	32.00	9.53	62.20	1.30	0.37	20.85	8.43	2.50	101.37	35.10	0.70	68.80	5.20	26.00
	ST-A	4.97	29.67	1.90	49.37	0.67	0.17	14.56	6.63	0.50	207.77	14.53	0.33	75.80	2.53	21.67
	ST-N	4.47	40.00	1.83	67.40	1.87	0.40	22.04	10.81	0.73	198.87	33.43	0.23	32.77	12.23	55.00
North-west	NW-NR	5.20	2.00	1.60	10.80	0.40	0.33	39.27	1.79	1.73	49.37	38.27	3.87	43.73	49.60	7.00
II	NW-I	5.33	10.67	3.93	41.57	0.43	0.20	24.76	3.01	0.97	54.37	134.57	0.77	33.63	32.70	33.67
	NW-A	5.30	12.00	3.63	36.93	1.17	0.40	46.08	3.43	1.33	50.43	126.93	0.80	39.57	28.10	32.33
	NW-N	4.17	45.33	2.07	90.73	0.67	0.30	10.60	12.37	1.07	191.10	77.00	2.23	20.90	18.10	61.00
South	S-NR	5.67	< 2	4.00	17.97	1.00	0.70	63.78	2.78	3.03	46.97	32.53	0.93	25.60	60.73	13.67
IV	S-I	5.87	< 2	2.90	81.10	2.80	6.70	89.44	10.61	21.27	50.03	51.00	2.80	31.30	63.70	5.33
	S-M	6.00	8.67	4.27	58.33	1.10	0.97	57.55	3.78	2.10	54.00	119.73	1.63	37.37	30.97	31.67
	S-A	6.23	41.67	8.60	117.80	5.57	1.57	75.56	9.40	4.90	10.10	131.43	0.97	51.03	25.97	23.00
	S-N	4.30	43.33	2.37	76.63	1.50	0.53	23.26	9.53	2.13	169.23	107.87	3.20	11.70	23.97	64.33

a- SOM = Soil organic matter, b- V = Base saturation c-CEC = Potential cation exchange capacity

Mycorrhizal Variables

All samples were evaluated for density (SD) and diversity of AMF spores, mycorrhizal colonization (MC), easily extractable glomalin (EEG) and extractable total glomalin (ETG).

The density and diversity of spores was determined from 10 g of soil. Spore extraction was carried out by the wet sieving and decanting technique of Gerdemann & Nicolson (1963), followed by the water-sucrose gradient centrifugation (Jenkins, 1964). Then intact spores were counted and separated by morphotypes under stereomicroscope and mounted on slides with PVLG (polyvinyl alcohol-lactoglycerol) and PVGL / Melzer 1: 1 (v / v) for their morphological identification. The identification of the morphotypes was performed under a light microscope following the classification system of Redecker et al., (2013) with additions of genera accepted by Wijayawardene et al., (2018) and by comparison with the original species descriptions and the online reference collections of INVAM of West Virginia University, USA (<http://invam.caf.wvu.edu>) and the Department of Plant Pathology, University of Agriculture, Szczecin, Poland (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota>). We also determinate the species richness, expressed as the total number of species per area.

For the quantification of MC, roots smaller than 2 mm in diameter were separated from the soil, which were washed and cut into segments approximately 1 cm in length. These were cleared and stained with Trypan Blue (0:05%) according to the method of Hayman & Phillips (1970) modified by Herrera-Peraza et al., (2004). The mycorrhizal colonization rate was quantified by the method of intersections of Giovannetti & Mosse (1980).

The easily extractable glomalin (EEG) and extractable total glomalin (ETG) contents were determined from 0.5 g dry soil. The solvent/soil ratio 16: 1 (v / w) was used for the extraction of the glomalin fractions, according to the results of Janos et al., (2008) and previous tests (data not shown), remaining the other conditions for extracting and separating the glomalin fractions from Wright & Upadhyaya (1996; 1998). The quantification of both glomalin fractions was performed by the Bradford assay (Bradford, 1976), using the same matrix for pattern and samples. That is, the patterns of EEG and ETG were constructed using bovine serum albumin (0-500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in 20 mM sodium citrate adjusted to pH 7 and 50 mM sodium citrate adjusted to pH 8, respectively. All determinations were performed per duplicate and from the absorbance measurement in a spectrophotometer at 595 nm. The results were convert to mg g^{-1} soil.

Data analysis

Prior to statistical analysis, the normality and homoscedasticity of the data was verified by the Shapiro-Will and Levene tests, respectively. For the variables spore density at the three mining sites and the total glomalin at the sites Sandstone II and South IV, it was necessary the logarithmic transformation to fit the assumption of ANOVA. Subsequently these and mycorrhizal colonization were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test was applied to identify the differences, when detected. However, for both glomalin fractions at the Southern site IV, although with normal distribution, it was not possible to reach the homogeneity of variance, then the Welch test for unequal variances was performed, followed also by the Tukey test. From the identified AMF, a presence-absence matrix was generated. This was used to calculate the β Whitaker diversity (Whittaker, 1960) using the formula: $\beta_w = S/\alpha - 1$, where S is the regional diversity, in our case the total species at each site (Sandstone II, North-west II e South IV) and α the mean alpha diversity, here defined as the number of species per area (NR, I, M, A e N). To compare the degree of similarity between the areas of each site, the measure re-expressed of β_w : $\frac{a+b+c}{(2a+b+c)/2} - 1$ was used according to Koleff et al., (2003), where the a component corresponds to the total number of species shared between both areas, and b and c to the total number of species unique to each area. The values obtained vary between zero (maximum similarity) and one (maximum dissimilarity).

It was also carried out the two-dimensional ordination of the different areas under study, considering the mycorrhizal variables (spore density, species richness, mycorrhizal colonization and glomalin fractions), and these together with the chemical and physical variables of the soil by Non-metric multidimensional scaling (NMDS) using the Gower similarity index. To explore the relationship between the arrangement of the areas (due to mycorrhizal variables) and the chemical and physical properties of the soil, these were adjusted as vectors from the origin. They are not included in the ordination and the correlation coefficients (vectors) are arbitrarily scaled to make the biplot readable, considering only their relative directions and lengths. The correlations between variables were subsequently measured by Spearman correlation. It was also done the ordination of the areas considering all variables, and the groups formed were compared by PERMANOVA using the Gower similarity index with 9999 interactions. Differences were identified by multiple comparison using the Bonferroni p correction to control the type-I error. All analyzes were performed using statistical software PAST version 3.21beta (Hammer et al., 2001).

RESULTS

Density and diversity of AMF spores

The rehabilitation processes stimulated the density of AMF spores, evidently depressed by mining. Significant differences were found between unrehabilitated and rehabilitated and native areas (Sandstone II: $F_{4,10} = 59.15$, $p = 6.36 \cdot 10^{-7}$, Northwest II: $F_{3,8} = 32.9$, $p = 7.54 \cdot 10^{-5}$, South IV: $F_{4,10} = 10.45$, $p = 0.0013$, Figure 2a), where the highest number of spores was always observed in the areas under rehabilitation, which were still stressed, compared to the reference areas (climax). In Sandstone II, the spore number varied between 5.3 and 74.0 g^{-1} of soil, differentiating also the intermediate and advanced stages of rehabilitation of the initial stage and native area. In Northwest II, the spore density varied between 2.5 and 121.7 spore g^{-1} of soil and in the South IV between 3.5 and 70.3 spore g^{-1} of soil, standing out in the latter the similarity between the areas not rehabilitated and in the initial stage of rehabilitation.

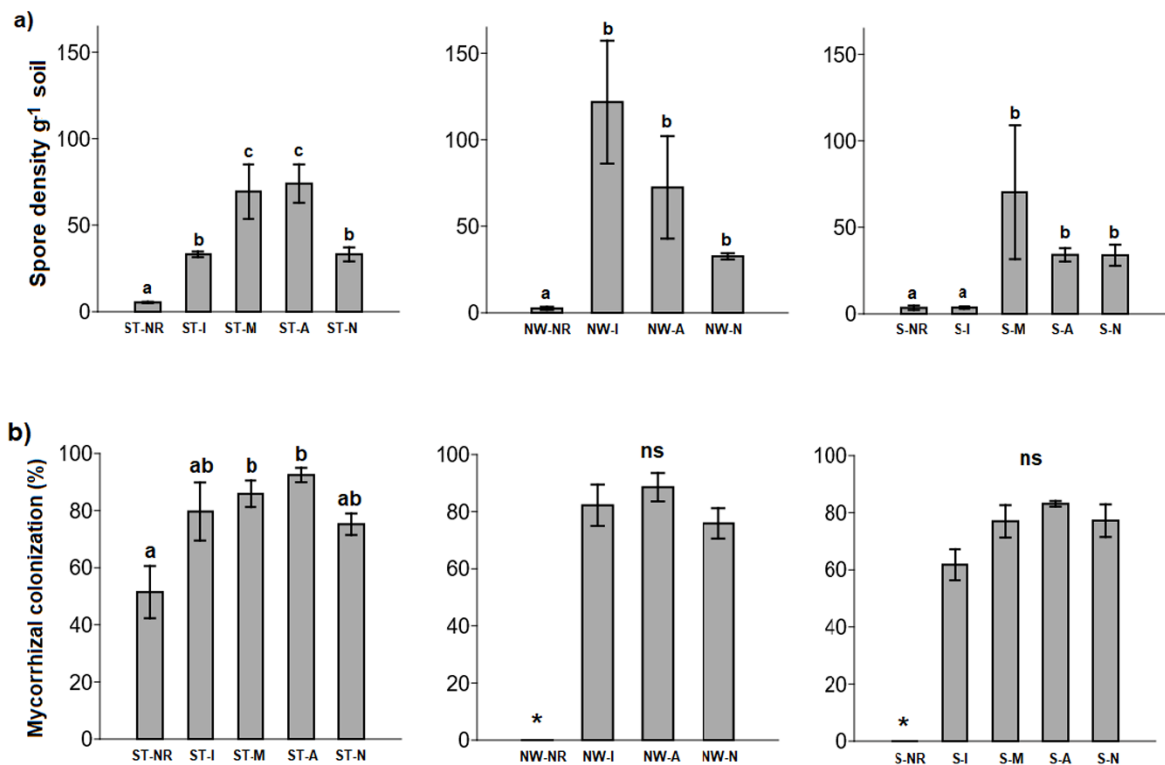


Figure 2. Mean values \pm standard error of spore density (a) and mycorrhizal colonization (b) of the areas in the rehabilitation stage: Initial (I), Intermediate (M) and Advanced (A), and unrehabilitated (NR) and Native (N) areas, of the mining sites Sandstone II (ST), Northwest II (NW) and South IV (S). Means with different letters represent significant differences at $p < 0.05$ for the Tukey test, ns - non-significant differences, * - not evaluated.

A total of 66 AMF morphotypes distributed in 20 genera belonging to nine families, plus the incertae-sedis: *Entrophospora infrequens* were recovered (Table 3). The total richness per site was 43, 48 and 40 species for Sandstone II, Northwest II and South IV, respectively, being Glomeraceae the family with the largest number of species, followed by Acaulosporaceae and Gigasporaceae. The native areas of the three sites had similar values of specific richness, sharing more than 50% of the species. In the Sandstone II, 16 species had high FO ($\geq 60\%$), while in the Northwest II and Southern IV there were only eight and six species, respectively. The species *Acaulospora mellea*, *Glomus* sp.1, *Rhizophagus clarus* and *Oehlia diaphana* were the most common species shared at the three mining sites.

<i>Diversispora</i> sp.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Gigasporaceae															
<i>Cetraspora pellucida</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) Oehl, F.A. Souza & Sieverd	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>Dentiscutata biornata</i> (Spain, Sieverd. & S. Toro) Sieverd.	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dentiscutata cerradensis</i> (Spain & J. Miranda) Sieverd., F.A. Souza & Oehl	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dentiscutata savannicola</i> (R.A. Herrera & Ferrer) C. Walker & A. Schüßler	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fuscutata aurea</i> Oehl, C.M. Mello & G.A. Silva	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gigaspora albida</i> N.C. Schenck & G.S	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gigaspora</i> cf. <i>gigantea</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gigaspora margarita</i> W.N. Becker & I.R. Hall	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Racocetra fulgida</i> (Koske & C. Walker) Oehl, F.A. Souza & Sieverd.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Scutellospora</i> cf. <i>arenicola</i> Koske & Halvorson	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scutellospora dipurpurescens</i> J.B. Morton & Koske	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Scutellospora</i> sp.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glomeraceae															
<i>Dominikia minuta</i> (Błaszk., Tadych & Madej) Błaszk.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Funneliformis</i> cf. <i>badium</i> (Oehl, D. Redecker & Sieverd.) C. Walker & A. Schüßler	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Glomus</i> cf. <i>ambisporum</i> G.S. Sm. & N.C. Schenck	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Glomus glomerulatum</i> Sieverd.	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Glomus microaggregatum</i> Koske, Gemma & P.D. Olexia	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Glomus spinuliferum</i> Sieverd. & Oehl	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Glomus</i> sp.2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Glomus</i> sp.3	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>Glomus</i> sp.4	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp.5	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Glomus</i> sp.6	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glomus</i> sp.7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Oehlia diaphana</i> (J.B.Morton & C.Walker) Błaszk., Kozłowska & Dalpé	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Rhizophagus clarus</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>Rhizophagus fasciculatus</i> (Thaxt.) C. Walker & A. Schüßler	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Rhizophagus intraradices</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Rhizophagus</i> cf. <i>proliferus</i> (Dalpé & Declerck) C. Walker & A. Schüßler	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

<i>Rhizophagus</i> sp.1	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizophagus</i> sp.2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Sclerocystis coremioides</i> Berk. & Broome	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>Sclerocystis rubiformis</i> Gerd. & Trappe	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>Sclerocystis sinuosa</i> Gerd. & B.K. Bakshi	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>Sclerocystis taiwanensis</i> C.G. Wu & Z.C. Chen	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Sclerocystis</i> sp.1	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Septoglomus cf. constrictum</i> (Trappe) Sieverd., G.A. Silva & Oehl.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Pacisporaceae														
<i>Pacispora cf. franciscana</i> Sieverd. & Oehl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Paraglomeraceae														
<i>Paraglomus</i> sp.1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Incertae-sedis</i>														
<i>Entrophospora infrequens</i> (I.R. Hall) R.N. Ames & R.W. Schneid.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
SPECIES RICHNESS	13	20	23	23	16	11	18	33	17	3	6	19	$\frac{1}{9}$	17

Areas non-rehabilitated (NR), areas rehabilitated in initial (I), intermediate (M) and advanced (A) stages and reference native areas (N)

The analysis of the β diversity showed similarity between the Sandstone II and Northwest II sites, smaller than the South IV site (Sandstone II $\beta W = 1.2917$, Northwest II $\beta W = 1.4304$, South IV $\beta W = 2.125$). Within each site, the degree of dissimilarity between the different areas was variable (Table 4). The smaller dissimilarity between the different stages of rehabilitation was observed for Sandstone II. In the Northwest II all the stages differed from each other and with the native reference areas by more than 50%, which was also observed in Southern IV with the exception of intermediate and advanced stages.

Table 4. Pairwise comparison of the degree of similarity between the areas of each mining site. Areas in the rehabilitation stage: Initial (I), Intermediate (M) and Advanced (A), unrehabilitated (NR) and Native (N) areas.

	<u>SANDSTONE II</u>				<u>NORTH-WEST II</u>			<u>SOUTH IV</u>				
	NR	I	M	A	NR	I	A	NR	I	M	A	
I	0.45				I	0.66			I	0.78		
M	0.72	0.44			A	0.64	0.53		M	0.82	0.68	
A	0.67	0.44	0.39		N	0.71	0.71	0.64	A	0.91	0.68	0.47
N	0.73	0.62	0.55	0.40	-----			N	0.80	0.83	0.72	0.67

0 = maximum similarity; 1 = maximum dissimilarity

Mycorrhizal Colonization

High rates of mycorrhizal colonization ($MC > 50\%$) were observed in all areas evaluated, except for the unrehabilitated areas (exposed soil) of the Northwest II and South IV sites that had no roots (Figure 2b). In Sandstone II, MC varied between 51.4 and 94.4%, with significant differences between areas ($F_{4,10} = 5.36$, $p = 0.014$). In Northwest II and South IV MC varied between 75.9 and 88.5% and between 61.8 and 83.1%, respectively, and no significant differences between native and rehabilitated areas were detected (Northwest II: $F_{2,6} = 1,146$, $p = 0.379$, South IV: $F_{3,8} = 3.481$, $p = 0.07031$).

Soil glomalin

The soil glomalin contents varied within each mining site (Table 5). The easily extractable fraction (EEG) varied between 0.29 and 2.94 mg g⁻¹ of soil in Sandstone II ($F_{4,10} = 12.01$, $p = 0.00078$), between 0.40 and 3.50 mg g⁻¹ of soil in Northwest II ($F_{3,8} = 30.96$, $p = 9.42 \times 10^{-5}$) and between 0.24 and 2.41 mg g⁻¹ of soil in Southern IV ($F_{4,10} = 10.74$, $p = 0.02046$). On the other hand, ETG ranged between 2.04 and 10.97 mg g⁻¹ of soil in Sandstone II ($F_{4,10} = 11.8$, $p = 0.0008357$), between 0.64 and 15.39 mg g⁻¹ of soil in Northwest II ($F_{3,8} = 24.07$, $p =$

0.0002334) and between 0.38 and 16.47 mg g⁻¹ of soil in Southern IV ($F_{4,10} = 72.23$, $p = 2.44 \cdot 10^{-7}$). In general, there was an increase in the levels of glomalin in the direction unrehabilitated - rehabilitated - native area, with ETG distinguishing the best between the environments.

Table 5. Mean \pm standard error (SE) of easily extractable glomalin (EEG) and extractable total glomalin (ETG) of the areas in the rehabilitation stage: Initial (I), Intermediate (M) and Advanced (A), and unrehabilitated (NR) and Native (N) areas of the mining sites Sandstone II (ST), Northwest II (NW) and South IV (S). EEG/ETG ratio.

SITE	AREA	EEG \pm SE mg g ⁻¹		ETG \pm SE mg g ⁻¹		EE/ETG (%)
Sandstone II	ST-NR	0.29 \pm 0.05	a	2.04 \pm 0.06	a	14.37
	ST-I	1.92 \pm 0.20	b	3.71 \pm 1.02	ab	51.65
	ST-M	2.08 \pm 0.28	b	9.28 \pm 1.12	c	22.38
	ST-A	1.91 \pm 0.19	b	7.51 \pm 1.36	bc	25.37
	ST-N	2.94 \pm 0.47	b	10.97 \pm 1.34	c	26.78
North-west II	NW-NR	0.41 \pm 0.08	a	0.64 \pm 0.04	a	63.39
	NW-I	1.34 \pm 0.28	b	3.27 \pm 0.56	b	40.86
	NW-A	1.13 \pm 0.28	b	5.92 \pm 2.35	b	19.10
	NW-N	3.50 \pm 0.27	c	15.39 \pm 2.72	c	22.77
South IV	S-NR	0.27 \pm 0.00	a	0.38 \pm 0.01	a	72.26
	S-I	0.47 \pm 0.19	a	0.78 \pm 0.32	a	59.77
	S-M	0.24 \pm 0.06	a	1.21 \pm 0.29	a	19.38
	S-A	1.67 \pm 0.43	b	8.49 \pm 1.64	b	19.70
	S-N	2.41 \pm 0.30	b	16.47 \pm 0.73	c	14.61

Different letters represent significant differences at $p < 0.05$ for the Tukey test.

Analyzing the EEG/ETG ratio was possible to distinguish two main behaviors, independent of the site evaluated (Table 5). In the non-rehabilitated areas (with the exception of ST-NR) and areas in the initial stage of rehabilitation, the EEG represented between 45 and 72% of the ETG, while in native areas, ST-NR and intermediate and advanced stages represented only between 14 and 27 %. With the progress of the rehabilitation process, the tendency was to achieve a relationship between both glomalin fractions similar to native reference areas, with a predominance of ETG, even if the absolute values are far from the reference.

Relationship between the mycorrhizal, chemical and physical variables of the soil

The two-dimensional representation using NMDS (Figure 3) showed the arrangement of the areas of the three iron mining sites evaluated according to the mycorrhizal variables (SD, MC, EEG, ETG and species richness) and their correlation with the soil variables, and considering both sets of variables.

Analyzing the arrangement of the areas, considering the mycorrhizal variables (Figure 3a), spatial separation between non-rehabilitated and native areas was observed, while the other areas were heterogeneously distributed between both extremes. The unrehabilitated areas correlated positively with pH, V, silt and Cu contents, while the native areas were with CEC and SOM, Fe and clay contents. Finally, the whole arrangement of chemical, physical and mycorrhizal variables (Figure 3b) allowed distinguishing more clearly four groups: (i) non rehabilitated areas and the initial stage of South IV, (ii) the other rehabilitation stages of South IV and Northwest II rehabilitation stages, (iii) all rehabilitation stages of Sandstone II and (iv) native reference areas, whose differences were statistically corroborated ($F = 21.12$, $p = 0.0001$, Table 6).

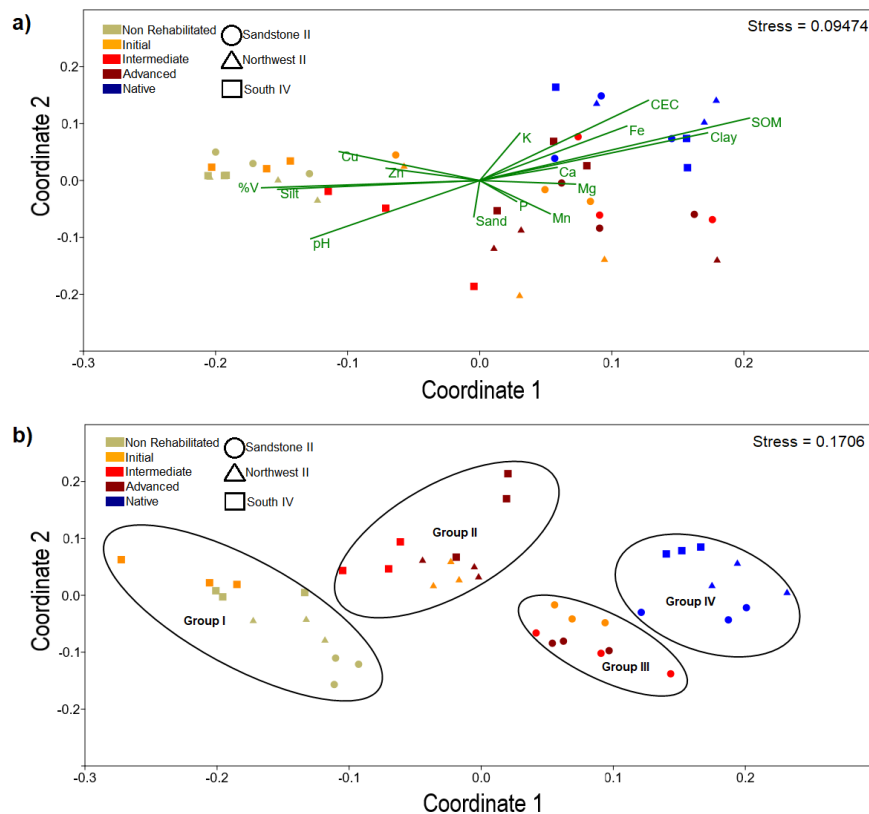


Figure 3. Two-dimensional ordination of the different areas of the three mining sites using NMDS considering the mycorrhizal variables (a), and the chemical, physical and mycorrhizal variables (b). Correlation between NMDS scores and the chemical and physical properties is also represent in (a).

Table 6. Pairwise PERMANOVA comparison of groups formed by NMDS. Group I (all unrehabilitated areas and the initial stage of South IV), Group II (the other rehabilitation stages of South IV and Northwest II rehabilitation stages), Group III (all rehabilitation stages of Sandstone II) and Group IV (native reference areas).

	Group I	Group II	Group III
Group II	14.07***		
Group III	29.1***	12.11***	
Group IV	41.79***	19.8***	11.98***

*** Significant differences for $p < 0.001$

As shown in the biplot (Figure 3a), the main soil properties correlated with mycorrhizal variables were pH, silt and clay content, V, CEC, Fe, Cu and SOM (Table 7). Specifically, high positive correlations ($r \geq 0.6$) were observed between both glomalin fractions and SOM, CEC and clay content. These were also negatively correlated ($r < -0.6$) with pH, V and silt content. On the other hand, the mycorrhizal variables SD, species richness and MC highly and positively correlated with each other, as well as both glomalin fractions.

Table 7. Spearman correlation between mycorrhizal variables and soil chemical and physical variables.

	PH	SOM	P	K	Ca	Mg	V	CEC	Zn	Fe	Mn	Cu	Sand	Silt	Clay	SD	MC	EEG	ETG
SD	-0.18	0.44**	0.16	-0.04	0.22	0.18	-0.48**	0.13	-0.28	0.16	0.27	-0.54***	0.24	-0.34*	0.43**				
MC	-0.03	0.22	-0.02	-0.45**	-0.01	0.07	-0.40*	-0.1	-0.14	-0.03	-0.01	-0.65***	0.26	-0.26	0.13	0.72***			
EEG	-0.66***	0.88***	-0.27	0.32*	0.35*	0.38*	-0.66***	0.73***	-0.21	0.55***	0.01	-0.39**	-0.1	-0.50***	0.60***	0.41**	0.25		
ETG	-0.68***	0.88***	-0.12	0.38*	0.3	0.23	-0.64***	0.69***	-0.22	0.49***	0.09	-0.22	-0.05	-0.56***	0.65***	0.49***	0.28	0.87***	
Richness	-0.29	0.42**	0.07	0.03	0.29	0.34*	-0.40**	0.16	-0.19	0.21	0.28	-0.41**	0.13	-0.34*	0.47**	0.68***	0.73***	0.38**	0.49**

Associated probability: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. SD = Spore density, MC = Mycorrhizal colonization, EEG = Easily extractable glomalin, ETG = Extractable total glomalin (ETG), SOM = Soil organic matter, V = Base saturation, CEC = Potential cation exchange capacity

DISCUSSION

Our study verified the positive effect of the rehabilitation processes on the AMF communities of the iron mining sites Sandstone II, Northwest II and South IV of the Serra Norte of Carajás-PA, in the Brazilian Amazon.

Prior to the rehabilitation actions, there was depression of infective propagules (spores and roots colonized), as well as a very low or no production and accumulation of soil glomalin. Only in the unrehabilitated area of Sandstone II colonized roots were found, probably arising from topsoil added. The topsoil addition represented an input of AMF propagules when compared to the exposed soil areas of Northwest II and South IV.

The spore density (SD) increased significantly after rehabilitation. Only in the initial stage of rehabilitation of South IV the spore number was still very low, probably due to the short time of intervention of the area (less than one year). In general, the spore density values in our study were far superior to most previous reports in Brazilian ecosystems (Aidar et al., 2004; Stürmer & Siqueira, 2011; Teixeira et al., 2017; Vieira et al., 2018), although similar to those of Zangaro et al. (2012; 2013) in different successional chronosequences of the south of the country. In all cases, the behavior of this variable was similar, observing the stimulation of sporulation with rehabilitation, which tends to decrease in later stages of succession/rehabilitation, with values always higher than native ecosystem of reference. This is attributed to environmental stress conditions such as high luminous intensity and low water and nutrient content, which promote higher rates of sporulation in the successional stages that have not yet reached equilibrium (Oliveira & Oliveira, 2010; Zangaro et al., 2012).

Studies of the AMF diversity in the Brazilian Amazon, including natural, reforested, agricultural and pasture ecosystems, have been carried out, both from field samples and plant traps (Caproni et al., 2003, Leal et al., 2009; Stürmer & Siqueira, 2011; Freitas et al., 2014; Nobre et al., 2018). The number of morphotypes identified in our study (66) exceeds previous reports, where only Stürmer & Siqueira (2011) obtained values close to ours (61) in the Alto Solimões River region of western Amazonia. In general, the rehabilitation favored the recovery of the mycorrhizal communities by increasing the sporulation and richness of the AMF, aspect also observed in rehabilitated areas of iron mining in the Quadrilátero Ferrífero, MG by Teixeira et al. (2017) and Vieira et al. (2018). On the other hand, the high dissimilarity in the AMF diversity observed between native and rehabilitated areas within each mining site indicates that the systems are still in recovery. However, our results show that the iron ecosystems of FLONA

de Carajás harbor a high diversity of AMF, whose communities are highly resilient to drastic modifications of the environments.

The high MC rates found in all areas, together with the considerable increase in SD with rehabilitation, suggest both the introduction of mycotrophic plants (intentional or not) and the stimulation of sporulation, thus contributing to the increase in the availability of propagules in the soil. The high positive correlation between both variables in the present study also corroborates this statement. The availability of propagules is a key factor in the establishment of microtrophic species in new substrates (Cázares et al., 2005), and consequently in the recovery of degraded areas (Maltz & Treseder 2015). Oliveira & Oliveira (2010) reviewed the publications from 1980 until then of the mycorrhizal status of plants in the Brazilian Amazon and verified that of the 207 species evaluated, 87% were found to be mycorrhizal, reporting on not a few occasions rates of mycorrhizal colonization higher than 50% or qualified as heavily colonized. Both the results obtained here from the MC at the ecosystem level (since individual plants were not evaluated but an aliquot of roots from soil samples), as the previous records of the mycorrhizal plant of Amazonas suggest a high level of arbuscular mycorrhizal association in this important Brazilian biome.

The production and accumulation of glomalin also responded positively to the progress of rehabilitation. The increase in glomalina contents when conservationist land management or rehabilitation actions are carried out is widely recognized, identifying it as an important indicator in land use changes (Rillig et al., 2003; Silva et al., 2012; Wang et al., 2015; Gottshall et al., 2017). Glomalin is an important component of SOM, contributing to the sequestration and stocking of soil C and N (Lovelock et al., 2004; Schindler et al., 2007; Kumar et al. 2018). The high positive correlation of both glomalin fractions with SOM and CEC in the present study showed this important relation, as well as its possible contribution to soil CEC.

Another relevant aspect of this variable in response to rehabilitation was given by the EEG/ETG ratio. A similar relationship observed between native areas and intermediate and advanced stages of rehabilitation shows the tendency to equilibrium the rehabilitated areas with the predominance of the most stable fraction. The particular case observed in ST-NR, with predominance of the most recalcitrant fraction could be related to the addition of topsoil in Sandstone II, even though the levels of SOM and EEG are similar to other areas not rehabilitated. For the extraction of the ore, the topsoil layer is removed and stored in piles until it is used to fill pits and tailings piles to be rehabilitated. The intense mineralization of the organic matter of this removed and relocated soil could have been the main cause of this

reduction, but also allowed to maintain its microbial activity. Several experimental studies, both in situ and ex situ, have observed the decomposition of glomalin, mainly of ETG (Steinberg & Rillig, 2003; Rillig et al., 2003; Wu et al., 2014). It is also recognized that the EEG is not only the newly deposited glomalin in the soil, but also that fraction recently modified by its decomposition (Steinberg & Rillig, 2003; Rillig, 2004), which also justifies to have been detected in the tailings piles without vegetation of the Northwest II and South IV sites.

The biplot ordination of mycorrhizal attributes and their correlation with the main chemical and physical properties of the soil allowed the separation of non-rehabilitated areas and the initial rehabilitation stage of South IV (with less than one year of management) of the other rehabilitated and native areas, showing the main soil properties related to them. The grouping of the areas with lower values in the mycorrhizal attributes, positively correlated to pH, V and silt content, was probably due to the chemical and physical modifications of the substrates during the extraction of the ore. Likewise, their negative correlation with attributes such as SOM, CEC, Fe and clay contents reveal the intense modification and degradation of these environments. While the distribution of the areas in rehabilitation between both ends and towards the native areas suggests the progress in the recovery of mycorrhizal attributes.

Finally, when combined the mycorrhizal, chemical and physical attributes of the soil, the different studied areas were better grouped, although in a heterogeneous way. The grouping of the unrehabilitated areas and the initial rehabilitation stage of South IV were confirmed, probably due to the short period of management of the latter (less than one year). On the other hand, the grouping of the different stages of Sandstone II, and next to the native areas could be due to the larger management time of this site, besides the topography and less anthropic disturbance when compared to the Northwest II and South IV sites, with areas still operating. Nevertheless, the arrangement of rehabilitation stages towards the native areas indicates the positive effect of the environmental recovery actions undertaken on the mycorrhizal communities and the main soil properties related to them.

CONCLUSIONS

Our study provides important knowledge about the communities of arbuscular mycorrhizal fungi in natural, rehabilitated and degraded ecosystems of the Brazilian Amazon, under pressure from the mining industry. In general, the studied ferruginous ecosystems of the FLONA de Carajás present a high diversity of AMF, as well as a high degree of association

(when vegetation is present), being highly resilient to the drastic modifications of the environments. However, the dissimilarity of the diversity between unrehabilitated, rehabilitated and native areas within each mining site suggests that these are still in the process of recovery. The EEG/ETG ratio results in an interesting, easily interpretable and comparable parameter of the AMF response to rehabilitation, indicating the balance or not of new rehabilitated environments, independent of the absolute values of the variables. The main soil properties related to mycorrhizal variables were pH, soil texture, organic matter content and CEC. In conclusion, the rehabilitation actions carried out at the iron ore sites studied provide the recovery of the AMF communities, process still in progress, especially for the Northwest II and South IV sites with less time of intervention and more difficult management, when compared with Sandstone II.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the PEC-PG CAPES program for the scholarship granted to the first author, DCS-UFLA, ITV-Vale for the partnership and availability of equipment and resources for conducting the research.

REFERENCES

- Aidar, M. P. M., Carrenho, R., & Joly, C. A. (2004). Aspectos of arbuscular mycorrhizal fungi in an Atlantic Forest chronosequence Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (Petar), SP. *Biota Neotropica*, 4(2), 1-15. DOI: 10.1590/S1676-06032004000200005
- Augé, R. M., Toler, H. D., & Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, 25, 13-24. DOI: 10.1007/s00572-014-0585-4
- Brandford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brundrett, M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*, 320, 37-77. DOI: 10.1007/s11104-008-9877-9
- Caproni, A. L., Franco, A. A., Berbara, R. L. L., Granha, J. R. D. d. O., Ribeiro, E. M. d. S., & Saggin Júnior, O. J. (2003). Capacidade infectiva de fungos micorrízicos arbusculares em áreas reflorestadas após mineração de bauxita no Pará. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(8), 937-945. DOI: 0.1590/S0100-204X2003000800006
- Carmo, F. F. D., & Kamino, L. H. Y. (Eds.). (2015). *Geossistemas Ferruginosos Do Brasil Áreas Prioritárias Para Conservação Da Diversidade Geológica E Biológica, Patrimônio Cultural E Serviços Ambientais*. Belo Horizonte.
- Cázares, E., Trappe, J. M., & Jumpponen, A. (2005). Mycorrhiza-plant colonization patterns on a subalpine glacier forefront as a model system of primary succession. *Mycorrhiza*, 15, 405-416. DOI: 10.1007/s00572-004-0342-1
- Cortese, A. M., & Bunn, R. A. (2017). Availability and function of arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi during revegetation of dewatered reservoirs left after dam removal *Restoration Ecology*, 25(1), 63-71. DOI: 0.1111/rec.12406
- Daynes, C. N., Field, D. J., Saleeba, J. A., Cole, M. A., & McGee, P. A. (2013). Development and stabilisation of soil structure via interactions between organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots. *Soil Biology & Biochemistry*, 57, 683-694. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.09.020
- EMBRAPA. (2017). *Manual de métodos de análise de solo* (3. ed. rev. e ampl ed.). Brasília, DF.
- Freitas, R. d. O., Buscardo, E., Nagy, L., Maciel, A. B. d. S., Carrenho, R., & Luizão, R. C. C. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungal communities along a pedo-hydrological gradient in a Central Amazonian terra firme forest. *Mycorrhiza*, 24, 21-32. DOI: 10.1007/s00572-013-0507-x
- Gastauer, M., Silva, J. R., Junior, C. F. C., Ramos, S. J., Filho, P. W. M. S., Neto, A. E. F., et al. (2018). Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable

mining. *Journal of Cleaner Production*, 172(20), 1409-1422. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.10.223

Gerdemann, J., & Nicolson, T. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions British Mycological Society*, 46(2), 235-244. DOI: 10.1016/S0007-1536(63)80079-0

Giannini, T. C., Giulietti, A. M., Harley, R. M., Viana, P. L., Jaffe, R., Alves, R., et al. (2017). Selecting plant species for practical restoration of degraded lands using a multiple-trait approach. *Austral Ecology*, 42, 510-521. DOI:10.1111/aec.12470

Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84, 489-500. DOI: 0.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x

Gottshall, C. B., Cooper, M., & Emery, S. M. (2017). Activity, diversity and function of arbuscular mycorrhizae vary with changes in agricultural management intensity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 241, 142-149. DOI: 10.1016/j.agee.2017.03.011

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9

Herrera-Peraza, R. A., Furrázola, E., Ferrer, R. L., Fernández Valle, R., & Torres Arias, Y. (2004). Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 35(2), 113-123.

Hildebrandt, U., Regvar, M., & Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance *Phytochemistry* 68, 139-146. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.09.023

ICMBIO (Ed.). (2017). *Plano de Pesquisa Geossistemas Ferruginosos da Floresta Nacional de Carajás*. Brasília.

Janos, D. P., Garamszegi, S., & Beltran, B. (2008). Glomalin extraction and measurement. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 728-739. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.10.007

Johnson, N. C., Gehring, C., & Jansa, J. (Eds.). (2017). *Mycorrhizal Mediation of Soil Fertility, Structure, and Carbon Storage*: Elsevier.

Kempel, A., Schmidt, A. K., Brandl, R., & Schädler, M. (2010). Support from the underground: Induced plant resistance depends on arbuscular mycorrhizal fungi. *Functional Ecology*, 24, 293-300. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2009.01647.x

Koleff, P., Gaston, K. J., & Lennon, J. J. (2003). Measuring beta diversity for presence-absence data. *Journal of Animal Ecology*, 72, 367-382. DOI: 10.1046/j.1365-2656.2003.00710.x

Kumar, S., Singh, A. K., & Ghosh, P. (2018). Distribution of soil organic carbon and glomalin related soil protein in reclaimed coal mine-land chronosequence under tropical condition. *Science of the Total Environment*, 625, 1341-1350. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.061

- Leal, P. L., Stürmer, S. L., & Siqueira, J. O. (2009). Occurrence and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trap cultures from soils under different land use systems in the Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*, 111-121.
- Lovelock, C. E., Wright, S. F., Clark, D. A., & Ruess, R. W. (2004). Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, *92*, 278–287. DOI: 10.1111/j.0022-0477.2004.00855.x
- Maltz, M. R., & Treseder, K. K. (2015). Sources of inocula influence mycorrhizal colonization of plants in restoration projects: a meta-analysis. *Restoration Ecology* *23*(5), 625-634. DOI: 10.1111/rec.12231
- Matias, S. R., Pagano, M. C., Muzzi, F. C., Oliveira, C. A., Carneiro, A. A., Horta, S. N., et al. (2009). Effect of rhizobia, mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants used to recover an iron ore area in Brazil. *European Journal of Soil Biology*, *45*, 259-266. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2009.02.003
- Millennium Ecosystem Assessment. (2005). *Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis*. Washington DC: World Resources Institute.
- Nobre, C. P., Costa, M. G. D., Goto, B. T., & Gehring, C. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the babassu palm (*Attalea speciosa*) in the eastern periphery of Amazonia, Brazil. *Acta Amazonica*, *48*, 321-329. 10.1590/1809-4392201800092
- Oliveira, A. N., & Oliveira, L. Z. (2010). Micorrizas Arbusculares no Bioma Amazônia. In S. F. Siqueira JO, Cardoso EJBN, Tsai SM (Ed.), *Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil* (pp. 251-277). Lavras, MG: Editora UFLA.
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society*, *55*, 158-161. DOI: 10.1016/S0007-1536(70)80110-3
- Redecker, D., Schüssler, A., Stockinger, H., Stürmer, S. L., Morton, J. B., & Walker, C. (2013). An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, *23*(7), 515-531. DOI: 10.1007/s00572-013-0486-y
- Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* *84*(4), 355-363. DOI: 10.4141/S04-003
- Rillig, M. C., Ramsey, P. W., Morris, S., & Paul, E. A. (2003). Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and Soil* *253*, 293–299. DOI: 10.1023/A:1024807820579
- Sánchez, L. E. (2007). Mineração e meio ambiente *Tendências tecnológicas Brasil 2015: geociências e tecnologia mineral* (pp. 196-213). Rio de Janeiro: CETEM/MCT <http://mineralis.cetem.gov.br/handle/cetem/1290>
- Schindler, F. V., Mercer, E. J., & Rice, J. A. (2007). Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biology & Biochemistry* *39*, 320–329. DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.08.017

- Shüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, *105* (12), 1413-1421. DOI: 10.1017/S0953756201005196
- Sikes, B. A., Cottenie, K., & Klironomos, J. N. (2009). Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Ecology* *97*, 1274-1280. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2009.01557.x
- Silva, C. F. d., Simões-Araújo, J. L., Silva, E. M. R. d., Pereira, M. G., Freitas, M. S. M., Saggin Júnior, O. J., et al. (2012). Fungos micorrízicos arbusculares e proteína do solo relacionada à glomalina em área degradada por extração de argila e revegetada com eucalipto e acácia. *Ciência Florestal*, *22*(4), 749-761. DOI: 10.5902/198050987556
- Steinberg, P. D., & Rillig, M. C. (2003). Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. *Soil Biology & Biochemistry*, *35*, 191-194. DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00249-3
- Stürmer, S. L., & Siqueira, J. O. (2011). Species richness and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi across distinct land uses in Western Brazilian Amazon. *Mycorrhiza*, *21*, 255-267. DOI: 10.1007/s00572-010-0330-6
- Stürmer, S. L., Bever, J. D., & Morton, J. B. (2018). Biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota): a phylogenetic perspective on species distribution patterns. *Mycorrhiza*, *28*(7), 587-603. DOI: 10.1007/s00572-018-0864-6
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., et al. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, *90*, 135-159. DOI: 10.1007/s13225-018-0401-0
- Teixeira, A. F. d. S., Kimmelmeier, K., Marascalchi, M. N., Stürmer, S. L., Carneiro, M. A. C., & Moreira, F. M. d. S. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings: Inoculum potential, density, and diversity of spores related to soil properties. *Ciência e Agrotecnologia*, *41*(5), 511-525. DOI: 10.1590/1413-70542017415014617
- Trindade, A. V., Graziotti, P. H., & Tótola, M. R. (2000). Utilização de características microbiológicas na avaliação da degradação ou recuperação de uma área sob mineração de Ferro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, *24*, 683-688. DOI: 10.1590/S0100-06832000000300022
- Vieira, C. K., Marascalchi, M. N., Rodrigues, A. V., Armas, R. D. d., & Stürmer, S. L. (2018). Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. *Journal of Environmental Sciences*, *67*, 330-343. DOI: 10.1016/j.jes.2017.08.019
- Wall, D. H., Bardgett, R. D., Behan-Pelletier, V., Herrick, J. E., Jones, T. H., Ritz, K., et al. (Eds.). (2012). *Soil Ecology and Ecosystem Services*: Oxford University Press.
- Wang, Q., Wang, W., He, X., Zhang, W., Song, K., & Han, S. (2015). Role and Variation of the Amount and Composition of Glomalin in Soil Properties in Farmland and Adjacent Plantations with Reference to a Primary Forest in NorthEastern China. *PLoS ONE*, *10*(10), e0139623. DOI: 10.1371/journal.pone.0139623

Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30(3), 279-407. DOI: 10.2307/1948435

Wijayawardene, N. N., Pawłowska, J., Letcher, P. M., Kirk, P. M., Humber, R. A., Schußler, A., et al. (2018). Notes for genera: basal clades of Fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). *Fungal Diversity*, 92, 43-129. DOI: 10.1007/s13225-018-0409-5

Wildman, H. (2015). Improving Mine Rehabilitation Success Through Microbial Management. *Journal of Environmental Solutions for Oil, Gas, and Mining*, 1(2), 32-46. DOI: 10.3992/1573-2377-374X-1.1.32

Wright, S. F., & Upadhyaya, A. (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161(9), 575-586. DOI: 10.1097/00010694-199609000-00003

Wright, S. F., & Upadhyaya, A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 198(1), 97-107. DOI: 10.1023/A:1004347701584

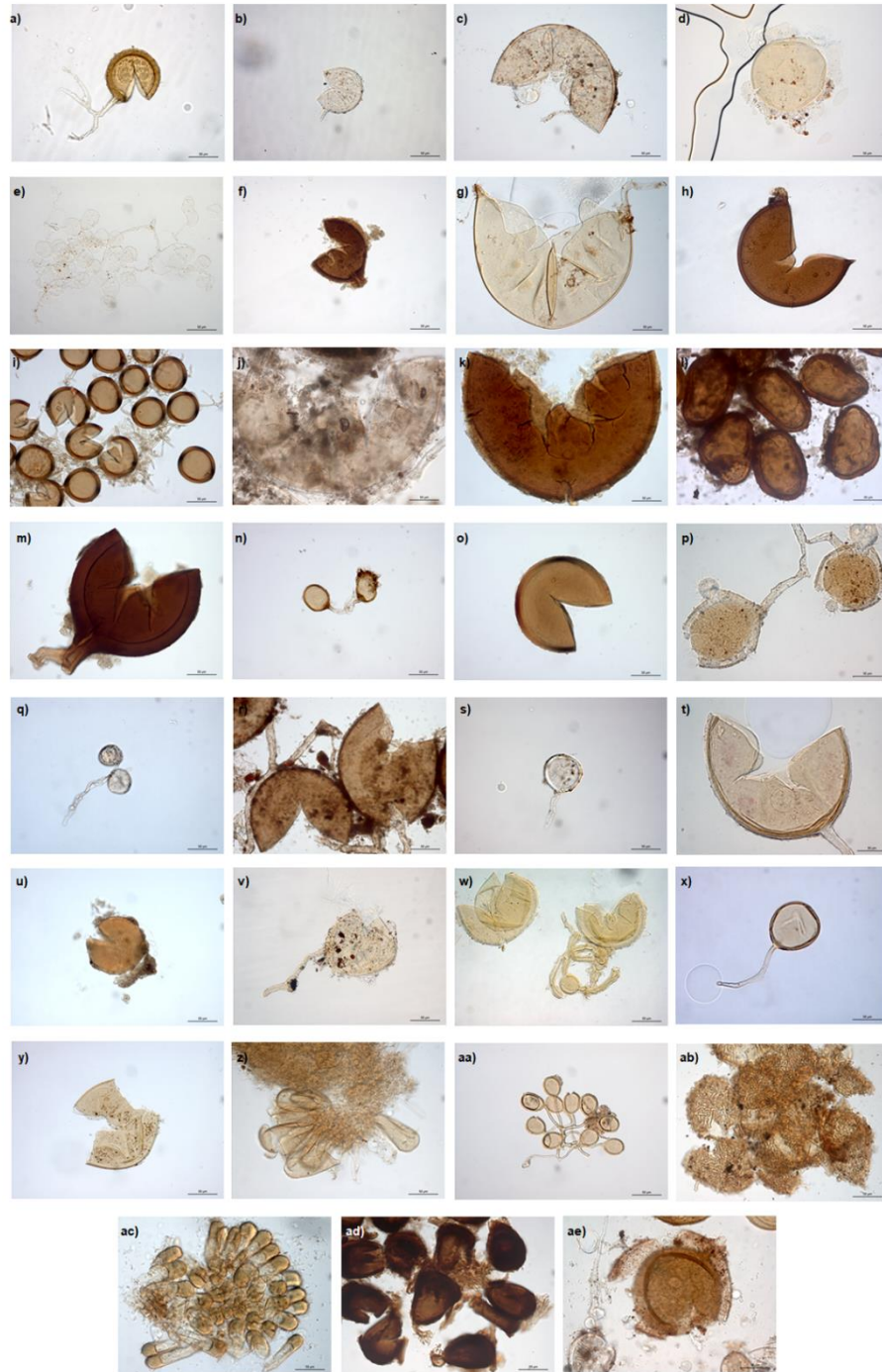
Wu, Z., McGrouther, K., Huang, J., Wu, P., Wu, W., & Wang, H. (2014). Decomposition and the contribution of glomalin-related soil protein (GRSP) in heavy metal sequestration: Field experiment. *Soil Biology & Biochemistry* 68, 283-290. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.10.010

Zangaro, W., Ansanelo, A. P., Lescano, L. E. A. M., Alves, R. d. A., Rondina, A. B. L., & Nogueira, M. A. (2012). Infection intensity, spore density and inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi decrease during secondary succession in tropical Brazilian ecosystems. *Journal of Tropical Ecology*, 28, 453-462. DOI: 10.1017/S0266467412000399

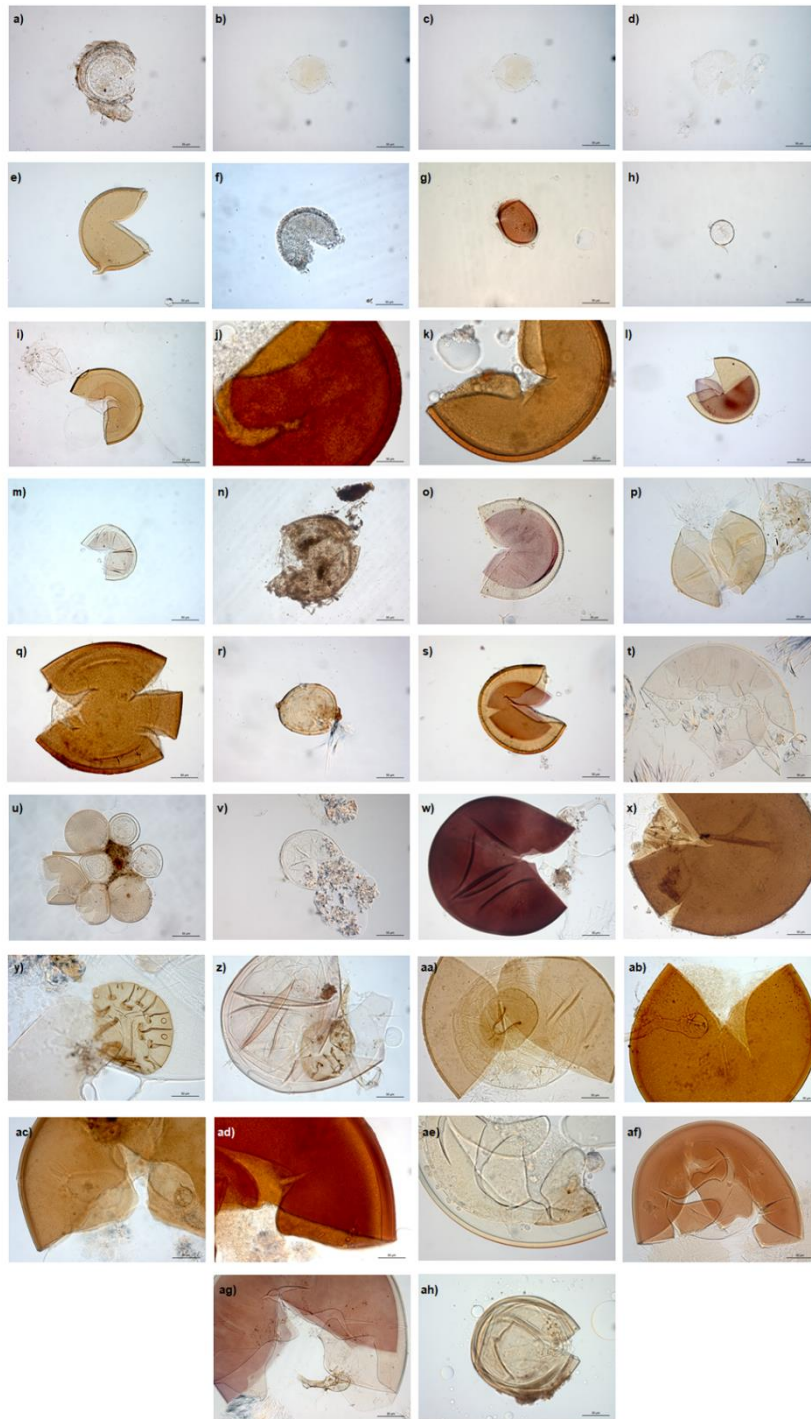
Zangaro, W., Rostirola, L. V., Souza, P. B. d., Alves, R. d. A., Lescano, L. E. A. M., Rondina, A. B. L., et al. (2013). Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza*, 23, 221-233. DOI: 10.1007/s00572-012-0464-9

Zobel, M., & Opik, M. (2014). Plant and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities – which drives which? *Journal of Vegetation Science*. DOI: 10.1111/jvs.12191

ANEXO



Supplement 1a. Found arbuscular mycorrhizal morphotypes of **Diversisporaceae:** a) *Diversispora epigaea*, b) *Diversispora* sp.1, c) *Diversispora* sp.2, d) *Diversispora* sp.3; **Glomeraceae:** e) *Dominikia minuta*, f) *Funneliformis* cf. *badium* g) *Funneliformis mosseae*, h) *Glomus* cf. *ambisporum*, i) *Glomus glomerulatum*, j) *Glomus microaggregatum*, k) *Glomus spinuliferum*, l) *Glomus* sp.1, m) *Glomus* sp.2, n) *Glomus* sp.3, o) *Glomus* sp.4, p) *Glomus* sp.5, q) *Glomus* sp.6, r) *Glomus* sp.7, s) *Oehlia diáfana*, t) *Rhizophagus clarus*, u) *Rhizophagus fasciculatus*, v) *Rhizophagus intraradices*, w) *Rhizophagus* cf. *proliferus*, x) *Rhizophagus* sp.1, y) *Rhizophagus* sp.2, z) *Sclerocystis coremioides*, aa) *Sclerocystis rubiformis*, ab) *Sclerocystis sinuosa*, ac) *Sclerocystis taiwanensis*, ad) *Sclerocystis* sp.1; **Incertae-sedis:** ae) *Entrophospora infrequens*.



Supplement 1b. Found arbuscular mycorrhizal morphotypes of **Ambisporaceae:** a) *Ambispora leptoticha*, b) *Ambispora* cf. *nicolsonii*; **Archaeosporaceae:** c) *Archaeospora myriocarpa*, d) *Archaeospora trappei*; **Claroideoglomeraceae:** e) *Claroideoglomerus etunicatum*, f) *Corymbiglomerus tortuosum*; **Pacisporaceae:** g) *Pacispora* cf. *franciscana*; **Paraglomeraceae:** h) *Paraglomerus* sp.1; **Acaulosporaceae:** i) *Acaulospora colombiana*, j) *Acaulospora foveata*, k) *Acaulospora lacunosa*, l) *Acaulospora mellea*, m) *Acaulospora morrowiae*, n) *Acaulospora punctata*, o) *Acaulospora scrobiculata*, p) *Acaulospora spinosissima*, q) *Acaulospora tuberculata*, r) *Acaulospora* sp.1, s) *Acaulospora* sp.2, t) *Acaulospora* sp.3, u) *Acaulospora* sp.4, v) *Acaulospora* sp.5; **Gigasporaceae:** w) *Cetraspora pelúcida*, x) *Dentiscutata biornata*, y) *Dentiscutata cerradensis*, z) *Dentiscutata savannicola*, aa) *Fuscutata aurea*, ab) *Gigaspora albida*, ac) *Gigaspora gigantea*, ad) *Gigaspora margarita*, ae) *Racocetra fulgida*, af) *Scutellospora* cf. *arenicola*, ag) *Scutellospora dipurpurascens*, ah) *Scutellospora* sp.1.

2.2 ARTIGO - RHIZOBIAL AND ENDOPHYTIC NODULE BACTERIA OF RAINFORESTS OF EASTERN BRAZILIAN AMAZON

Raquel Milagros Rodríguez-Rodríguez¹, Amanda Azarias Guimarães¹, Jordana Luísa de Castro¹, Fatima Maria de Souza Moreira¹, José Oswaldo Siqueira^{1,2}, Marco Aurélio Carbone Carneiro¹

¹. Departamento de Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

². Instituto Tecnológico Vale, Belém, PA, Brasil

Artigo formatado conforme as normas da Revista *Environmental Microbiology*

RESUMO:

Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) e endofíticas são importantes microorganismos do solo, pouco estudados em ecossistemas ferruginosos da Amazônia. Assim, o presente trabalho se propôs conhecer, isolar e caracterizar as comunidades de BFNNL e endofíticas dos nódulos em áreas de florestas ombrófilas da Serra Norte da FLONA de Carajás, na Amazônia oriental brasileira. Para isso foram realizados experimentos de captura a partir de solo de florestas pristinas dos sítios de mineração Arenito II, Noroeste II e Sul IV utilizando-se *Macropodium atropurpureum* e *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* como plantas iscas. Apenas obteve-se nodulação em *M. atropurpureum*, onde as comunidades bacterianas de Arenito II foram as mais eficientes, evidenciado pela maior nodulação, produção de biomassa, relação biomassa da parte aérea/ biomassa de raiz, e índice de suficiência de nitrogênio. Foram isoladas um total de 52 estirpes bacterianas distribuídas em cinco grupos culturais incluindo bactérias nodulíferas e endofíticas: 32 de Arenito II, 12 de Noroeste II e oito de Sul IV. *Bradyrhizobium* foi o gênero nodulífero comum das três áreas, enquanto *Paraburkholderia* encontrou-se apenas em Arenito II, amplificando-se em ambos o fator *nodD1*. O gênero rizobial *Methylobacterium*, presente nas três áreas, não amplificou o *nodD1*. Registram-se endofíticas dos gêneros *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Leifsonia* em Arenito II, *Leifsonia* em Noroeste II e *Paenibacillus* em Sul IV. A maior diversidade e eficiência das BFNNL e bactérias endofíticas foi observada no Arenito II, provavelmente devido às melhores propriedades edáficas da área, e a existência de um *hotspot* de fixação biológica de nitrogênio em uma das suas parcelas. Finalmente, dispõe-se de 31 estirpes nodulíferas e 21 endofíticas em coleção para futuras investigações.

PALAVRAS CHAVES: diversidade microbiana, bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas, bactérias endofíticas.

ABSTRACT:

Legume-nodulating nitrogen-fixing bacteria (LNNFB) and endophytic are important soil microorganisms, little studied in ferruginous ecosystems of the Amazon. Thus, the present work aimed to know, isolate and characterize the LNNFB and endophytic communities of the nodules in areas of tropical rainforest of the Serra Norte region of FLONA Carajás, in the eastern Brazilian Amazon. For this purpose, experiments were carried out from the pristine forests soils of the Sandstone II, Northwest II and South IV mining sites using *Macropodium atropurpureum* and *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* as trap plants. Nodulation was observed only in *M. atropurpureum*, where the bacterial communities of Arenito II were the most efficient, evidenced by the higher nodulation, biomass production, shoot/root ratio and nitrogen sufficiency index. Fifty-two bacterial strains distributed in five cultural groups including noduliferous and endophytic bacteria were isolated: 32 from Sandstone II, 12 from Northwest II and eight from South IV. *Bradyrhizobium* was the common noduliferous genus of the three areas, while Paraburkholderia was found only in Sandstone II, amplifying in both the *nodD1* factor. The rhizobial genus *Methylobacterium*, present in the three areas, did not amplify the *nodD1*. It was found endophytes of the genus *Paenibacillus*, *Enterobacter* and *Leifsonia* in Sandstone II, *Leifsonia* in Northwest II and *Paenibacillus* in South IV. The greater diversity and efficiency of the LNNFB and endophytic bacteria was observed in Sandstone II, probably due to the better edaphic properties of the area, and the existence of a biological nitrogen fixation hotspot in one of its plots. Finally, 31 noduliferous and 21 endophytic bacterial strains are available for further investigation.

KEYWORDS: microbial diversity, Legume-nodulating nitrogen-fixing bacteria, bacterial endophytes

INTRODUÇÃO

O gás dinitrogênio (N_2) é a forma mais abundante de N na biosfera, mas inacessível para a maioria dos organismos, sendo a fixação biológica do N_2 (transformação do N_2 para NH_3 mediada por microorganismos) o principal processo pelo qual esse elemento entra no sistema solo-planta. Microorganismos fixadores de nitrogênio encontram-se em vários filos de Bacteria e Archaea, podendo ser de vida livre, associativos ou simbióticos (Moreira & Siqueira, 2006; Madigan et al., 2015).

Bactérias representantes das Subclasses α e β Proteobacteria são capazes de fixar N_2 simbioticamente com representantes de Fabaceae, sendo comumente conhecidas como rizóbios ou bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) (Moreira & Siqueira, 2006; Sadowsky et al., 2013). O papel desses microorganismos está relacionado fundamentalmente à nutrição nitrogenada das plantas, no entanto elas também podem trazer outros benefícios, por exemplo, mediante a solubilização de fosfatos (Marra et al., 2011; Longatti et al., 2013), produção de fitohormônios de crescimento (Longatti et al., 2013) e sideróforos. Esse último, além de auxiliar na absorção de ferro, diminui a toxicidade por Al (Rogers et al., 2001) e metais pesados (Schalk et al., 2011; Hesse et al., 2018) BFNNL também podem induzir resistência sistêmica contra patógenos (Sistani et al., 2017) e tolerância a estresses abióticos (Zahir et al., 2010). Por outro lado, os nódulos, estruturas hipertróficas especializadas da fixação simbiótica de nitrogênio, são também habitat de outras bactérias endofíticas fixadoras ou não, as quais podem aportar benefícios a ambos simbiontes, bem como serem oportunistas (Moreira & Siqueira, 2006; De Meyer et al., 2015). Em geral, BFN em associação com as plantas e/ou vivendo saprofiticamente no solo contribuem no funcionamento dos ecossistemas terrestres participando direta e indiretamente na provisão de bens e serviços dos mesmos (Wall et al., 2012).

A maioria das florestas tropicais brasileiras concentram-se na região amazônica, estimando-se que mais do 60% da Floresta Amazônica da América do Sul está em território brasileiro. A Amazônia brasileira contém 21 fitofisionomias distintas (MMA/SBF, 2002), sendo as Florestas ombrófilas (Tropical Rain Forests) *hotspot* de biodiversidade (Myers et al., 1988), dominadas principalmente por leguminosas (Ducke & Black, 1954; ter Steege et al., 2010).

Vários estudos relacionados à capacidade de nodulação de leguminosas da Amazônia brasileira têm sido desenvolvidos (Magalhães et al., 1987; Moreira et al., 1992; Gehring et al.,

2005; Faria et al., 2010), bem como da diversidade das comunidades de rizóbios avaliada diretamente de nódulos de campo (Moreira et al., 1993; 1998) quanto do solo, mediante o uso de culturas armadilhas (Jesus et al., 2005, Lima et al., 2009; Borges et al., 2016). A maioria destes estudos concentram-se na Amazônia ocidental, sendo necessário ampliá-los a outras localidades, não apenas para conhecer a diversidade deste importante grupo de microorganismos do solo, como também para a criação de bancos de germoplasma locais. Estes podem ser utilizados em futuras pesquisas relacionadas à conservação, uso e manejo de espécies nodulíferas nativas, bem como nos processos de reabilitação de ambientes degradados e/ou produção agrícola.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi conhecer, isolar e caracterizar cultural e geneticamente BFNNL e bactérias endofíticas dos nódulos de três florestas ombrófilas pristinas na Serra Norte de Carajás, na Amazônia oriental brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área de estudo

O presente estudo foi desenvolvido na Serra dos Carajás, a mais rica província mineral do Brasil e uma das mais expressivas do planeta (Carmo & Kamino, 2015). A mesma encontra-se inserida dentro dos limites da Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, no sudeste do Estado de Pará (ICMBio, 2016). O clima da região de acordo à classificação de Köppen-Geinger é do tipo "Aw"- tropical chuvoso com seca de inverno, temperatura média de anual 26.2°C e acumulado de precipitações de até 1900 mm ano⁻¹ (IBAMA, 2003).

A FLONA de Carajás constitui uma importante zona de conservação e manejo sustentável que inclui unidades de conservação, produção florestal, mineração, entre outras (ICMBio, 2016). Para a realização do presente estudo foram escolhidas três áreas de floresta ombrófila densa sobre solos ferríferos em três sítios de mineração: Arenito II (A-II), Noroeste II (NO-II) e Sul IV (IV), do Complexo Mineral Carajás na Serra Norte da FLONA de Carajás, município Parauapebas.

Amostragem e caracterização física e química do solo

As coletas de solo foram realizadas durante a estação seca de 2016 (outubro), selecionando-se três parcelas (10 x 20 m) por área. Dentro de cada parcela amostraram-se cinco pontos distribuídos aleatoriamente para a formação das amostras compostas, totalizando nove

amostras compostas. Parte do solo foi seca ao ar e peneirada em malha de 2 mm para análises química e física, e outra separada e armazenada a 4°C para as avaliações microbiológicas.

As análises químicas e físicas do solo foram realizadas de acordo aos métodos padronizados e descritos pela EMBRAPA (2017), e incluíram determinação do pH em H₂O (1:2.5 v/v), P, K e Fe disponíveis (extração com Mehlich 1), Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ disponíveis (extração com KCl 1 mol L⁻¹), H+Al (extrator SMP), carbono orgânico (Walkley & Black, 1934) e granulometria pelo método da pipeta (Bouyoucos, 1927).

De acordo com os critérios de interpretação de análises de solo de Alvarez et al. (1999) os três ambientes em estudo têm seus solos fortemente ácidos, com teores de P muito baixos, MO e teor de K adequados, e CEC e teores de Fe muito altos. Eles são semelhantes quanto a pH, CEC, MO, teores disponíveis de P, K e Fe, e diferenciam-se nos teores de Ca, Mg, Al, Mn, B, Zn e Cu e textura. Altos teores de Al, em níveis tóxicos destacam o NO-II, enquanto os maiores teores de Mn, Zn e Cu destacam o S-IV. Em geral, A-II apresentou as melhores condições do solo comparado com NO-II e S-IV (Tabela 1).

Tabela 1. Análises química e física dos solos das florestas ombrófilas em estudo de Arenito II (A-II), Noroeste II (NO-II) e Sul IV (S-IV).

AREA	pH _{H2O} *	MOS* g kg ⁻¹	P* -----mg dm ⁻³ -----	K* -----mg dm ⁻³ -----	Ca -----cmolc dm ⁻³ -----	Mg -----cmolc dm ⁻³ -----	Al -----cmolc dm ⁻³ -----	CTC*	Fe* -----mg dm ⁻³ -----	Mn -----mg dm ⁻³ -----	B -----mg dm ⁻³ -----	Zn -----mg dm ⁻³ -----	Cu -----mg dm ⁻³ -----	Areia -----%	Silte -----%	Argila* -----%
A-II	4.47	40.00	1.83	67.4	1.87a	0.40ab	0.47b	10.81	198.87	33.43b	0.90a	0.73b	0.23c	32.77a	12.23b	55.00
NO-II	4.27	45.33	2.30	68.2	0.30b	0.23b	1.17a	11.87	252.50	39.63b	0.63b	0.90b	2.30b	43.27a	13.07b	43.67
S-IV	4.30	43.33	2.37	76.6	1.50a	0.53a	0.50b	9.53	169.23	107.87a	0.57b	2.13a	3.20a	11.70b	23.97a	64.33

MOS = Matéria orgânica do solo, V = Saturação por bases, CTC = Capacidade de Troca Catiônica.

Médias com letras diferentes representam diferenças significativas a $p < 0.05$ para o teste de Scott-Knott; * - não se detectaram diferenças significativas.

Experimento de captura

Para a captura das BFNNL e bactérias endofíticas dos nódulos foram utilizadas como plantas iscas *Macropitilium atropurpureum* (DC.) Urb., hospedeiro promíscuo e amplamente utilizado neste tipo de estudo (Moreira 2008, Sprent 2009), e *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* Barneby, variedade restrita a solos ferruginosos do norte do país (CNCFlora 2012), conhecida popularmente como mimosa de canga. Embora pouco utilizada em experimentos de captura *Mimosa acutistipula* (Mart.) Benth. é reconhecida como nodulífera, com resultados experimentais positivos de nodulação (Assis Júnior et al., 1986; Ferreira et al., 2012). Isto, somado à disponibilidade de sementes desta variedade típica da localidade de estudo, motivaram sua escolha como segunda planta isca.

Alíquotas de 10 g solo das três áreas selecionadas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0.85%), na relação 1:1 (w/v) e agitadas a 120 rpm por 30 min. Posteriormente, foi inoculado 1 mL das suspensões de solo em garrafas de vidro de 500 mL com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) a ¼ de força e baixo teor de nitrogênio (5.25 mg L⁻¹) junto às plântulas recém germinadas, e utilizando fitas de papel de filtro como suporte para o crescimento radicular. Previamente as sementes foram desinfestadas com H₂O₂ (30%), lavadas com água destilada estéril e submergidas em H₂SO₄ (98%) por 50 e 10 min para *M. atropurpureum* e *M. acutistipula* var. *ferrea*, respectivamente, para a quebra de dormência. Logo foram incubadas em placas estéreis com algodão/papel de filtro úmido por 48-72 h até a emissão da radícula, quando foram transferidas às garrafas.

Foram incluídos também no experimento, controles com baixo teor de N (5.25 g L⁻¹): C(↓N); dose completa de Nitrogênio (52.5 g L⁻¹): C(+N); e com baixo teor de N e inoculados com estirpes nodulíferas eficientes: C(UFLA 04-212): *Bradyrhizobium brasilense* Costa et al., 2017 para *M. atropurpureum* e C(BR 3460): *Burkholderia* sp. para *M. acutistipula* var. *ferrea*.

O experimento foi conduzido por 40 dias (janeiro-fevereiro 2018) em casa de vegetação, no Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo do DCS-UFLA, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. No período, as temperaturas médias máxima e mínimas registradas foram 28.4 °C e 17.7 °C, respectivamente.

Eficiência relativa das comunidades bacterianas fixadoras de nitrogênio

Após o tempo estabelecido, as plantas foram coletadas, avaliando-se no momento do desmonte o nível relativo de clorofila com o equipamento portátil Minolta SPAD-502 e número

de nódulos formados (NN). Também se coletaram parte área, raiz e nódulos, os quais foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até peso constante para a determinação da massa seca de nódulos (MSN), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR). A esta última foi somada a MSN.

Além da nodulação e produção de biomassa, a eficiência relativa das comunidades bacterianas fixadoras de nitrogênio foi estimada a partir do índice de suficiência de nitrogênio (NSI) (Schepers et al 1998). Este índice é obtido da medição do nível relativo de clorofila e calculado pela equação: $NSI = \frac{SPAD_X}{SPAD_{C(+N)}}$ onde $SPAD_X$ refere-se à leitura média do clorofilômetro dos diferentes tratamentos e $SPAD_{C(+N)}$ a leitura média do clorofilômetro da condição com teor adequado de nitrogênio. O valor do índice será de 1.0 se as leituras entre tratamentos e controle C(+N) forem iguais, e diminuirá na medida em que diminuir a eficiência da FBN. O NSI para o controle C(↓N) seria o limite inferior possível nas condições avaliadas.

Isolamento, purificação e caracterização cultural das estirpes bacterianas

Para o isolamento, purificação e caracterização cultural das bactérias foram selecionados aleatoriamente dois nódulos por planta de cada repetição. Estes foram coletados, desinfetados superficialmente com álcool etílico (92.8%) por 30s, com H₂O₂ (3%) por 3min e, lavados 6 vezes com água destilada estéril. Posteriormente, foram esmagados e espalhados em placas com meio de cultura YMA (Fred & Waksman, 1928), pH = 6.8, contendo azul de bromotimol como indicador de pH. Os nódulos aqui utilizados foram recuperados, secos e incluídos na determinação da NDW.

As placas inoculadas foram incubadas a 28°C em incubadora microbiológica e, após o crescimento, colônias individuais foram replicadas em novas placas mediante passes sucessivos até garantir a pureza das mesmas. Uma vez puras as estirpes foram agrupadas culturalmente considerando a modificação ou não do pH (ácido, alcalino ou neutro) e o tempo de crescimento. O crescimento foi qualificado de rápido, intermediário, lento e muito lento para os intervalos de 0-3 dias, entre 4-5 dias, entre 6-9 e mais de 10 dias, respectivamente, de acordo com Moreira et al. (1993).

Análises moleculares

A identificação das estirpes foi realizada a partir do sequenciamento parcial do DNA ribossômico 16S utilizando-se os primers 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Lane, 1991). O DNA foi extraído de culturas bacterianas

frescas mediante lise alcalina de acordo com Niemann et al., (1997) e amplificado mediante a técnica de PCR (Mullis et al., 1986). Foram utilizados 5 μ L de DNA, 1 μ L de dNTP Mix (10mM), 5 μ L de Buffer de PCR (10X), 2.5 μ L de MgCl₂ (50mM), 1 μ L de cada primer (10mM), 0.4 μ L de Taq DNA polymerase (5U μ L⁻¹, cellco Biotec do Brasil Ltda) e água ultrapura (Milli-Q) até completar o volume final de reação de 50 μ L. A PCR consistiu de uma desnaturação inicial por 5 min a 85°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação–anelamento–extensão de 1min 95°C–5min 55°C–1min–1min 72°C, e extensão final de 10min a 72°C. A amplificação foi conferida mediante eletroforeses em gel de agarose 0.8% de 5 μ L dos produtos da reação, em tampão Tris-EDTA (1X) por 45 min, utilizando-se Neotaq Brilliant Green Plus DNA Stain (0.04 μ L mL⁻¹ de gel) para a visualização das bandas. Então, o material restante (45 μ L) foi liofilizado e enviado ao laboratório Wemseq (Curitiba-PR-Brasil) onde foram purificadas (EXOL/SAP-Fermentas) e sequenciadas mediante sequenciamento Sanger (Sanger et al., 1977) utilizando-se o equipamento 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher). As sequências obtidas foram montadas e editadas utilizando o programa BioNumerics, versão 7.6 (Applied Maths, Austin, TX, EUA), e posteriormente analisadas mediante o serviço de identificação de EzBioCloud (Yoon et al., 2017), por comparação com bases de dados de sequências confiáveis e de qualidade, considerando apenas nomes válidos de espécies e estirpes tipo. As sequências obtidas estão ainda pendentes de depósito no GenBank.

Uma vez identificadas, foi realizada a PCR para o gene *nodD1* das estirpes potencialmente nodulíferas usando-se os primers *nodD7f* (5' GATYGTTCATGAAATCKGAGAG 3') e *aboxp2* (5' TCGATAGAANACATCCACACGAT 3') (Sterner & Parker, 1999). O mix de reação foi o mesmo utilizado para a amplificação do 16S e a PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 30s a 90°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação–anelamento–extensão de 30s 94°C–1min 53°C–30s 72°C e extensão final de 5min a 72°C. Foram amplificados também estirpes de gêneros nodulíferos do próprio experimento, sendo também conferido mediante eletroforeses em gel de agarose.

Analises de dados

Prévio às análises estatística foi verificada a normalidade e homocedasticidade dos dados mediante os testes de Jarque-Bera e Levene, respectivamente. Foi necessária a transformação $\sqrt{x + 1}$ para as variáveis NN e MSN, e $1/x$ para MSPA, MSR e MST para cumprir as premissas das análises paramétricas. Posteriormente foram analisadas mediante ANOVA e testes post-hoc de Scott-Knott a $p < 0.05$.

RESULTADOS

Eficiência relativa das comunidades bacterianas fixadoras de nitrogênio

Verificou-se ausência de nodulação para os controles C(+N) e C(↓N) em ambas espécies, e nodulação para o controle C(UFLA 04-212) em *M. atropurpureum*, indicando que as condições experimentais foram tanto assépticas, quanto apropriadas para a nodulação. No experimento com *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* não houve nodulação no controle C(BR 3460), nem nos tratamentos com solo inóculo. Portanto, os resultados e avaliações limitaram-se à captura com *M. atropurpureum*.

Foi obtida nodulação a partir do solo dos três ecossistemas avaliados, não se encontrando diferenças significativas no NN e MSN entre eles, nem com o controle C(UFLA 04-212) (Tabela 2). No entanto, houve variação na nodulação dentro das áreas. Especificamente no A-II, a nodulação concentrou-se em uma das parcelas com uma média de 74.67 nódulos, 1.35 vezes mais que no controle C(UFLA 04-212), enquanto foi muito baixa nas duas restantes.

Na produção de biomassa vegetal (MSR, MSPA, MST) o controle C(+N) foi muito superior aos restantes tratamentos. A MST foi baixa e semelhante entre as áreas e os controles C(↓N) e C(UFLA 04-212), entretanto MSR e MSPA, também baixas, variaram em alguns casos. A razão MSR/MSPA diferenciou C(+N), C(UFLA 04-212) e A-II de NO-II, S-IV e C(↓N) e, a leitura do SPAD os controles C(+N) e C(UFLA 04-212) dos restantes tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios ± SE das variáveis número de nódulos (NN), massa seca de nódulos (MSN), massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca total (MST), razão massa seca de raiz: massa seca da parte aérea (MSR/MSPA) e leitura do clorofilômetro (SPAD_{valor}) do experimento de captura de BFNNL com *M. atropurpureum* nas áreas de floresta ombrófila Arenito II (A-II), Noroeste II (NO-II) e Sul IV (S-IV).

TREATMENT	NN	MSN	MSR	MSPA	MST	MSR/MSPA	SPAD _{valor}
	-g.....				-	-
C(+N)	0	-	0.53±0.04a	0.87±0.0045a	1.4±0.04a	0.61±0.05b	37.75±3.42a
C(↓N)	0	-	0.16±0.0029b	0.12±0.01c	0.28±0.0038b	1.41±0.1a	13.82±0.14b
C(UFLA 04-212)	55.5±0.29	0.04±0.0027	0.13±0.0027c	0.21±0.02b	0.33±0.01b	0.63±0.07b	34.18±1.32a
A-II	25.56±24.56	0.04±0.02	0.17±0.03b	0.26±0.07b	0.43±0.08b	0.77±0.23b	23.71±6.66b
NO-II	1.22±0.78	0.00057±0.00028	0.14±0.01c	0.13±0.01c	0.26±0.01b	1.12±0.11a	17.18±1.64b
S-IV	1.61±0.96	0.01±0.01	0.17±0.0012b	0.15±0.01c	0.32±0.01b	1.12±0.06a	19.96±3.23b

Letras diferentes representam diferenças significativas a $p < 0.05$ para o teste de Scott-Knott.

O índice de suficiência de nitrogênio (ISN) foi de 0.37, 0.91, 0.63, 0.46 e 0.53 para os tratamentos C(↓N), C(UFLA 04-212), A-II, NO-II e S-IV, respectivamente. O valor obtido de C(UFLA 04-212), próximo da unidade, indica que a estirpe controle utilizada é eficiente na fixação do N₂, independente da baixa produção de biomassa. Dentre as comunidades das áreas, a A-II mostrou maior ISN, embora os valores obtidos foram baixo para as três áreas.

De modo geral a comunidade bacteriana de A-II destacou-se por ser semelhante à estirpe eficiente C(UFLA 04-212) na produção de biomassa. Também mostrou os melhores valores em modulação, produção de biomassa e ISN quando comparada com NO-II e S-IV.

Caracterização cultural e identificação das estirpes isoladas

Foram isolados um total de 52 estirpes bacterianas, 32 em A-II, 12 em NO-II e oito em S-IV. Estas distribuíram-se em seis grupos culturais: crescimento rápido & acidificação do meio (RA), crescimento rápido & alcalinização do meio (RB), crescimento rápido & sem modificação do pH do meio (RN), crescimento intermediário & acidificação do meio (IA), crescimento intermediário & alcalinização do meio (IB) e crescimento lento & alcalinização do meio (SB). Em geral predominou o grupo cultural IB seguido de RB, porém houve variação dentro das áreas. Em A-II identificaram-se cinco grupos culturais com predomínio de IB e RA em igual proporção. Quatro grupos foram encontrados em NO-II e em S-IV, predominando LB e IB, respectivamente (**Figura 1a**).

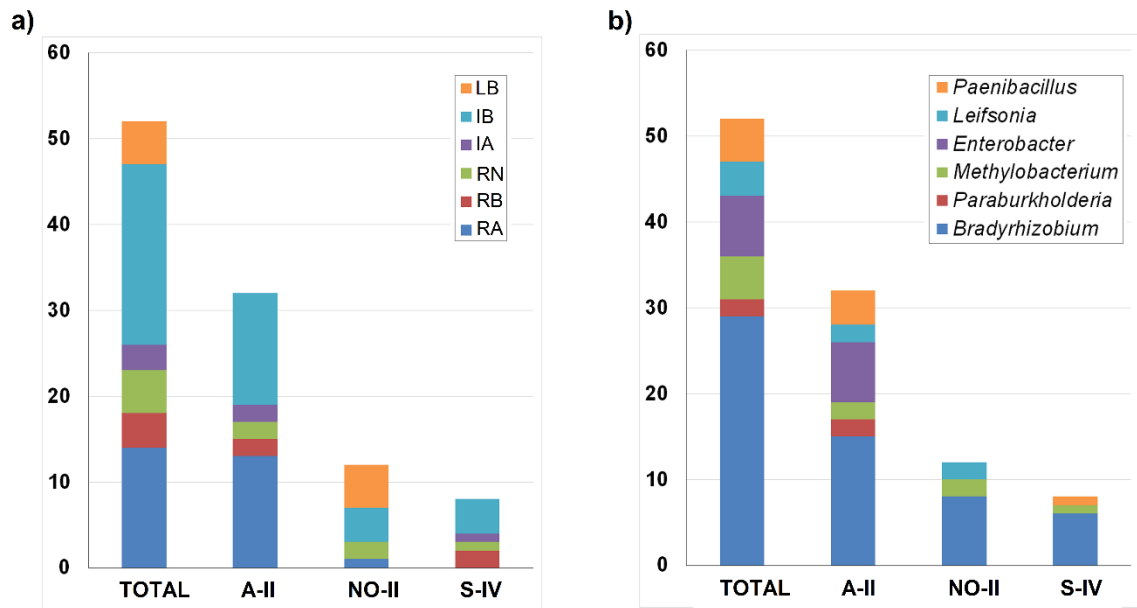


Figura 1. Distribuição de grupos culturais (a) e gêneros bacterianos identificados por sequenciamento parcial do 16S rDNA (b) nas Florestas Ombrófilas de Arenito II (A-II), Noroeste II (NO-II) e Sul IV (S-IV). Grupos culturais: RA (crescimento rápido & acidificação do meio), RB (crescimento rápido & alcalinização do meio), RN (crescimento rápido & sem modificação do pH do meio), IA (crescimento intermediário & acidificação do meio), IB (crescimento intermediário & alcalinização do meio) e LB (crescimento lento & alcalinização do meio).

Foram obtidas sequências de qualidade do 16S rDNA entre 723 e 1407pb, correspondendo-se entre 51.6 e 97% do gene amplificado (Tabela 3). Identificaram-se a nível de gênero todas as estirpes isoladas, com similaridade entre 95.5 e 100% com espécies tipos de referência. Em todas as áreas o principal gênero nodulífero encontrado foi *Bradyrhizobium*. Foram identificados ademais representantes dos gêneros potencialmente nodulíferos *Methylobacterium* nas três áreas, e *Paraburkholderia*, apenas no A-II. A presença do gene de nodulação *nodDI* foi confirmada apenas nos isolados de *Paraburkholderia*, além dos *Bradyrhizobium* (Figura 2). Outras bactérias não nodulíferas dos gêneros *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Leifsonia* também foram registradas, estando todos presentes no Arenito, apenas *Leifsonia* no NO-II e *Paenibacillus* no S-IV (Figura 1b, Tabela 3).

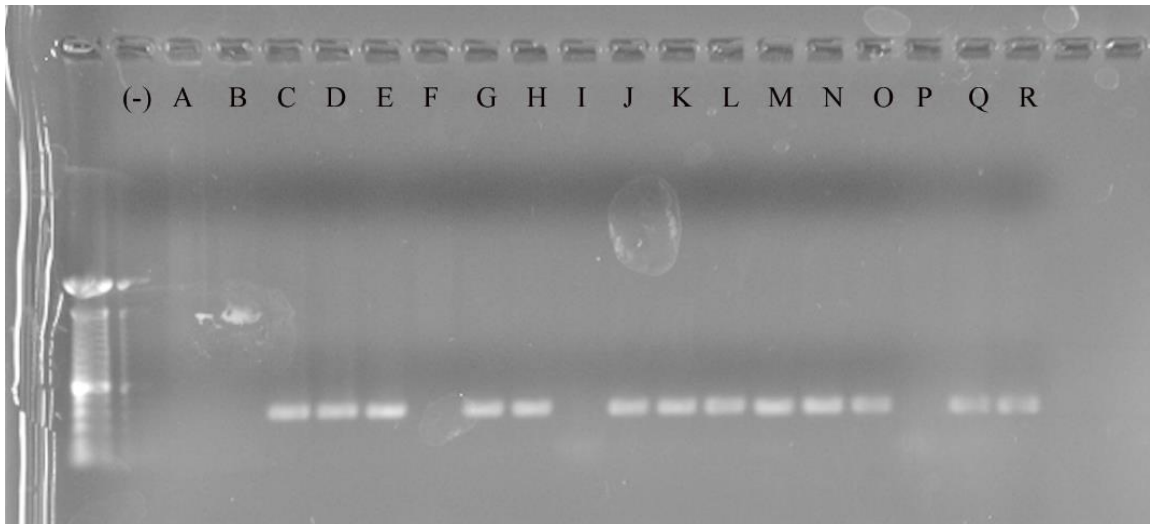


Figura 2. Visualização dos produtos da PCR do *nodD1* em gel de agarose (0.8%) para as estirpes UFLA 04-885 (A), UFLA 04-882 (B), UFLA 04-858 (C), UFLA 04-870 (D), UFLA 04-890 (E), UFLA 04-891(F), UFLA 04-892 (G), UFLA 04-894 (H), UFLA 04-898 (I), UFLA 04-899 (J), UFLA 04-867 (K), UFLA 04-900 (J), UFLA 04-902 (L), UFLA 04-904 (M), UFLA 04-906 (N), UFLA 04-903 (P), UFLA 04-856 (Q) e UFLA 04-857 (R).

Com exceção de UFLA 04-890 e UFLA 04-902 que se relacionaram com apenas *B. erythrophlei* e *B. elkanii*, respetivamente, as restantes estirpes de *Bradyrhizobium* mostraram igual similaridade com mais de uma espécie tipo (Tabela 3, Anexo 1). Tal é o caso extremo das estirpes UFLA 04-870, UFLA 04-896, UFLA 04-900, UFLA 04-901, e UFLA 04-905 (entre 81-84.8% do gene amplificado e sequenciado e 100% de similaridade com 12 espécies diferentes. De modo semelhante as estirpes de *Enterobacter* relacionaram-se com duas espécies tipo, com exceção de UFLA 04-876 e UFLA 04-877. Os restantes gêneros identificados relacionaram-se apenas com uma espécie, sendo as pertencentes do gênero *Paenibacillus* as que mostraram menor similaridade com as estirpes tipos correspondentes (entre 95.49 e 97.17%)

Tabela 3. Estirpes bacterianas identificadas a partir do sequenciamento parcial do 16S rDNA das florestas ombrófilas da Serra Norte de Carajás. Grupos culturais a que pertencem, comprimento e percentagem amplificada do gene, bem como estirpe tipo de maior similaridade (SI). Estirpes com mais de duas espécies com igual SI foram incluído o número como supraíndice. A seleção da top-hit então refere-se à espécie primeiro descrita.

UFLA-code	Identity	Cultural Group*	Length (pb)	Completeness (%)	Top-Hit taxon name	Strain name	Accession	SI (%)
Arenito II								
UFLA 04-858	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1242	87.5	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> Kuykendall et al. 1993	USDA 76(T)	KB900701	100 ⁽³⁾
UFLA 04-859	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1265	88.7	"	"	"	99.76 ⁽³⁾
UFLA 04-860	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FB	1297	91.4	"	"	"	99.84 ⁽³⁾
UFLA 04-861	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1271	89.6	"	"	"	100 ⁽³⁾
UFLA 04-862	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1298	91.4	"	"	"	99.61 ⁽³⁾
UFLA 04-863	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1243	87.9	"	"	"	100 ⁽³⁾
UFLA 04-868	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1119	79	"	"	"	99.91 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-869	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1291	91.1	"	"	"	100 ⁽³⁾
UFLA 04-870	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1187	83.8	"	"	"	100 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-872	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1244	87.7	"	"	"	100 ⁽³⁾
UFLA 04-879	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1238	87.4	"	"	"	100 ⁽³⁾
UFLA 04-880	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1362	95.9	"	"	"	99.63 ⁽³⁾
UFLA 04-883	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FB	1352	95.5	"	"	"	99.85 ⁽³⁾
UFLA 04-884	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1238	87.4	"	"	"	100 ⁽³⁾
UFLA 04-867	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1241	87.6	<i>Bradyrhizobium huanghuaihaiense</i> Zhang et al. 2012/ <i>Bradyrhizobium stylosanthis</i> Delamuta et al. 2016	CGMCC 1.10948(T)/ BR 446	jgi.1041381/ KU724142	99.68
UFLA 04-876	<i>Enterobacter</i> sp.	FA	1387	94.4	<i>Enterobacter sichuanensis</i> Wu et al. 2018	WCHEC11597(T)	POVL01000141	99.49
UFLA 04-877	<i>Enterobacter</i> sp.	FA	1379	93.9	"	"	"	99.71
UFLA 04-866	<i>Enterobacter</i> sp.	FA	1290	87.8	<i>Enterobacter tabaci</i> Duan et al. 2015/ <i>Enterobacter sichuanensis</i> Wu et al. 2018	YIM Hb-3(T)/ WCHEC11597(T)	KP990658/ POVL01000141	99.69
UFLA 04-871	<i>Enterobacter</i> sp.	FA	1296	88	<i>Enterobacter tabaci</i> Duan et al. 2015/ <i>Enterobacter sichuanensis</i> Wu et al. 2018	YIM Hb-3(T)/ WCHEC11597(T)	KP990658/ POVL01000141	99.69
UFLA 04-873	<i>Enterobacter</i> sp.	FA	1254	85.3	<i>Enterobacter tabaci</i> Duan et al. 2015/ <i>Enterobacter sichuanensis</i> Wu et al. 2018	YIM Hb-3(T)/ WCHEC11597(T)	KP990658/ POVL01000141	99.68
UFLA 04-874	<i>Enterobacter</i> sp.	FA	1251	85.2	<i>Enterobacter tabaci</i> Duan et al. 2015/ <i>Enterobacter sichuanensis</i> Wu et al. 2018	YIM Hb-3(T)/ WCHEC11597(T)	KP990658/ POVL01000141	99.68
UFLA 04-875	<i>Enterobacter</i> sp.	FA	1285	87.5	<i>Enterobacter tabaci</i> Duan et al. 2015/ <i>Enterobacter sichuanensis</i> Wu et al. 2018	YIM Hb-3(T)/ WCHEC11597(T)	KP990658/ POVL01000141	99.69
UFLA 04-864	<i>Leifsonia</i> sp.	FA	1235	91.8	<i>Leifsonia shinshuensis</i> Suzuki et al. 2000	JCM 10591(T)	DQ232614	99.11
UFLA 04-865	<i>Leifsonia</i> sp.	FA	1313	97	"	"	"	99.62
UFLA 04-882	<i>Methylobacterium</i> sp.	FN	725	51.7	<i>Methylobacterium tarhaniae</i> Veyisoglu et al. 2013	N4211(T)	JQ864432	99.72
UFLA 04-885	<i>Methylobacterium</i> sp.	FN	729	52	"	"	"	99.73
UFLA 04-886	<i>Paenibacillus</i> sp.	IA	1279	87.1	<i>Paenibacillus aestuarii</i> Bae et al. 2010	CJ25(T)	EU570250	95.49
UFLA 04-887	<i>Paenibacillus</i> sp.	IA	1114	78.3	"	"	"	96.3

UFLA 04-878	<i>Paenibacillus</i> sp.	FA	1308	88.7	<i>Paenibacillus soli</i> Park et al. 2007	DCY03(T)	DQ309072	97.15
UFLA 04-881	<i>Paenibacillus</i> sp.	FA	1407	92.4	"	"	"	96.77
UFLA 04-856	<i>Paraburkholderia</i> sp.	FA	1278	87.8	<i>Paraburkholderia sabiae</i> (Chen et al. 2008) Sawana et al. 2014	Br3407(T)	AY773186	99.45
UFLA 04-857	<i>Paraburkholderia</i> sp.	FA	1278	87.7	"	"	"	99.61
Noroeste II								
UFLA 04-892	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1200	84.6	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> Kuykendall et al. 1993	USDA 76(T)	KB900701	100 ⁽³⁾
UFLA 04-893	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1207	85	"	"	"	99.92 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-896	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SB	1161	82.1	"	"	"	100 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-899	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1301	91.4	"	"	"	99.77 ⁽³⁾
UFLA 04-890	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SB	1291	95.9	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> Yao et al. 2015	CCBAU 53325(T)	KF114645	100
UFLA 04-894	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SB	1191	84.4	"	"	"	100 ⁽⁴⁾
UFLA 04-895	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SB	1240	87.1	"	"	"	99.92 ⁽⁴⁾
UFLA 04-897	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	SB	1249	88	"	"	"	100 ⁽⁴⁾
UFLA 04-888	<i>Leifsonia</i> sp.	FA	1239	92	<i>Leifsonia shinshuensis</i> Suzuki et al. 2000	JCM 10591(T)	DQ232614	99.35
UFLA 04-889	<i>Leifsonia</i> sp.	FA	1194	88.8	"	"	"	99.58
UFLA 04-898	<i>Methylobacterium</i> sp.	FN	750	53.3	<i>Methylobacterium platani</i> Kang et al. 2007	PMB02(T)	LWHQ01000067	99.6
UFLA 04-891	<i>Methylobacterium</i> sp.	FN	723	51.6	<i>Methylobacterium tarhaniae</i> Veyisoglu et al. 2013	N4211(T)	JQ864432	99.72
Sul IV								
UFLA 04-900	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FB	1147	81	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> Kuykendall et al. 1993	USDA 76(T)	KB900701	100 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-901	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1193	84.4	"	"	"	100 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-902	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1297	91.4	"	"	"	99.77 ⁽³⁾
UFLA 04-904	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FB	1240	87.5	"	"	"	99.84 ⁽³⁾
UFLA 04-905	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1201	84.8	"	"	"	100 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-906	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IB	1142	80.9	"	"	"	99.74 ⁽¹¹⁾
UFLA 04-903	<i>Methylobacterium</i> sp.	FN	730	52	<i>Methylobacterium tarhaniae</i> Veyisoglu et al. 2013	N4211(T)	JQ864432	99.73
UFLA 04-907	<i>Paenibacillus</i> sp.	IA	784	53.5	<i>Paenibacillus esterisolvans</i> Zhao et al. 2018	CFH S0170(T)	KP232905	95.63

* Grupos Culturais: FA – crescimento rápido & acidificação do médio, FB – crescimento rápido & alcalinização do médio, FN – crescimento rápido & sem modificação do pH, IA – crescimento intermediário & acidificação do médio, IB – crescimento intermediário & alcalinização do médio, SB – crescimento lento & alcalinização do médio

DISCUSSÃO

O presente estudo permitiu caracterizar cultural e geneticamente BFN simbióticas e bactérias endofíticas dos nódulos de três floresta ombrófilas pristinas da Amazônia Paraense.

Contrário ao esperado, não houve nodulação em *M. acutistipula* var. *férrea* a partir do controle C(BR 3460) nem do solo inoculado, mostrando sua ineficiência na captura de BFNNL no presente estudo. Na literatura é amplamente referida a capacidade de nodulação da espécie (Assis Junior et al., 1986; Ferreira et al., 2012; Chen et al., 2008; Pires et al., 2018), porém a variedade aqui utilizada não nodulou. Por sua vez, Borges et al., (2016), em experimentos de captura utilizando *M. acutistipula*, referida previamente pelo autor como mimosa de canga (ver Borges, 2010), também não constataram nodulação. Em ambos casos é possível que se tenha utilizado a mesma variedade, sendo necessário estudos confirmatórios do seu *status* nodulífero a partir de amostras de campo e/ou experimentos de avaliação de especificidade. Pertinente a isto último Andrews & Andrews (2017) assinalam que embora seja amplamente relatada a promiscuidade do gênero *Mimosa*, isso se refere especificamente a umas poucas espécies com ampla distribuição, o que pode não refletir a situação para a maioria das *Mimosa* spp. Estas pelo geral são endêmicas e de distribuição restrita, tendo-se observado uma alta especificidade com diferentes gêneros de rizóbio, dependendo da região de ocorrência (Andrews & Andrews, 2017).

Por sua parte *M. atropurpureum* permitiu a captura de BFNNL nas três áreas avaliadas, corroborando uma vez mais sua promiscuidade e eficiência como planta isca. A produção de biomassa nas plantas com adubação adequada de N foi superior aos restantes tratamentos, incluindo o controle inoculado. Levando em consideração que o estabelecimento da simbiose tem um alto custo energético para o hospedeiro (Minchin & Witty, 2005), o menor crescimento das plantas noduladas, poderia também ser reflexo disso, sobretudo durante as primeiras etapas de crescimento, período de avaliação do experimento. Entretanto, a relação RDW/SDW semelhante entre os controles C(+N), C(UFLA 04-212) e A-II indica um balanço adequado e semelhante no crescimento vegetal, independente dos valores absolutos de ambas variáveis.

A forte relação positiva entre o teor de clorofila e a concentração de N nas folhas é base utilizada para predizer o *status* de N das culturas (Schepers, 1998). Nesse contexto o ISN permitiu inferir a eficiência relativa da FBN das comunidades nativas e da estirpe controle inoculada utilizando o C(+N) como referência. A eficiência na FBN foi ótima para controle C(UFLA 04-212), onde a estirpe inoculada conseguiu atender a demanda de N da planta de

maneira semelhante ao C(+N), enquanto as comunidades nativas foram menos eficientes para esta variável.

As comunidades bacterianas isoladas das três florestas diferiram numérica, cultural e geneticamente, devido provavelmente às particularidades de cada ecossistema. As melhores condições edáficas do A-II poderiam ter favorecido a maior diversidade, enquanto altos teores de Al e metais (Mn, Zn e Cu) nas áreas NO-II e S-IV, respectivamente, podem ter sido fatores limitantes. Do mesmo modo, essas características constituem um importante fator de seleção, o qual pode ser explorado positivamente em estudos posteriores de avaliação e aplicação das estirpes em condições semelhantes.

O principal gênero nodulífero identificado nas três áreas de estudo foi *Bradyrhizobium*, o qual tem sido amplamente relatado em ecossistemas brasileiros amazônicos, tanto a partir de culturas armadilhas (Lima et al., 2009; Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013; Borges et al., 2016) quanto diretamente de nódulos de campo (Moreira et al., 1993; 1998; Zilli et al., 2014). Do mesmo modo, *Paraburkholderia* spp. (comb. nov., valid name) previamente referidas com *Burkholderia* spp. (ver Sawana et al., 2014, Oren & Garrity, 2015), têm sido registradas em diferentes ecossistemas da Amazônia ocidental (Barberi, 2007; Lima et al., 2009, Guimarães et al 2012), sendo aqui encontrados apenas dois isolados em A-II. Já *Methylobacterium* spp., que no presente trabalho foram identificados nos três ecossistemas, tem sido raramente referido neste tipo de estudo na região (Moreira, 2006).

Em gêneros como *Bradyrhizobium* todas as espécies são capazes de induzir nodulação, enquanto em outros é restrita a algumas espécies (Sprent, 2009). Portanto a capacidade de nodulação nesses gêneros precisa ser confirmada, seja experimentalmente ou por amplificação dos genes relacionados. No presente estudo os isolados de *Paraburkholderia* amplificaram o *nodD1*, indicando serem nodulíferos, contrário do observado nos isolados de *Methylobacterium*. Embora a existência de numerosos fatores de nodulação, cuja presença e expressão não é universal para todas as bactérias nodulíferas, o *nodD* é um regulador transcricional comum. Especificamente, o *nodD1* é necessário para a indução dos demais genes nod na presença do sinal específico emitido pela planta (Ferguson, 2017). Portanto, sua ausência nos isolados de *Methylobacterium* é indicativo da sua incapacidade de nodulação. Finalmente, a comunidade de BFN simbióticas da área A-II foi formada por *Bradyrhizobium* e *Paraburkholderia*, enquanto as de NO-II e S-IV apenas por *Bradyrhizobium*.

A quantidade de nódulos formados, e conseqüentemente a de bactérias nodulíferas isoladas no presente estudo, é baixa em comparação a agroecossistemas e/ou florestas secundárias amazônicas, onde maior diversidade tem se reportado para as áreas perturbadas e/ou modificadas (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2009; Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013; Borges et al., 2016). De fato, a menor FBN nas florestas tropicais pristinas é largamente reconhecido, atribuindo-se principalmente à eficiente ciclagem e acúmulo de N, bem como ao grande desbalanço N/P existentes no solo (Moreira & Franco, 1994; Hedin et al., 2009; Reed et al., 2010). Contudo, tem-se identificado *hotspots* de FBN em florestas ombrófilas primárias, com alta atividade e diversidade de BFN, independente da disponibilidade de N (Reed et al., 2010). Este poderia ser o caso de uma das parcelas de A-II, onde houve alta nodulação, incluso superior ao controle inoculado.

De maneira semelhante às BFNNL, a diversidade de bactérias endofíticas das três áreas foi baixa, com destaque uma vez mais de A-II. Representes de *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Leifsonia* têm sido comumente isolados de nódulos de leguminosas (Lima et al., 2009; Castro et al., 2017; De Meyer et al., 2015), enquanto de *Methylobacterium* são menos comuns (Moreira, 2006; Silva, 2018). Um aspecto importante acerca da coexistência de rizóbios e endófitos dos nódulos foi assinalado por De Meyer et al., (2015) a partir de avaliações em várias leguminosas e eco-regiões de Flanders-Bélgica. Estes autores observaram correlação na presença de determinados rizóbios e endófitos, sugerindo que esta não é acidental. Por outro lado, Zgadzaj et al., (2015) comprovaram experimentalmente a seletividade de *Mesorhizobium loti*, simbionte natural de *Lotus*, por determinados endófitos, sendo apenas eles capazes de colonizar e se multiplicar no nódulo junto a seu parceiro. Interações rizóbios e endófitos não simbióticos representam um importante campo de pesquisa e aplicação existindo já resultados experimentais positivos de inoculação conjunta (Ferreira et al., 2018).

CONCLUSÕES

Nosso estudo proporciona conhecimentos preliminares acerca das comunidades de BFNNL e endofíticas dos nódulos em solos ferríferos de três áreas de floresta ombrófila densa da Amazônia oriental brasileira. Em geral o número de isolados obtidos foi baixo nas três florestas, destacando-se Arenito II por ser a mais eficiente e diversa tanto cultural como geneticamente. Isto deveu-se provavelmente a suas melhores condições edáficas e a identificação de uma das suas parcelas como *hotspot* de FBN. Os grupos culturais

predominantes no estudo foram IB seguido de RB, porém com variações dentro das áreas. Em Arenito II predominou IB e RA em igual proporção, em Noroeste II e Sul IV foram LB e IB, respectivamente. Os gêneros nodulífero e endofítico predominantes foram *Bradyrhizobium* e *Methylobacterium*, respectivamente. Registraram-se ademais *Paraburkholderia* (nodulífera) e *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Leifsonia* (endofíticas) em Arenito II, *Leifsonia* em Noroeste II e *Paenibacillus* em Sul IV. Dispõe-se finalmente, de 31 estirpes nodulíferas e 21 endofíticas em coleção para futuras investigações.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao programa PEC-PG CAPES pela bolsa à primeira autora, ao ITV/VALE pela parceria nos estudos, e à estudante de iniciação científica Daniela Pedroso pela sua ajuda no desmonte experimento.

REFERENCIAS

- Alvarez, V. H., Novais, R. F., Barros, N. F., Cantarutti, R. B., & Lopes, A. S. (1999). Interpretação dos resultados das análises de solos. In: A. C. Ribeiro et al. (Eds.), *Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais- Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes 1999 em Minas Gerais - 5ª Aproximação*. Viçosa, MG.
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(705). DOI: 10.3390/ijms18040705
- Assis Júnior, R. N. D., Almeida, R. T. D., & Vasconcelos, I. (1986). Testes Preliminares De Inoculação Cruzada Em Leguminosas Arbóreas Do Ceará. *Ciência Agrônômica*, 17(2), 107-111.
- Barberi, A. (2007). *Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferenres sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental*. Unpublished Tese de Doutorado, UFLA, Lavras.
- Borges, W. L. (2010). *Diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Simbióticas em Áreas de Mineração de Bauxita com diferentes idades de Revegetação*. Tese de Doutorado, UFRRJ, Seropédica.
- Borges, W. L., Prin, Y., Ducouso, M., Roux, C. L., & Faria, S. M. d. (2016). Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 314-321. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.01.009
- Bouyoucos, G. J. (1927). The hydrometer as a new method for the mechanical analysis of soils. *Soil Science*, 23(5), 343-354. DOI: 10.1097/00010694-192705000-00002
- Carmo, F. F. D., & Kamino, L. H. Y. (Eds.). (2015). *Geossistemas Ferruginosos Do Brasil Áreas Prioritárias Para Conservação Da Diversidade Geológica E Biológica, Patrimônio Cultural E Serviços Ambientais*. Belo Horizonte.
- Castro, J. L. d., Souza, M. G., Rufini, M., Guimarães, A. A., Rodrigues, T. L., & Moreira, F. M. d. S. (2017). Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 41. DOI: 10.1590/18069657rbc20160525
- Chen, W.-M., Faria, S. M. d., Chou, J.-H., James, E. K., Elliott, G. N., Sprent, J. I., et al. (2008). *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 2174-2179. DOI: 10.1099/ij.s.0.65816-0
- CNCFlora. 2012. *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: [http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Mimosa_acutistipula var. ferrea](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Mimosa_acutistipula_var_ferrea). Accessed on 4 January 2019
- De Meyer, S. E., Beuf, K. D., Vekeman, B., & Willems, A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology & Biochemistry*, 83, 1-11. DOI: 10.1016/j.soilbio.2015.01.002

Ducke, A., & Black, G. A. (1954). Notas sobre a fitogeografia da Amazônia Brasileira. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*.

EMBRAPA. (2017). *Manual de métodos de análise de solo* (3. ed. rev. e ampl ed.). Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Solos/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Faria, S. M. d., Diedhiou, A. G., Lima, H. C. d., Ribeiro, R. D., Galiana, A., Castilho, A. F., et al. (2010). Evaluating the nodulation status of leguminous species from the Amazonian forest of Brazil. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3119-3127. DOI: 10.1093/jxb/erq142

Ferguson, B. J. (2017). Rhizobia and Legume Nodulation Genes. *Reference Module in Life Sciences*. DOI: 10.1016/b978-0-12-809633-8.07071-0

Ferreira, L. d. V. M., Carvalho, F. d., Andrade, J. F. C., & Moreira, F. M. S. (2018). Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland. *Scientia Agricola*, 75 (6), 461-469. DOI: 10.1590/1678-992x-2017-0049

Ferreira, P. A. A., Bomfeti, C. A., Júnior, R. d. S., Soares, B. L., Soares, C. R. F. S., & Moreira, F. M. d. S. (2012). Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(1), 85-95. DOI: 10.1590/S0100-204X2012000100012.

Fred, E. B., & Waksman, S. A. (1928). *Laboratory manual of general microbiology, with special reference to the microorganisms of the soil*. McGraw-Hill, New York.

Gehring, C., Vlek, P. L. G., Souza, L. A. G. d., & Denich, M. (2005). Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 111, 237-252. DOI: 10.1016/j.agee.2005.06.009

Guimarães, A. A., Jaramillo, P. M. D., Nóbrega, R. S. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., & Moreira, F. M. d. S. (2012). Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6726–6733. DOI: 10.1128/AEM.01303-12

Hedin, L. O., Brookshire, E. N. J., Menge, D. N. L., & Barron, A. R. (2009). The Nitrogen Paradox in Tropical Forest Ecosystems. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 613-635. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110246

Hesse, E., O'Brien, S., Tromas, N., Bayer, F., Luján, A. M., van Veen, E. M., et al. (2018). Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination. *Ecology Letters*, 21(1), 117-127. DOI: 10.1111/ele.12878

Hoagland, D. R., & Arnon, D. L. (1950). The water culture methods for growing plants without soil., *Bulletin 347* (pp. 32). Berkeley, California Agriculture Experiment Station.

IBAMA. (2003). *Plano De Manejo Para Uso Múltiplo Da Floresta Nacional De Carajás*: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

ICMBio. (2016). *Plano De Manejo Da Floresta Nacional De Carajás: Volume II - Planejamento*: Ministério do Meio Ambiente, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

Jaramillo, P. M. D., Guimarães, A. A., Florentino, L. A., Silva, K. B., Nóbrega, R. S. A., & Moreira, F. M. S. (2013). Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. *Scientia Agricola*, 70(6), 397-404. DOI: 10.1590/S0103-90162013000600004

Jesus, E. C., Moreira, F. M. d. S., Florentino, L. A., Rodrigues, M. I. D., & Oliveira, M. S. d. (2005). Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesquisa. Agropecuária. Brasileira*, 40(8), 769-776. DOI: 10.1590/S0100-204X2005000800006.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: E. Stackebrandt, & M. Goodfellow M. (Eds.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. 5:115-175.

Lima, A. S., Nóbrega, R. S. A., Barberi, A., Silva, K. d., Ferreira, D. F., & Moreira, F. M. d. S. (2009). Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). *Plant Soil*, 319, 127-145. DOI: 10.1007/s11104-008-9855-2

Longatti, S. M. d. O., Marra, L. M., & Moreira, F. M. d. S. (2013). Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. *African Journal of Microbiology Research*, 7(11), 948-959. DOI: 10.5897/AJMR12.1055

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (Eds.). (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.): Pearson Education, Inc.

Magalhães, F. M. M., & Silva, M. F. (1987). Associações *Rhizobium* - Leguminosas no Estado de Rondônia. *Acta Amazonica*, 17(1), 7-18. DOI: 10.1590/1809-43921987175017

Marra, L. M., Oliveira, S. M. d., Soares, C. R. F. S., & Moreira, F. M. d. S. (2011). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, 68(5), 603-609. DOI: 10.1590/S0103-90162011000500015

Minchin, F. R., & Witty, J. F. (2005). Respiratory/Carbon Costs of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes. In: H. Lambers & M. Ribas-Carbo (Eds.), *Plant Respiration* (pp. 195-205). Springer.

MMA/SBF. (2002). *Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros*. Brasília, DF.

Moreira, F. M. D. S., Silva, M. F. D., & Faria, S. M. D. (1992). Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytologist*, 121, 563-570. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1992.tb01126.x

Moreira, F. M. S. (2006). Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating Bacteria. In: F. M. S. Moreira et al., (Eds.), *Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems* (pp. 237-270). CABI Publishing.

- Moreira, F. M. S., & Siqueira, J. O. (Eds.). (2006). *Microbiologia e Bioquímica do Solo* (2da ed.). Lavas, MG: UFLA.
- Moreira, F. M. S., Franco, A. A. (1994). Rhizobia-host interactions in tropical ecosystems in Brazil. In: J. I. Sprent; D. McKey. (Eds). *Advances in legume Systematics: The Nitrogen factor*. 1ªed. Kew: The Royal Botanic Gardens, (5): 63-74.
- Moreira, F. M. S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., & Franco, A. A. (1993). Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(1), 135-146. DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80258-4
- Moreira, F. M. S., Haukka, K., & Young, J. P. W. (1998). Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology*, 7, 889-895. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00411.x
- Moreira, F.M.S. (2008). Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating Bacteria. In: F. M. S. Moreira et al. (Eds.), *A Handbook of Tropical Soil Biology. Sampling and Characterization of Below-ground Biodiversity* (pp. 107-129). Earthscan.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(0), 263-273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032
- MYERS, N. (1988). Threatened Biotas: "Hot Spots" in Tropical Forests *The Environmentalist*, 8(3), 187-208. DOI: 10.1007/BF02240252
- Niemann, S., Pühler, A., Tichy, H. V., Simon, R., & Selbitschka, W. (1997). Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural Rhizobium meliloti population. *Journal of Applied Microbiology*, 82(4), 477-484. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1997.00141.x
- Oren, A., & Garrity, G. M. (2015). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2017-2025. DOI: 10.1099/ijs.0.000317
- Pires, R. d. C., dos Reis Junior, F. B., Zilli, J. E., Fischer, D., Hofmann, A., James, E. K., et al. (2018). Soil characteristics determine the rhizobia in association with different species of Mimosa in central Brazil *Plant Soil*, 423, 411-428. DOI: 10.1007/s11104-017-3521-5
- Reed, S. C., Townsend, A. R., Cleveland, C. C., & Nemergut, D. R. (2010). Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia*, 164, 521-531. DOI: 10.1007/s00442-010-1649-6
- Rogers, N. J., Carson, K. C., Glenn, A. R., Dilworth, M. J., Hughes, M. N., & Poole, R. K. (2001). Alleviation of aluminum toxicity to *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* by the hydroxamate siderophore vicibactin. *BioMetals*, 14(1), 59-66. DOI: 10.1023/A:1016691301330

Sadowsky, M. J., Graham, P. H., & Sugawara, M. (2013). Root and Stem Nodule Bacteria of Legumes. In: E. Rosenberg et al., (Eds.), *The Prokaryotes-Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations* (401-425). Springer.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74(12), 5463-5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463

Sawana, A., Adeoluand, M., & Gupta, R. S. (2014). Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen.nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics*, 5. DOI: 10.3389/fgene.2014.00429

Schalk, I. J., Hannauer, M., & Braud, A. (2011). New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, 13(11), 2844-2854. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x

Schepers, J. S., Blackmer, T. M., Francis, D. D. (1998). Chlorophyll Meter Method for Estimating Nitrogen Content in Plant Tissue. In: Y. P. Kalra (Eds.). *Handbook of reference methods for plant analysis* (129-135). Boca Raton Boston London New York Washington, D.C: CRC Press.

Silva, A. O. 2018. *Soil quality indicators showed recovery of an iron mining area compared to adjacent phytophysionomies*. Unpublished Tese de Doutorado, UFLA, Lavras.

Sistani, N. R., Kaul, H.-P., Desalegn, G., & Wienkoop, S. (2017). Rhizobium Impacts on Seed Productivity, Quality, and Protection of *Pisum sativum* upon Disease Stress Caused by *Didymella pinodes*: Phenotypic, Proteomic, and Metabolomic Traits. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1961. DOI: 10.3389/fpls.2017.01961

Sprent, J. I. (2009). *Legume Nodulation: A Global Perspective*. Wiley-Blackwell.

Sterner, J. P., & Parker, M. A. (1999). Diversity and Relationships of Bradyrhizobia from *Amphicarpaea bracteata* Based on partial nod and Ribosomal Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 387-392. DOI: 10.1016/S0723-2020(99)80047-2

ter Steege H., & ATDN (Amazon Tree Diversity Network: collective author) and RAINFOR (The Amazon Forest Inventory Network: collective author). Contribution of current and historical processes to patterns of tree diversity and composition of the Amazon. (2010). In: Hoorn, C., & Wesselingh, F. P. (Eds.), *Amazonia: Landscape and Species Evolution: A Look into the Past* (pp. 346-359). Willey Blackwell.

Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An Examination Of The DEGTJAREFF Method For Determining Soil Organic Matter, And A Proposed Modification Of The Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*, 37(1), 29-38. DOI: 10.1097/00010694-193401000-00003

Wall, D. H., Bardgett, R. D., Behan-Pelletier, V., Herrick, J. E., Jones, T. H., Ritz, K., et al. (Eds.). (2012). *Soil Ecology and Ecosystem Services*: Oxford University Press.

Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., et al. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-

genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 1613-1617. DOI: 10.1099/ijsem.0.001755

Zahir, Z. A., Shah, M. K., Naveed, M., & Akhter, M. J. (2010). Substrate-Dependent Auxin Production by *Rhizobium phaseoli* Improves the Growth and Yield of *Vigna radiata* L. Under Salt Stress Conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 20(9), 1288-1294. DOI: 10.4014/jmb.1002.02010

Zgadzaj, R., James, E. K., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D. B., et al. (2015). A Legume Genetic Framework Controls Infection of Nodules by Symbiotic and Endophytic Bacteria. *PLOS Genetics*. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005280

Zilli, J. E., Baraúna, A. C., Silva, K. d., Meyer, S. E. D., Farias, E. N. C., Kaminski, P. E., et al. (2014). *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrobium paraense*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3950-3957. DOI: 10.1099/ijs.0.065458-0

ANEXO

Anexo 1. Estirpes de *Bradyrhizobium* identificadas a partir do sequenciamento parcial do 16S rDNA com mais de dois espécies tipos relacionadas com igual percentagem de similaridade.

STRAIN/UFLA CODE	Rank	Hit Names	Strain	Accession	SI (%)
UFLA 04-858, UFLA 04-859, UFLA 04-860, UFLA 04-861, UFLA 04-862, UFLA 04-863, UFLA 04-869, UFLA 04-872, UFLA 04-879, UFLA 04-880, UFLA 04-883, UFLA 04-884, UFLA 04-892, UFLA 04-899, UFLA 04-902, UFLA 04-904	1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> Kuykendall et al. 1993	USDA 76	KB900701	100
	2	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> Ramírez-Bahena et al. 2009	PAC 48	LFIQ01000091	100
	3	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> Delamuta et al. 2015	SEMIA 6148	LFLZ01000084	100
	4	<i>Bradyrhizobium ripae</i> Bünger et al. 2999	WR4	MF593081	100
UFLA 04-895, UFLA 04-897	1	<i>Bradyrhizobium jicamae</i> Ramírez-Bahena et al. 2009	PAC68	LLXZ01000092	99.91863303
	2	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> Delamuta et al. 2015	SEMIA 6208	LFIP01000119	99.91863303
	3	<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> Helene et al. 2015	SEMIA 690	LGTB01000028	99.91863303
	4	<i>Bradyrhizobium mercantei</i> Helene et al. 2017	SEMIA 6399	MKFI01000007	99.91863303
	5	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> Yao et al. 2015	CCBAU 53325	KF114645	99.91863303
UFLA 04-868, UFLA 04-870, UFLA 04-893, UFLA 04-896, UFLA 04-900, UFLA 04-901, UFLA 04-905, UFLA 04-906	1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> Kuykendall et al. 1993	USDA 76	KB900701	99.9103139
	2	<i>Bradyrhizobium jicamae</i> Ramírez-Bahena et al. 2009	PAC68	LLXZ01000092	99.9103139
	3	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> Ramírez-Bahena et al. 2009	PAC 48	LFIQ01000091	99.9103139
	4	<i>Bradyrhizobium icense</i> Durán et al. 2014	LMTR 13	CP016428	99.9103139
	5	<i>Bradyrhizobium paxllaeri</i> Durán et al. 2014	LMTR 21	MAXB01000044	99.9103139
	6	<i>Bradyrhizobium tropiciagri</i> Delamuta et al. 2015	SEMIA 6148	LFLZ01000084	99.9103139
	7	<i>Bradyrhizobium embrapense</i> Delamuta et al. 2015	SEMIA 6208	LFIP01000119	99.9103139
	8	<i>Bradyrhizobium viridifuturi</i> Helene et al. 2015	SEMIA 690	LGTB01000028	99.9103139
	9	<i>Bradyrhizobium namibiense</i> Grönemeyer et al. 2017	5-10	KX661401	99.9103139
	10	<i>Bradyrhizobium mercantei</i> Helene et al. 2017	SEMIA 6399	MKFI01000007	99.9103139
	11	<i>Bradyrhizobium ripae</i> Bünger et al. 2999	WR4	MF593081	99.9103139
	12	<i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> Yao et al. 2015	CCBAU 53325	KF114645	99.9103139

TERCEIRA PARTE

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente trabalho conseguiu atingir o objetivo proposto de aportar conhecimentos acerca de FMAs e BFNNL de ecossistemas ferruginosos da Serra Norte da FLONA de Carajás, na Amazônia oriental brasileira. Este é um dos estudos pioneiros na região, e abrange ambos grupos microbianos, junto a bactérias endofíticas de nódulos, também registradas.

A partir das análises de 14 áreas compreendendo áreas não reabilitadas, reabilitadas (em diferentes estágios) e nativas nos sítios de mineração Arenito II, Noroeste II e Sul IV foram identificados 66 morfotipos de FMAs mediante taxonomia clássica. Deles 20 não conseguiram ser identificados a nível de espécie por não apresentarem os caracteres diagnósticos suficientes para distingui-las, ou por serem possíveis novas espécies para a ciência. A futura realização de culturas armadilhas seguidas de culturas puras poderiam auxiliar principalmente na descrição de novas espécies.

No caso das bactérias, o estudo concentrado nas áreas nativas de referência, permitiu o registro de 52 estirpes (31 nodulíferas e 21 endofíticas dos nódulos) e a obtenção de culturas puras. A identificação bacteriana realizada mediante ampliação e sequenciamento parcial do 16S foi mantida de maneira conservadora a nível de gênero, devido a alta conservação deste gene e conseqüentemente baixo poder resolutivo para distinguir entre espécies muito próximas. Estudos posteriores mediante análises de sequências *multilocus*, por exemplo, precisam serem realizados para a confirmação da identidade das estirpes.

Relacionado à resposta das comunidades FMA à reabilitação, observou-se que estas são altamente resilientes, conseguindo-se recuperar com os processos de reabilitação sem necessidade de inoculação adicional. Isto também poderia ter sido favorecido pela reintrodução de espécies vegetais nativas e de ocorrência local com alto grau de associação micorrízica. Por outro lado, caso preciso a estimulação/potenciação dessas comunidades visando acelerar os processos de recuperação ambiental, a realização de canteiros multiplicadores (tecnologia on-farm) com plantas micótrofas de ciclo curto poderia ser suficiente, prévio ao uso de solo na produção de mudas, por exemplo.

Coincidindo com o referido amplamente na literatura, a produção e acumulação de glomalina, mostrou-se como um bom indicador do uso da terra, altamente correlacionada com

a MOS e a CTC, indicando a recuperação da atividade do solo. Adicionalmente a relação GFE/GTE mostrou ser um indicador comparável e de fácil interpretação, independente dos valores absolutos de ambas frações. Em resumo, as ações de reabilitação empreendidas nos três sítios de mineração propiciaram a recuperação das comunidades micorrízicas e as propriedades e processos do solo a elas relacionadas, destacando-se Arenito II com os melhores resultados.

O estudo acerca das BFNNL e endofíticas dos nódulos das áreas de referência, mostrou a Arenito II como a área mais diversa e eficiente na FBN, quando comparada com Noroeste II e Sul IV. Por outro lado, as particularidades edáficas das áreas, avistadas como agentes de seleção, poderiam ser um ponto de partida para a avaliação das potencialidades dos isolados, como por exemplo a tolerância a Al das estirpes de NO-II, e a Mn, Zn e Cu das de S-IV. A interação entre ambos grupos é referida na literatura sugerindo-se certa correlação e/ou seletividade na co-ocorrência de ambos. As funções e potencialidades de uso de bactérias nodulíferas e endofíticas vão muito além da FBN, sendo ainda preciso estudos ao respeito.

Finalmente, os dois trabalhos aqui expostos, ainda com ópticas diferentes, constituem pontos de partida para futuras investigações, oferecendo não apenas respostas, senão também novas interrogantes e possibilidades de estudos a serem desenvolvidos. Nesse sentido propõe-se sua continuidade direcionado na:

- i. Identificação a nível de espécies das estirpes bacterianas isoladas
- ii. Realização de testes de eficiência e potencialidades das estirpes individuais e/ou consorciadas no crescimento de espécies florestais nativas utilizadas nos processos de reabilitação e/ou de interesse agrônômico.
- iii. Avaliação sistemática dos indicadores micorrízicos visando identificar aqueles mais promissores para o monitoramento da reabilitação.
- v. Validação em diferentes cenários da relação GFE/GTE como possível indicador de reabilitação/estabilidade/equilíbrio do solo.