



**ALINE OLIVEIRA SILVA**

**SOIL QUALITY INDICATORS SHOWED RECOVERY OF AN  
IRON MINING AREA COMPARED TO ADJACENT  
PHYTOPHYSIOGNOMIES**

**LAVRAS-MG**

**2018**

**ALINE OLIVEIRA SILVA**

**SOIL QUALITY INDICATORS SHOWED RECOVERY OF AN IRON MINING  
AREA COMPARED TO ADJACENT PHYTOPHYSIOGNOMIES**

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 Microbiológicos do Solo, para a obtenção  
do título de Doutora.

**Orientadora**

Prof. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS-MG**

**2018**

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

Silva, Aline Oliveira.

Soilquality indicators showed recovery of an iron mining area  
compared to adjacentphytophysionomies / Aline Oliveira Silva. -  
2018.

100 p. : il.

Orientador(a): Fatima Maria de Souza Moreira.

Coorientador(a): Amanda Azarias Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Mineração de ferro. 2. Qualidade do solo. 3. Indicadores de  
qualidade. I. Moreira, Fatima Maria de Souza. II. Guimarães,  
Amanda Azarias. III. Título.

**ALINE OLIVEIRA SILVA**

**SOIL QUALITY INDICATORS SHOWED RECOVERY OF AN IRON MINING  
AREA COMPARED TO ADJACENT PHYTOPHYSIOGNOMIES**

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 Microbiológicos do Solo, para a obtenção  
do título de Doutora.

Aprovada em 27 de abril de 2018.

Dra. Amanda Azarias Guimarães	UFLA
Dra. Silvia Maria de Oliveira Longatti	UFLA
Profa. Dra. Érika Valente de Medeiros	UFRPE
Profa. Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya	UFV
Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega	UFRB

Orientadora

Prof. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS-MG**

**2018**

*"Para que as luzes do outro sejam percebidas por mim devo por bem apagar as minhas,  
no sentido de me tornar disponível para o outro."*

*Mia Couto*

*A Deus por sempre passar à frente de tudo em minha vida,  
A minha família por sempre ser minha orientação para todos os momentos,  
A meus amigos que estiveram presentes a cada momento nessa jornada,  
Pois sozinhos nunca conseguimos fazer nada!*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu guia e a proteção para todos os momentos.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq e Vale S/A pelo apoio financeiro.

E ao Departamento de Ciência do Solo–DCS–UFLA pelo apoio institucional.

À professora Fatima Moreira pela orientação, o apoio e o exemplo de profissional. Não consigo dizer em palavras o quanto melhorei profissionalmente com seu auxílio.

À Amanda por sua coorientação e ter me ajudado a lapidar algumas arestas. Ao Jessé por ter me ajudado com toda a sua sabedoria.

À banca de defesa, pois a sua contribuição ajudou a melhorar muito o trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios do DCS, em especial ao Manuel e ao Paulo, pela ajuda de sempre, e a Marlene por todo apoio e por “cuidar das minhas filhas”.

Aos professores do DCS por todo conhecimento compartilhado nas aulas e nos cafés, em especial ao Nilton e Afredão por serem esses exemplos de profissionais e sempre estarem disponíveis a uma conversa, e ao Sérgio e Bruno pelas ajudas sempre solicitadas.

A família do Laboratório de Microbiologia e Processos Microbianos do solo, pois sem vocês não há trabalho que possa render no mundo. Vocês se tornaram meus irmãos em Lavras, obrigada a TODOS! Em especial a Flávia por ter me acolhido de uma maneira única (te amo muito fofa), as minhas “pintinhas” e braços direito Tainara, Amanda Monique, Ginaini, Júlia e Dani. A Mari, Jac e Anita por todas as filosofias e disponibilidade. Ao Karl pelos cafés e micorrizas. A Lu, Mariel, Elzane, Bruna, Jú, Raquel, Jordana, Paula, Sílvia, Damy, Márcia, Téo, Flávio, a Jú (em memória), Manu, Maíra, as Flávias (Louzeiro e Roman), Gabriela, Elaine e Raíssa pela amizade.

À Sara, Kmila, Rimena e Giovana pela amizade e compartilhar a casa.

À minha mãe, Maria de Lourdes, por ser o maior exemplo de amor ao próximo, de humildade, trabalho, fé e dedicação. Por sua perseverança, que mesmo em meio às dificuldades nunca deixou de acreditar nos estudos. Te amo Mamãe.

À minhas irmãs, Ângela, Monica, Lidiane, à minhas sobrinhas, Maria Eduarda, Mayara, Maíra, Maria Clara, Giovana, ao meu irmão, Ângelo, à minhas tias, Luiza, Valdecir e aos meus cunhados, pois o amor de vocês é a base para eu conseguir lidar com a vida. Amo muito vocês, para sempre e sempre. E ao Rodrigo, por estabilizar minhas emoções e me fazer planejar o futuro.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO GERAL

As atividades de mineração modificam a paisagem e podem gerar impactos ambientais no solo, na água e no e ar, necessitando que esses locais que passaram pelo processo de mineração sejam reabilitados por meio de processos de revegetação. Após a reabilitação as áreas devem ser avaliadas quanto ao grau de recuperação ou perturbação. Indicadores microbiológicos são as ferramentas mais sensíveis para estas avaliações. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os indicadores microbiológicos do solo de uma área reabilitada após atividades de mineração de ferro e comparar com fitofisionomias adjacentes que não foram perturbadas. Amostras de solo foram coletadas em fitofisionomias de Canga (ironstone outcrops – IO) de Cerrado (neotropical savanna – NS) e de Mata Atlântica (Atlantic Forest – AF) e uma área em reabilitação após a mineração de ferro revegetada com capim (rehabilitated area with grass – RA), em duas estações climáticas (seca e chuvosa) no Quadrilátero Ferrífero – MG – Brasil. Os atributos do solo avaliados foram os microbiológicos, químicos e físicos dos solos. Os indicadores microbiológicos diferiram de acordo com o tipo de fitofisionomia e a estação do ano. AF foi a fitofisionomia que exibiu valores mais altos de biomassa microbiana e de atividades enzimáticas. A IO e NS exibiram uma biomassa microbiana ativa nos processos de ciclagem de nutrientes, evidenciada pelas atividades enzimáticas. RA evidenciou efeito positivo da revegetação ao proporcionar maiores atividades enzimáticas específicas por carbono da biomassa microbiana e maior coeficiente microbiano, assim como a maior eficiência simbiótica de comunidades de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal. Os atributos microbiológicos, o carbono orgânico, os teores de N,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Al^{3+}$ , o pH, a acidez potencial, a capacidade de troca de cátions e os conteúdos de areia e argila foram sensíveis em indicar diferenças entre as fitofisionomias. Foram isoladas 327 estirpes, nas duas estações climáticas. A diversidade genética foi avaliada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, a partir do qual foram identificados 29 gêneros na estação seca e 18 na estação chuvosa. Os gêneros nodulíferos *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e o endofítico *Paenobacillus* foram os de maior ocorrência em ambas as estações e fitofisionomias. A riqueza de gêneros encontradas nas áreas na estação seca e chuvosa foram respectivamente 8 e 6 em IO, 6 e 8 em NS, 11 e 15 em AF, 15 e 7 em RA. O processo de reabilitação de áreas após a mineração de ferro por revegetação com capim está sendo efetivo na recuperação do solo, evidenciado por elevadas atividades enzimáticas específicas por biomassa microbiana e pela eficiência simbiótica da comunidade de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em nesse solo.

**Palavras chave:** Reabilitação. Canga. Cerrado. Mata Atlântica. Quadrilátero Ferrífero. Estações climáticas.

## GENERAL ABSTRACT

Mining activities modify the landscape and can generate environmental impacts on the soil, water and air, necessitating that these sites that have undergone the mining process be rehabilitated through revegetation processes. After rehabilitation, the areas should be evaluated for the degree of recovery or disturbance. Microbiological indicators are the most sensitive tools for these assessments. Therefore, the objective of this study was to evaluate soil microbiological indicators of an area rehabilitated after iron mining activities and to compare with adjacent non-disturbed phytophysiognomies. Soil samples were collected in the *Canga* (Ironstone Outcrops – IO), *Cerrado* (Neotropical Savanna – NS) and Atlantic Forest (AF) and an area rehabilitated after iron mining with grass (RA), in two climatic seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero - MG - Brazil. The soil attributes evaluated were the microbiological, chemical and physical. The microbiological indicators differed according to the type of vegetation and the season of the year. AF was the phytophysiognomy that exhibited higher values of microbial biomass and of enzymatic activities. The IO and NS exhibited an active microbial biomass in the nutrient cycling processes evidenced by the enzymatic activities. RA showed a positive effect of revegetation by providing greater specific enzymatic activities by carbon of the microbial biomass and higher microbial coefficient, as well as the greater symbiotic efficiency of plant growth promoter rhizobacterial communities. Microbiological attributes, organic carbon, total nitrogen,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Al}^{3+}$ , pH, potential acidity, cation exchange capacity and sand and clay content were sensitive to indicate differences between phytophysiognomies. A total of 327 strains were isolated at both seasons. Genetic diversity was evaluated by partial sequencing the 16S rRNA gene, from which 29 genera were identified in the dry season and 18 in the rainy season. The genotypes *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and the endophytic *Paenebacillus* were the most frequent in both seasons and phytophysiognomies. The richness of genera found in the areas in the dry and rainy season were respectively 8 and 6 in IO, 6 and 8 in NS, 11 and 15 in AF, 15 and 7 in RA. The process of rehabilitation of areas after iron mining by revegetation with grass is being effective in soil recovery, evidenced by high specific enzymatic activities by microbial biomass and the symbiotic efficiency of the rhizobacteria community promoting plant growth in this soil.

**Keywords:** Rehabilitation. Ironstone Outcrops. Neotropical Savanna. Atlantic Forest. Quadrilátero Ferrífero. Weather Stations.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Mineração e recuperação de áreas mineradas.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Quadrilátero Ferrífero.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Indicadores de qualidade do solo.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.1. Biomassa Microbiana.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2. Respiração Basal do Solo.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.3. Coeficientes Metabólico e Microbiano.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.4. Atividade Enzimática do Solo.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.5. Diversidade de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Sazonalidade Climática.....</b>	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....</b>	<b>32</b>
	<b>32</b>
<b>ARTIGO 1 – Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies.....</b>	<b>60</b>
<b>ARTIGO 2 – Diversidade de comunidades de bactérias promotoras de crescimento vegetal em área sob influência da mineração de ferro e fitofisionomias adjacentes.....</b>	
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>100</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

Apesar da essencialidade da mineração para a humanidade, é uma das atividades que mais afetam os ecossistemas, causando impactos diretos e indiretos sobre as áreas exploradas e no seu entorno, na forma de alterações na paisagem e no solo. O Brasil é um dos países com maior atividade de mineração no mundo, principalmente a mineração de ferro, gerando uma grande quantidade de áreas que são degradadas e que necessitam ser recuperadas, geralmente por meio de estratégias de reestruturação física do solo e por revegetação com plantas nativas e exóticas, como os capins. Tornando-se importante avaliar o impacto da atividade de mineração e da revegetação sobre os ecossistemas atingidos e adjacentes. A avaliação deste impacto no solo é importante, sendo esse aspecto pouco reportado na literatura para áreas de mineração de ferro, pois avaliam-se principalmente aspectos relacionados a sobrevivência da vegetação e não sobre a qualidade do solo.

O solo é o principal compartimento que pode indicar a qualidade ambiental antes e após a revegetação, medida tomada para mitigar os problemas causados pela mineração. Principalmente, por ser no solo que ocorrem os principais processos ecossistêmicos que determinam a sustentabilidade ambiental. Desse modo, os atributos químicos, físicos e biológicos do solo são importantes indicadores para avaliar se as modificações causadas pela revegetação foram positivas ou negativas na recuperação.

As avaliações da microbiota e dos processos por ela desempenhados, são importantes ferramentas na avaliação do efeito nas mudanças no uso e na cobertura do solo. A quantificação da biomassa e atividades enzimáticas são compreendidas como indicadores eficazes em descrever a qualidade do solo, mas não são os únicos bioindicadores que podem ser aplicados. A diversidade de organismos, principalmente de organismos que realizam processos importantes para o desenvolvimento vegetal, também se destaca como bioindicador.

As bactérias promotoras de crescimento vegetal estão entre os grupos de organismos que podem ser empregados com fins biotecnológicos para auxiliar os processos de revegetação e recuperação de solos. Uma maneira de ter acesso a esses organismos é por meio de pesquisas em áreas que passaram por revegetação ou nativas próximas aos locais que passaram pelos processos de exploração ou intensa modificação, como a mineração. Avaliar a diversidade e isolar organismos aptos à aplicação em projetos de revegetação que visem o uso

de recursos biotecnológicos são alternativas que beneficiam a reabilitação desses ambientes, proporcionando melhoria na qualidade ambiental.

As variações sazonais do clima são importantes modificadores da atividade e da diversidade microbiana no solo. As mudanças são geradas, principalmente, pelas respostas à variação dos teores de umidade, o que afeta a vegetação e, conseqüentemente, a comunidade microbiana. Conhecer a magnitude das mudanças causadas pela sazonalidade em diferentes fitofisionomias é uma importante ferramenta na avaliação do manejo e da qualidade do solo.

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade do solo por meio dos indicadores biológicos em área reabilitada após a atividade mineração de ferro e fitofisionomias adjacentes, em duas estações climáticas (seca e chuvosa) em Brumadinho e Nova Lima no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais – Brasil. Assim como a obtenção de estirpes de bactérias promotoras de crescimento nativas com potencial biotecnológico que poderão ser utilizadas na reabilitação de áreas impactadas. Esse trabalho faz parte de um Projeto maior intitulado “Diversidade de plantas e de organismos dos solos com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental em Minas Gerais” realizado pela Universidade Federal de Lavras em parceria com outras instituições de ensino e pesquisa no Brasil.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Mineração e recuperação de áreas mineradas**

A mineração é uma atividade fundamental para o desenvolvimento econômico e social dos países. É um dos setores básicos da economia e contribui de forma decisiva para o desenvolvimento e a melhoria da qualidade de vida da população, desde que seja realizada com responsabilidade social e de maneira sustentável (FARIAS, 2002). Dentre as explorações minerais realizadas no Brasil a mineração de ferro é uma das mais expressivas. As reservas mundiais de minério de ferro totalizam 170 bilhões de toneladas e as reservas lavráveis brasileiras representam 13,6% dessas, sendo o terceiro maior produtor mundial. Os principais estados produtores no Brasil são: Minas Gerais (72,5% das reservas e teor médio de 46,3% de Fe), Mato Grosso do Sul (13,1% e teor médio de 55,3%) e Pará (10,7% e teor médio de 64,8%) (JESUS, 2014).

Apesar da essencialidade as atividades de mineração interferem na paisagem de maneira constante, gerando alterações em extensas áreas, impactando os ecossistemas, degradando e contaminando o solo, diminuindo a diversidade vegetal e microbiana, o que compromete o equilíbrio ecológico e a saúde humana, representando também problemas pelo alto custo na recuperação das áreas que foram degradadas por essa atividade (AIRES et al., 2018; BELADI et al., 2011; DARY et al., 2010; FRANCO et al., 1994; GOMES et al., 2017).

O efeito das atividades de mineração depende da formação geológica, do minério a ser extraído, do tipo de lavra e do rejeito produzido (CARNEIRO et al., 2008; LONGO, RIBEIRO, MELO, 2011; QUADROS et al., 2016; WAHSHA et al., 2017). Quando o processo de mineração é realizado pelo método de lavra a céu aberto, origina uma grande transformação, impactando não apenas ambientalmente, mas também socialmente as comunidades ao redor (GUIMARÃES et al., 2013). A legislação afirma que as áreas que passaram pela atividade de mineração devem ser reabilitadas, com a finalidade de que o local degradado passe a ter uma condição estável em conformidade com os valores ambientais, estéticos e sociais das circunvizinhanças (IBAMA, 1990).

Dentre as estratégias utilizadas para reabilitação de áreas mineradas, a prática de revegetação é considerada um dos procedimentos mais eficazes por se barato e de fácil aplicação, utilizando espécies nativas e/ou exóticas nesse processo (BANNING et al., 2011; PENG et al., 2009; QUADROS et al., 2016). Além de recompor as comunidades vegetais, a

revegetação é importante também na recuperação da diversidade das comunidades microbianas do solo (ESCOBAR et al., 2015; FAUCON, HOUBEN, LAMBERS, 2017; FINKENBEIN et al., 2013).

O sucesso no estabelecimento de comunidades vegetais depende da recuperação da atividade biológica do solo. O funcionamento do solo é essencialmente realizado pelas comunidades microbianas e dos processos por elas desenvolvidos, como a estruturação, a decomposição de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes (CASTRO et al., 2006; CIARKOWSKA, SOLEK-PODWIKA, WIECZOREK, 2014; ESCOBAR et al., 2015; FINKENBEIN et al., 2013). Por suas funções essenciais no ecossistema e a sua sensibilidade às mudanças, as atividades e populações microbianas têm sido utilizadas como indicadores eficientes para estimar as alterações na qualidade do solo durante a reabilitação de áreas mineradas (CASTRO et al., 2017; CLAASSENS et al., 2005; CLAASSENS et al., 2008; CARNEIRO et al., 2008; ESCOBAR et al., 2015; KUJUR, PATEL, 2012; MUKHOPADHYAY et al., 2016; PASAYAT, PATEL, 2016; QUADROS et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2017; WAHSHA et al., 2017).

## **2.2. Quadrilátero Ferrífero**

O Quadrilátero Ferrífero é uma das regiões com maior atividade de extração de minério de ferro do mundo, compreende uma área de cerca de 7200 km<sup>2</sup> na parte central do estado de Minas Gerais, na região sudeste do Brasil. Trata-se de uma porção montanhosa, localizada ao sul da Cadeia do Espinhaço e corta o estado no sentido Norte-Sul (SCHAEFER et al., 2015). Recebeu esse nome por conta da localização espacial das terras altas que constituem um conjunto de cristas e superfícies erosivas soerguidas que possuem uma forma grosseiramente quadrangular, formando o entorno das terras baixas (VARAJÃO et al., 2009) e pelo alto teor de ferro no material de origem (itabiritos, dolomitos ferruginosos e rochas básico-ultrabásicas) (CARVALHO FILHO, CURI, SHINZATO, 2010).

Os solos dessa região são muito influenciados pela presença das rochas ferríferas no material de origem, sendo isso marcante nas suas características, principalmente pelos teores muito elevados de óxidos de ferro, menor profundidade e textura arenosa (CARVALHO FILHO, CURI, SHINZATO, 2010; CARVALHO FILHO et al 2015). Isso faz com que a vegetação local seja fortemente condicionada por essas características pedológicas, variando desde áreas campestres até florestais (JACOBI, CARMO, 2008; SCHAEFER et al., 2015).

As áreas de geossistemas ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero apresentam uma grande diversidade de vegetação, abrangendo diferentes fitofisionomias, compostas pelas inter-relações entre dois grandes biomas, o Cerrado e a Mata Atlântica, que são *hotspots* globais de biodiversidade com prioridade de conservação (MYERS et al., 2000), que faz dessa uma ecoregião única. Outro *hotspot* de diversidade que é encontrado nessas áreas são as Cangas Ferruginosas, que compreendem uma vegetação rasteira, adaptadas a solos rasos e com altos teores de Fe (CARMO, JACOBI, 2013; CARVALHO et al., 2012; NEVES et al., 2017; NOGUEIRA. et al., 2005; SKIRYCZ et al., 2014). Essa adaptação de vegetação é dada pelo tipo de solo e pelo clima da região que é tropical semiúmido, possuindo duas estações climáticas bem definidas: verão úmido e inverno seco (VARAJÃO et al., 2009).

O Cerrado é o segundo maior bioma da América Latina, representa um importante corredor ecológico entre a floresta Amazônica e a Mata Atlântica (RAMPELOTTO et al., 2013). O bioma Cerrado tem uma grande importância para a biodiversidade tropical e a produção agrícola, com fitofisionomias que vão desde formações florestais, savânicas até campestres, combinadas com solos altamente intemperizados (CASTRO et al., 2016; FRANÇOSO et al., 2015; LOPES et al., 2018; PONTES et al., 2017). A maioria dos solos desse bioma são Latossolos e Argissolos altamente intemperizados, existindo a presença de alguns Neossolos. Comumente, são solos ácidos, ricos em óxidos de ferro e alumínio, de baixa fertilidade (LOPES; GUILHERME, 2016). As fitofisionomias do Cerrado são os principais determinantes do funcionamento biológico no solo. Mendes et al. (2012) avaliaram várias fitofisionomias do cerrado em quatro épocas amostrais e observaram que as fitofisionomias florestais exibiam uma maior atividade e biomassa microbiana quando comparadas com pastagens e fitofisionomias de cerradão.

A Floresta Atlântica ocupava grande parte do território brasileiro, restando hoje menos de 10% do original, seu uso para agricultura, indústria e habitação são as principais causas dessa redução (BRUCE et al., 2010). Caracteriza-se pela alta diversidade de espécies e o alto grau de endemismo, principalmente por abranger uma grande variedade de formações florísticas e climas. Pelo alto grau de endemismo e a diminuição das áreas de floresta observa-se o declínio populacional de um grande número de espécies (HASUI et al., 2018; FOLLADOR et al., 2018; HADDAD, PRADO, 2005), demonstrando a sensibilidade desse bioma e a necessidade de estudos visando a sua preservação. A Floresta Atlântica apresenta uma diversidade microbiana ainda pouco estudada (MENDES, TSAI, 2018), com um enorme potencial de encontrar novas espécies de microrganismos (BRUCE et al., 2010; DALL'AGNOL, et al., 2017).

As Cangas são ambientes ricos em rochas com alto teor de ferro (compostas por até 90% de óxidos de ferro) e possuem características peculiares como solos ácidos, rasos e com reduzidos índices de fertilidade (SCHAEFER et al., 2015 VICENT; MEGURO, 2008). Constituem um dos sistemas brasileiros menos conhecidos, embora esteja entre os mais ameaçados, principalmente, devido à intensa atividade mineradora associada ao elevado teor de ferro no material de origem desse solo (JACOBI, CARMO, 2008; SKIRY CZ et al., 2014). Apesar de apresentar alta taxa de endemismo de plantas (CARMO, JACOBI, 2013; JACOBI, CARMO, 2008; NEVES et al., 2017; SKIRY CZ et al., 2014), os estudos sobre diversidade da microbiota do solo nesse ambiente ainda são escassos. Com destaque para estudos de diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (CASTRO et al., 2017) e diversidade de fungos micorrízicos (CARVALHO et al., 2012; NOGUEIRA. et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2017; VIEIRA et al., 2017) no Quadrilátero Ferrífero.

### **2.3. Indicadores de qualidade do solo**

A qualidade ambiental é composta por três componentes: a qualidade da água, do ar e do solo (ANDREWS, KARLEN, MITCHELL, 2002). As definições para as qualidades do ar e da água são baseadas principalmente no grau de poluição, o que impacta diretamente os ecossistemas e a saúde humana (CARTER et al., 1997). Por outro lado, a qualidade do solo é mais complexa, não abrangendo apenas aspectos relacionados à poluição, mas também aos aspectos ligados ao seu funcionamento e a complexidade da sua constituição química, física, mineralógica e biológica. Doran, Parkin (1994) conceituaram a qualidade do solo como a “capacidade do solo funcionar, dentro dos limites do ecossistema manejado ou natural, sustentando a produtividade biológica, mantendo a qualidade ambiental e promovendo a saúde vegetal e animal”. Esse conceito também pode incluir a capacidade de comunicação e adaptabilidade às mudanças entre a estrutura do solo e os organismos que nele habitam (LAVELLE et al., 2006).

Por ser o solo um sistema trifásico, dinâmico, complexo e heterogêneo, sua qualidade não pode ser medida diretamente, sendo necessário o uso de atributos mensuráveis das suas propriedades. Os requisitos para escolha do indicador são relacionados à praticidade, facilidade de amostragem e medição, alta confiabilidade, sensibilidade a variações no manejo, ter uma forte correlação com as funções do solo, ser útil nas descrições dos processos do ecossistema, serem de alta aplicabilidade, serem fáceis de compreender e de baixo custo

(DORAN, PARKIN, 1994). No entanto, a escolha dos atributos relevantes e a interpretação das medições feitas não são fáceis, devido à complexidade dos solos, aos efeitos herdados do uso anterior da terra e às compensações entre os serviços ecossistêmicos (MENDES, SOUSA, REIS JUNIOR, 2015).

Para avaliar a qualidade do solo, indicadores químicos, físicos e biológicos devem ser identificados e analisados quanto à sua sensibilidade aos distúrbios causados pelo manejo. Uma vez que tenham sido definidos, esses indicadores podem ser monitorados de forma a avaliar o impacto do manejo adotado sobre a qualidade do solo em curto, médio e longo prazo (CHAER; TÓTOLA, 2007). O componente biológico do solo tem papel de destaque na avaliação da sua qualidade, pois ele apresenta uma estreita inter-relação com os componentes físicos e químicos, principalmente pelo papel dos microrganismos nos processos ecossistêmicos (DILLY, POMPILI, BENEDETTI, 2018; HINOJOSA et al., 2004; MENDES, SOUSA, REIS JUNIOR, 2015).

Apesar da sensibilidade dos indicadores biológicos em demonstrarem as diferenças na qualidade do solo, Bünemann et al. (2018) em sua revisão sobre o tema, mostraram que eles ainda são pouco utilizados nesses estudos, os indicadores mais comuns são o pH e a matéria orgânica. O fato dos microrganismos serem os responsáveis diretos pelo funcionamento do solo, atuando nos processos de gênese, decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes e biorremediação de áreas contaminadas por poluentes e agrotóxicos, justifica não só a importância, mas também a necessidade da inclusão dos indicadores microbiológicos nas avaliações de qualidade (BANDICK; DICK, 1999; CARNEIRO et al., 2008; ESCOBAR et al., 2015; MUÑOZ-ROJAS et al., 2016). A alta correlação entre os vários atributos biológicos indica a possibilidade de seleção de um conjunto reduzido e simplificado de indicadores capazes de expressar a qualidade biológica dos solos, tornando sua adoção em análises de rotina uma perspectiva atraente (CHAER; TÓTOLA, 2007; MENDES, SOUSA, REIS JUNIOR, 2015; RATCLIFFE, BOSMAN, CARNOL, 2018; SÁ et al., 2018).

### **2.3.1. Biomassa Microbiana**

A biomassa microbiana (BM) é a fração viva da matéria orgânica do solo, constituída por bactérias, fungos, protozoários, actinobactérias e algas, que atuam no processo de decomposição de resíduos orgânicos, através da ciclagem de nutrientes e fluxo de energia (JENKINSON; LADD, 1981). A BM contém de 1% a 4% de C e de 3% a 5% de N total no solo, representando um reservatório de nutrientes para as plantas, sendo também o principal

catalizador no processo de ciclagem de elementos nos ecossistemas, dependendo das condições edafoclimáticas e a qualidade da matéria orgânica disponível, principalmente da serapilheira (GAMA-RODRIGUE, GAMA-RODRIGUES, 2008).

A BM é usada como ferramenta para orientar o planejamento e avaliar as práticas de manejo do solo, pois trata-se de um indicador das alterações ambientais, respondendo rapidamente as flutuações sazonais de umidade e temperatura e as práticas de manejo, auxiliando na avaliação dos processos de reabilitação de áreas após a atividade de mineração (CARNEIRO et al., 2008; ESCOBAR et al., 2015; QUADROS et al., 2016).

Em solos reabilitados após a mineração de bauxita em Minas Gerais, Carneiro et al. (2008) observaram um rápido aumento nos teores do carbono da biomassa nos primeiros anos após a revegetação. Os autores atribuíram essa resposta à sensibilidade da biomassa microbiana em responder às mudanças de manejo e à entrada de C no sistema pelos processos de rizodeposição e decomposição da fitomassa das espécies que foram usadas na revegetação. Muitos fatores influenciam a disponibilidade de recursos para os microrganismos em solos durante a reabilitação após a mineração, mas à medida que o tempo passa após a revegetação, a estrutura da comunidade microbiana se torna mais semelhante às áreas não mineradas circunvizinhas assim como foi observado por Banning et al. (2011) e Quadros et al. (2016) em áreas revegetadas após a mineração de carvão.

### **2.3.2. Respiração Basal do Solo**

A respiração basal reflete a atividade biológica do solo, representando a capacidade de degradação de compostos orgânicos pela microbiota. É definida como o consumo de O<sub>2</sub> e a liberação do CO<sub>2</sub> resultado de processos metabólicos dos organismos do solo, pois os mesmos realizam a decomposição da matéria orgânica e regulam as transformações dos elementos (ANDERSON, DOMSCH, 1993). As mais elevadas respirações basais podem ser indicativos de alta atividade biológica, pois com aumentos na biomassa microbiana e a rápida decomposição de um resíduo incorporado aumenta-se o fluxo de CO<sub>2</sub> representando aumento na taxa metabólica das comunidades decompositoras, ou em resposta a algum estresse ambiental demonstrando o efeito negativo desse evento (TÓTOLA E CHAER, 2002; ADACHI et al., 2006).

Em uma cronossequência de revegetações após a mineração de carvão no Rio Grande do Sul – Brasil, Quadros et al. (2016) observaram que a respiração basal na área sob floresta foi mais elevada que nas áreas revegetadas (de 3 a 19 anos após a revegetação). Esses autores afirmam que a recuperação da matéria orgânica e da atividade da microbiota é mais complexa do que a recuperação de características químicas do solo (pH e disponibilidade de nutrientes), pois para o restabelecimento da comunidade microbiana é necessário um longo tempo de recuperação. Santos et al. (2013) ao avaliarem os atributos biológicos do solo após revegetação em áreas de mineração de ouro em Minas Gerais – Brasil, observaram maiores taxas de respirações basais nas áreas nativas, demonstrando que a microbiota é muito sensível a processos de degradação causados pela mineração. Por isso, a respiração basal é uma ferramenta eficaz para avaliar a atividade microbiana, a qualidade e a funcionalidade do solo em projetos de restauração (MUÑOZ-ROJAS et al., 2016).

### 2.3.3. Coeficientes Metabólico e Microbiano

O coeficiente metabólico ( $qCO_2$ ) é a razão entre o  $CO_2$  produzido pela respiração basal e o carbono da biomassa microbiana (ANDERSON, DOMSCH, 1993). Trata-se de uma avaliação da eficiência da atividade metabólica e permite a identificação dos solos que apresentam a microbiota mais eficiente na utilização de carbono e energia, pois ambientes com menor grau de distúrbio ou estresse apresentam menores  $qCO_2$  indicando que há um maior armazenamento de C nos tecidos microbianos e menor perda de  $CO_2$  para a atmosfera (WARDLE, GHANI, 1995).

O quociente microbiano ( $qMic$ ) é uma medida da qualidade da matéria orgânica, calculada pela razão entre o C da biomassa microbiana e o C orgânico total no solo, ou seja, quantifica quanto do C é fração viva, fixado nas células microbianas (SPARLING, 1992). Quanto maiores os valores de  $qMic$  melhores são as condições para o desenvolvimento microbiano, as quais podem decorrer da adição de matéria orgânica de boa qualidade ou da diminuição de fatores limitantes a microbiota (CHAER; TÓTOLA, 2007).

O  $qCO_2$  e o  $qMic$  podem ser aplicados para descrever as mudanças no uso do solo (BANNING et al., 2011; ARAÚJO et al., 2013), e também são eficientes em descrever áreas revegetadas após atividades de mineração, como foi observado por Carneiro et al. (2008) que encontraram maior  $qCO_2$  em áreas recém revegetadas com capim braquiária após a

mineração de bauxita em Minas Gerais – Brasil. Em áreas recém revejetadas com capim pós mineração de ouro em Minas Gerais – Brasil, Santos et al. (2013) também verificaram maiores  $q\text{CO}_2$  e menores  $q\text{Mic}$  demonstrando o desequilíbrio ambiental causado pela atividade de mineração.

#### **2.3.4. Atividade Enzimática do Solo**

As enzimas são catalisadores bioquímicos que aceleram reações químicas. No solo, as enzimas têm sua atividade relacionada com os ciclos biogeoquímicos, auxiliando na mineralização de elementos essenciais aos ecossistemas, como C, N, P e S. São indicadoras do estado nutricional do solo, por estarem ligadas a disponibilidade de nutrientes na solução (CHAER; TÓTOLA, 2007) é, também, um dos primeiros atributos a serem alterados quando o solo é perturbado (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2014).

As atividades enzimáticas no solo são resultado de enzimas intra e extracelulares produzidas por células animais, vegetais ou microbianas. As enzimas extracelulares podem permanecer ativas no solo por períodos variáveis de tempo, podendo ser imobilizadas ou complexadas em coloides minerais e orgânicos (SCHLOTTER, DILLY, MUNCH, 2003; TÓTOLA, CHAER, 2002), atuando quando as condições ambientais tornam-se favoráveis. As enzimas atuam sobre substratos específicos e podem ser classificadas dentro de seis grupos: hidrolases, oxiredutases, transferases, liases, isomerases e ligases. Sendo as hidrolases, como a arilsulfatase, a  $\beta$ -glicosidase, as fosfatases e a urease, as mais estudadas nos solos, pois catalisam a quebra de substratos em compostos orgânicos de menor peso molecular, facilitando sua mineralização (ALEF, NANNIPIERI, 1995).

As arilsulfatases são enzimas extracelulares fundamentais na biociclagem do enxofre, pois catalisam a hidrólise ésteres de sulfato orgânico, liberando  $\text{SO}_4$  disponível (TABATABAI, BREMNER, 1970). As maiores atividades dessa enzima podem refletir na dependência da reciclagem bioquímica do S no solo (MENDES et al., 2012), trazendo uma estimativa da atividade biológica (MENDES, SOUSA, REIS JUNIOR, 2015). A atividade dessa enzima é fortemente afetada pelas mudanças no uso da terra e pode ser um indicador dos teores de S e C lábeis no solo (SÁ et al., 2018).

A  $\beta$ -glicosidase atua na hidrólise da celulose e de outros oligossacarídeos, liberando glicose que servirá como fonte de energia para os microrganismos (EIVAZI, TABATABAI,

1988) e sua atividade está relacionada com a quantidade e qualidade dos resíduos vegetais retornados ao solo, que são mais complexos nas áreas nativas do que nas áreas agrícolas (PEIXOTO et al., 2010). A atividade dessa enzima muitas vezes pode ser menor em área de floresta nativa, quando essa é formada por vegetação com maior potencial recalcitrante que em áreas cultivadas (LOPES et al., 2013; MENDES et al., 2012; PEIXOTO et al., 2010). Quadros et al. (2016) observaram maior atividade da  $\beta$ -glicosidase em solo sob floresta em comparação com os locais revegetados após a mineração de carvão, mas com o tempo da revegetação (19 anos) os valores se aproximaram aos da floresta, demonstrando que o tempo de revegetação é influente no aumento das atividades microbianas.

As fosfatases têm sido estudadas no solo por catalisarem a hidrólise de ésteres de fosfato orgânico a fósforo inorgânico, que fica disponível (EIVAZI, TABATABAI, 1977). É essencial para o desenvolvimento de plantas uma ótima disponibilidade de P, principalmente em regiões tropicais pela rápida imobilização do P inorgânico (RODRIGUES et al., 2016), por isso conhecer a atividade das fosfatases é primordial para um manejo adequado do solo (MEDEIROS et al., 2017; MENDES et al., 2012). Em áreas que passam por processos de reabilitação após a mineração observa-se a maior atividade dessas enzimas quando a vegetação está mais estabilizada, indicando uma recuperação mais efetiva da atividade biológica no solo (CARNEIRO et al., 2008; ESCOBAR et al., 2015; SANTOS et al., 2013)

A urease é uma enzima importante no ciclo do N, realiza a hidrólise da ureia disponibilizando o  $\text{NH}_3$  (TABATABAI, BREMNER, 1972). Compreender a dinâmica do N no solo é de extrema importância, uma vez que a eficiência do uso C pelos microrganismos aumenta com o aumento da disponibilidade de N (MANZONI, 2017). Medeiros et al. (2017) demonstraram que a atividade das enzimas arilsulfatase, fosfatase ácida e urease foram eficientes em quantificar a atividade biológica para diferenciar sistemas de restauração na Caatinga após o uso agrícola, reforçando que as atividades enzimáticas atuam como ferramentas muito sensíveis para o monitoramento de mudanças no uso do solo.

Uma forma de estudar as atividades enzimáticas no solo também é pela quantificação da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), que é um método bastante utilizado para avaliação indireta da atividade heterotrófica do solo. Trata-se de um substrato que é hidrolisado por diversas enzimas (esterases, proteases e lipases), estimando assim a atividade microbiana em diferentes habitats (BANDICK, DICK, 1999). Carneiro et al. (2008) avaliando o impacto da mineração de bauxita em solo do sudeste brasileiro observaram que a prática provocou grande impacto nos atributos microbiológicos, mas as atividades enzimáticas totais

pela FDA apresentaram rápida recuperação no solo impactado atingindo valores similares aos das áreas de referências a partir do primeiro ano.

### **2.3.5. Diversidade de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal**

O solo é o habitat de uma grande diversidade de organismos que estão em constante interação e desempenham funções importantes nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento dos ecossistemas (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006). A diversidade pode ser definida como a variedade e a abundância relativa das espécies em um determinado ambiente. Já a biodiversidade no solo pode ser considerada como a quantidade e a distribuição da informação biológica, que pode ser traduzida em funções metabólicas, podendo estar organizada em níveis que vão desde o número de espécies (riqueza), abundância relativa de espécies (equitabilidade) até a quantificação de grupos funcionais (BORGES et al., 2016). A maior diversidade no solo garante a sua resiliência, ou seja, a capacidade de adequar-se as mudanças que nele ocorrem (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006).

Dentre os microrganismos que podem ser estudados no solo, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) destacam-se por poderem ser aplicadas como recurso genético em processos de revegetação de áreas que passaram por intensa modificação, como a mineração (VELÁZQUEZ et al., 2017). As BPCV ocorrem na rizosfera de plantas ou endofiticamente nos tecidos vegetais, podendo ser simbióticas ou não, e têm capacidade de estimular o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos diretos e indiretos. Diretamente por meio da produção de compostos que estimulam o crescimento ou por meio da disponibilização de nutrientes que a planta pode absorver, destacando-se a fixação biológica de nitrogênio, a produção fitohormônios, como ácido indolacético, e a solubilização de fosfato (COSTA et al., 2016; LIN et al., 2013; PEIX et al., 2015;). Os mecanismos indiretos estão relacionados à proteção da planta com a produção de antibióticos, a competição contra organismos patogênicos, a produção de sideróforos, quelatação de metais (RANGEL et al., 2016; SAHA et al., 2013; VELÁZQUEZ et al., 2017), e até por meio de mitigação das emissões de gases de efeito estufa (ITAKURA et al., 2012).

A partir dos nódulos de leguminosas podem ser isolados muitos gêneros de bactérias reconhecidas como promotoras de crescimento vegetal, que realizam outros mecanismos de promoção de crescimento além da fixação biológica de nitrogênio (GUIMARÃES et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013; LIMA et al., 2009; PEIX et al., 2015). Velázquez et al.

(2017) em sua revisão sobre o assunto, descreveram que vários estudos realizados em bactérias isoladas a partir de nódulos de diferentes leguminosas, mostraram que eles abrigavam bactérias de diferentes filos, incluindo Proteobacterias (classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria), Bacteroidetes, Sphingobacteria, Actinobacteria e Firmicutes. Essa ampla diversidade microbiana constitui-se uma alternativa biotecnológica para ser utilizada como probióticos e fertilizantes de plantas.

A revegetação após atividade de mineração auxilia no aumento da diversidade de organismos, como foi descrito por Quadros et al. (2016) em área de mineração de carvão revegetada por capim; por Escobar et al. (2015) em área de mineração de titânio revegetada com espécies nativas da caatinga; por Castro et al. (2017), Teixeira et al. (2017) e Vieira et al. (2017) em áreas de mineração de ferro revegetadas com capim. Além do aumento da biodiversidade, os microrganismos do solo favorecem a sobrevivência das plantas durante o processo de revegetação, como foi encontrado por Matias et al. (2009) em áreas revegetadas após atividade de mineração de ferro no Quadrilátero Ferrífero. Esses autores observaram que plantas que foram inoculadas com rizóbios e fungos micorrízicos arbusculares apresentaram maior sobrevivência e aumentos no crescimento e no teor de nitrogênio e fósforo nas plantas.

#### **2.4. Sazonalidade Climática**

A qualidade e a quantidade de resíduos vegetais no solo são os principais impulsionadores da biomassa e das atividades da microbiota no solo, pois os microrganismos heterotróficos dependem do carbono derivado das plantas como fonte de energia (FAUCON, HOUBEN, LAMBERS, 2017; SÁ et al., 2018; ZAK et al., 2003). A quantidade e a composição bioquímica de exsudados das raízes e da serapilheira podem variar consideravelmente entre fitofisionomias (BANNING et al., 2011; PONTES et al., 2017; WAGG et al., 2014), entre as estações climáticas (CASTRO et al., 2016; LI et al., 2018; LIU et al., 2018; MARTINY et al. 2006; MENDES et al., 2012; RATCLIFFE, BOSMAN, CARNOL, 2018) e entre os diferentes manejos empregados (BALDRIAN et al., 2008; CLAASSENS et al., 2005; LYNN et al., 2017).

As sazonalidades climáticas, principalmente em relação às mudanças na precipitação, influenciam na fenologia da planta e na dinâmica da deposição e decomposição da serapilheira (BUSCARDO et al., 2018; LI et al., 2018; LIU et al., 2018; MARTINY et al. 2006; MENDES et al., 2012). De fato, os microrganismos do solo e os processos

biogeoquímicos aos quais eles estão associados podem variar muito, estando essa variabilidade relacionada com a disponibilidade de recursos afetados pela limitação climática (WAGG et al. 2014).

Entender o efeito dos padrões sazonais do clima e como eles interferem nos atributos químicos, físicos e biológicos do solo, é um pré-requisito para sugerir indicadores que visem à avaliação de mudanças no funcionamento do solo em função de manejo ou estratégias de recuperação (BALDRIAN et al., 2010; LOPES et al., 2018; RATCLIFFE, BOSMAN, CARNOL, 2018; VIEIRA et al., 2017). Mudanças na atividade microbiana em função da sazonalidade, em geral, estão relacionadas aos conteúdos de umidade do solo, descrita como provável regulador na dinâmica temporal de diferentes atividades biológicas em diferentes condições de vegetação e processos de recuperação do solo (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2014; BALDRIAN et al., 2010; CASTRO et al., 2016).

O Quadrilátero Ferrífero é um ambiente tropical caracterizado por seu regime sazonal e a sua vasta composição florística. O clima local é definido por duas estações climáticas: verão úmido e inverno seco (VARAJÃO et al., 2009), e assim como a vegetação, o funcionamento biológico do solo é sensível as essas mudanças sazonais (VIEIRA et al., 2017), sendo importante mensurar essa variação. Com os ciclos de umedecimento e secagem, a vegetação responde com maior desenvolvimento e retorno de atividades metabólicas na época de chuvas, assim retornando material orgânico para compor a serapilheira, contribuindo para o aumento da capacidade funcional do solo, com aumentos nas atividades enzimáticas essenciais para a decomposição e mineralização da matéria orgânica no solo (CASTRO et al., 2016; LI et al., 2018; LIU et al., 2018; LOPES et al., 2018; RATCLIFFE, BOSMAN, CARNOL, 2018).

Mudanças nas atividades enzimáticas e na estrutura das comunidades microbianas são correlacionadas com as mudanças nas condições edafoclimáticas e de disponibilidade de nutrientes (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2014; LI et al., 2018), mas também ao teor de umidade no solo (MENDES et al., 2012). Em diferentes fitossionomias de Cerrado, que apresentam acentuada sazonalidade entre as estações chuvosas e secas, Castro et al. (2016) avaliaram a estrutura e a funcionalidade microbiana dos solos e observaram que há mudanças entre as estações climáticas, com aumentos significativos na abundância relativa de genes associados à aquisição e metabolismo de ferro, dormência e esporulação durante a estação seca, provavelmente em resposta ao estresse hídrico, e um aumento na abundância relativa de

genes relacionados à respiração, síntese de DNA e proteína durante a estação chuvosa, denotando o aumento da biomassa microbiana no solo.

Estudos conduzidos em área revegetada após atividade de mineração de carvão, na República Tcheca, mostraram que a atividade da fosfatase foi afetada pela sazonalidade climática, aumentando com o aumento da disponibilidade de água no solo (BALDRIAN et al., 2008). Já Escobar et al. (2015) avaliaram uma cronosequência de reabilitação de solos após mineração de titânio na Paraíba–Brasil e não encontraram respostas relacionadas as mudanças da estação chuvosa para a seca nas atividades enzimáticas e composição da comunidade microbiana no solo. Assim como Carneiro et al. (2008) também não encontraram influencia da sazonalidade climática ao avaliarem os atributos biológicos do solo após a revegetação de uma área de mineração de bauxita. Em área de mineração de ferro revegetada com capim e em fitofisionomias adjacentes no Quadrilátero Ferrífero, Vieira et al. (2017) observaram que a diversidade morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares foi diferente entre as estações climáticas, o número de esporos foi maior na estação seca do que na chuvosa, demonstrando o efeito da sazonalidade na resposta da microbiota em relação ao estresse hídrico.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V. et al. Soil enzyme activities during the 2011 Texas record drought/heatwave and implications to biogeochemical cycling and organic matter dynamics. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 75, p. 43–51, 2014.
- ADACHI, M. et al. Differences in soil respiration between different tropical ecosystems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 258-265, 2006.
- AIRES, U.R.V. et al. Changes in land use and land cover as a result of the failure of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Land Use Policy**, Amsterdam, v. 70, p. 63–70. 2018.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. 576 p.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> ( $qCO_2$ ) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.I.], v. 25, n. 393–395, 1993.
- ANDREWS, S. S.; KARLEN, D. L.; MITCHELL, J. P.. A comparison of soil quality indexing methods for vegetable production systems in Northern California. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [S.I.], 90, 25–45, 2002.
- ARAÚJO, A. S. et al.. Soil microbial properties and temporal stability in degraded and restored lands of Northeast Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.I.], v. 66, p. 175-181, 2013.
- BANDICK, A. K.; DICK, R. P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.I.], v. 31, p. 1471-1479, 1999.
- BANNING, N. C. et al. Soil microbial community successional patterns during forest ecosystem restoration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington-DC, v. 77, n. 17, p. 6158–6164, 2011.
- BELADI, M. et al. Phytoremediation of lead and copper by sainfoin (*Onobrychis vicifolia*): Role of antioxidant enzymes and biochemical biomarkers. **American-Eurasian Journal Agriculture & Environment Science**, Dubai, v. 3, p. 440-449, 2011.
- BORGES, C. D. et al. Como a microbiota do solo pode contribuir para obtenção de altas produtividades. In: MOREIRA, F. M. S; KASUYA, M. C. M. **Fertilidade e biologia do solo: Integração e tecnologia para todos**. 1ª ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, 2016. 592 p.
- BRUCE, T. et al. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, [S.I.], v. 60, p. 840-849, 2010.
- BÜNEMANN, E. K. et al. Soil quality—A critical review. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.I.], v. 120, p. 105–125, 2018.
- CARMO, F. F.; JACOBI, C. M.. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 527–541, 2013.

- CARNEIRO, M. A. C. et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas Cronos sequências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 2, p. 621-632, 2008.
- CARTER, M. R. et al. Concepts of soil quality and their significance. In: GREGORICH, E. G.; CARTER, M. R. (Eds.), **Developments in Soil Science**. Elsevier, p. 1–19, 1997.
- CARVALHO FILHO, A. et al. Iron oxides in soils of different lithological origins in Ferriferous Quadrilateral (Minas Gerais, Brazil). **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 118, p. 1–7. 2015.
- CARVALHO FILHO, A.; CURI, N.; SHINZATO, E. Relações solo-paisagem no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 8, p. 903–916, 2010.
- CARVALHO, F. et al. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 52, p. 9–19, 2012.
- CASTRO, A. P. et al. Microbial Diversity in Cerrado Biome (Neotropical Savanna) Soils. **PLoS ONE**, [S.I.], p. 1-16, 2016.
- CASTRO, J. L. et al.. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 41, p. 1–20, 2017.
- CHAER, G. M.; TÓTOLA, M. R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma de plantios de eucalipto sobre indicadores de qualidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 1381-1396, 2007.
- CIARKOWSKA, K.; SOLEK-PODWIKA, K.; WIECZOREK, J. Enzyme activity as an indicator of soil-rehabilitation processes at a zinc and lead ore mining and processing area. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 250-256. 2014.
- CLAASSENS, S. et al. Soil microbial community function and structure in a post-mining chronosequence. **Water, Air and Soil Pollution**, [S.I.], v. 194, p. 315-329, 2008.
- CLAASSENS, S. et al. Soil microbial properties in coal mine tailings under rehabilitation. **Applied Ecology and Environmental Research**, Budapest, v. 4, n. 1, p. 75-83, 2005.
- COSTA, E. M. et al. Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.73, n.4, p.301-310, Jul/Aug. 2016.
- DALL'AGNOL, R. F. et al. Genetic diversity of symbiotic *Paraburkholderia* species isolated from nodules of *Mimosa pudica* (L.) and *Phaseolus vulgaris* (L.) grown in soils of the Brazilian Atlantic Forest (Mata Atlântica). **FEMS Microbiology Ecology**, [S.I.], v. 93, n. 4, p. 1–15, 2017.
- DARY, M. et al. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, [S.I.], v. 177, p. 323-330. 2010.
- DILLY, O.; POMPILI, L.; BENEDETTI, A. Soil micro-biological indicators separated land use practices in contrast to abiotic soil properties at the 50 km scale under summer warm

Mediterranean climate in northern Italy. **Ecological Indicators**, [S.I.], v. 84, p. 298–303. 2018.

DORAN, J.W.; PARKIN, T. B.. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Eds.), **Defining Soil Quality for a Sustainable Environment**. SSSA, Madison, pp. 3–21. 1994.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.I.], v. 20, p. 601–606, 1988.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Phosphatases in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.I.], v. 9, 167–172. 1977.

ESCOBAR, I. E. C. et al. Changes in Microbial Community Structure and Soil Biological Properties in Mined Dune Areas During Re-vegetation. **Environmental Management**, [S.I.], v. 55, p. 1433–1445. 2015.

FARIAS, C. E. G. **Mineração e Meio Ambiente no Brasil**. Relatório do CGEE/PNUD, 2002.

FAUCON, M.; HOUBEN, D.; LAMBERS, H. Plant Functional Traits : Soil and Ecosystem Services. **Trends in Plant Science**, [S.I.], v. 22, n. 5, 2017.

FINKENBEIN, P. et al. Soil enzymatic activities as bioindicators for substrate quality in revegetation of a subtropical coal mining dump. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.I.] v. 56, p. 87-89. 2013.

FOLLADOR, M. et al. Modelling Potential Biophysical Impacts of Climate Change in the Atlantic Forest: Closing the Gap to Identify Vulnerabilities in Brazil. In: LEAL FILHO, W.; ESTEVES DE FREITAS, L. (eds) **Climate Change Adaptation in Latin America. Climate Change Management**. Springer, Cham. 2018.

FRANCO, A. A. et al. Revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto Trombetas – PA com leguminosas arbóreas noduladas e micorrizadas. In: SIMPÓSIO NACIONAL: RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 2, 1994, Foz do Iguaçu. **Abstracts...** Curitiba: UFPR, 1994. 679 p.

FRANÇOSO, R. D. et al. Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. **Natureza & Conservação**, v. 13, p. 35-40. 2015.

GAMA-RODRIGUES, E. F.; GAMA-RODRIGUES, A. C. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. A. et al. **Fundamentos da Matéria Orgânica no solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2º ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 636 p.

GOMES, L. E. O. et al. The impacts of the Samarco mine tailing spill on the Rio Doce estuary, Eastern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S.I.], v. 120, p. 28–36, 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**, [S.I.], v. 78, p. 6726–6733. 2012.

GUIMARÃES, J. C. C. et al. Ecological benefits of environmental recovery methodologies in bauxite mining. **Revista Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 9-17, Jan./Mar. 2013.

HADDAD, C. F. B.; PRADO, C. P. A. Reproductive Modes in Frogs and Their Unexpected Diversity in the Atlantic Forest of Brazil. **BioScience**, v. 55, n. 3, p. 207-217, 2005.

HASUI, É. et al. Atlantic Birds: a data set of bird species from the Brazilian Atlantic Forest. **Ecology**, v. 99, n, 2, pp. 497, 2018.

HINOJOSA, M. B. et al. 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal contaminated and reclaimed soils. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.l.], v. 36, p. 1559-1568. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. IBAMA, 1990. 96p.

ITAKURA, M. et al. Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by Bradyrhizobium japonicum inoculation. **Nature Climate Change**, [S.l.], p. 1-5. 2012.

JACOBI C. M.; CARMO, F. F. The contribution of ironstone outcrops to plant diversity in the Iron Quadrangle, a threatened Brazilian landscape. **Ambio**. [S.l.], v. 37, p.324-6. 2008.

JARAMILLO, P. M. D., et al. Symbiotic nitrogen-fixing bacterial populations trapped from soils under agroforestry systems in the Western Amazon. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v. 70, p. 397-404. 2013.

JENKINSON, E. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 415-471.

JESUS, C.A.G. 2014. **Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM – MG)**. Brasil. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/dnpm/sumarios/ferro-sumario-mineral-2014>> Acesso em: 20 mar. 2018.

KUJUR, M.; PATEL, A. Comparative Assessment of Microbial Biomass and Soil Enzyme Activities as Potential Indicators of Soil Quality in Different Mine Spoil, Odisha. **Journal of Environment**, [S.l.], v.1, p. 67–74. 2012.

LAVELLE, P. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology**, v. 42 (Suppl. 1), S3–S15. 2006.

LI, G. et al. Precipitation affects soil microbial and extracellular enzymatic responses to warming. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.l.], v. 120, p. 212–221, 2018.

LIMA, A. S., et al. 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**, [S.l.], v. 319, p. 127–145. 2009.

LIN, T. et al. Potential of endophytic bacteria isolated from *Sophora alopecuroides* nodule in biological control against *Verticillium* wilt disease. **Australian Journal of Crop Science**, [S.l.], v. 7, p. 139–146, 2013.

LIU et al. The optimum temperature of soil microbial respiration: Patterns and controls. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.l.], v. 121, p. 35–42, 2018.

LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. Í.; MELO, W. J. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 132-138, 2011.

LOPES, A. A. C. et al. Interpretation of microbial soil indicators as a function of crop yield and organic carbon. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 77, n. 2, p. 461-472, 2013.

- LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. A career perspective on soil management in the Cerrado region of Brazil. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 137, p. 1-72, dec.2016.
- LYNN, T. M. et al. Influence of land use on bacterial and archaeal diversity and community structures in three natural ecosystems and one agricultural soil. **Arch Microbiol**, [S.l.], v. 199, p. 711–721. 2017.
- MANZONI, S. Flexible carbon-use efficiency across litter types and during decomposition partly compensates nutrient imbalances — results from analytical stoichiometric models. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 8, p. 1–15. 2017.
- MARTINY, J. B. H. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology** [S.l.], v. 4, n. 2, p. 102–112, 2006.
- MEDEIROS, E. V. et al. Soil organic carbon, microbial biomass and enzyme activities responses to natural regeneration in a tropical dry region in Northeast Brazil. **Catena**, [S.l.], v. 151, p. 137–146. 2017.
- MENDES, I. C. et al. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. **Plant Soil**, [S.l.], v. 359, p. 183–195. 2012.
- MENDES, I. C.; SOUSA, D. M. G.; REIS JUNIOR, F. B. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 32, p. 191–209, 2015.
- MENDES, L. W.; TSAI, S. M. Distinct taxonomic and functional composition of soil microbiomes along the gradient forest-restinga-mangrove in southeastern Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.l.], v.111, p. 101–114. 2018.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2. ed. Universidade Federal de Lavras, 2006.
- MUKHOPADHYAY, S. et al. Soil quality index for evaluation of reclaimed coal mine spoil. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 542, p. 540–550. 2016.
- MUÑOZ-ROJAS, M. et al. , ERICKSON, T.E., DIXON, K.W., MERRITT, D.J., 2016. Soil quality indicators to assess functionality of restored soils in degraded semiarid ecosystems. **Restoration Ecology**, [S.l.], v. 24, p. 43–52, 2016.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, [S.l.], v. 403, p. 853-858, 2000.
- NEVES, D. M. et al. Lack of floristic identity in campos rupestres—A hyperdiverse mosaic of rocky montane savannas in South America. **Flora**, [S.l.], p. 1-8, 2017.
- NOGUEIRA, R. E. et al. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 19, n. 3, Jul./Set. 2005.
- PASAYAT, M.; PATEL, A. K. Microbial population dynamics influence basal soil respiration and it's impact on mine spoil genesis in chronosequence iron mine overburden spoil. **Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 123-140, 2016.
- PEIX, A. et al. Bacterial Associations with Legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**. [S.l.], v. 34, p. 1-3, 17-42, 2015.

- PEIXOTO, R. S. et al. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.l.], v. 98, n. 3, p. 403-413, Oct. 2010.
- PENG, J. F. et al. The remediation of heavy metals contaminated sediment, **Journal of Hazardous Materials**. [S.l.], v. 161, p. 633-640. 2009.
- PONTES, J. S. et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 117-118, p. 178-189, 2017.
- QUADROS, P. D. et al. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 98, p. 195–203. 2016.
- RAMPELOTTO, P. H. et al. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian Savanna under different land use systems. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 66, n. 3, p. 593-607, 2013.
- RANGEL, W. M. et al. Draft genome sequence of *Mesorhizobium* sp. UFLA 01-765, a multitolerant, efficient symbiont and plant growth-promoting strain isolated from Zn-mining soil using *Leucaena leucocephala* as a trap plant. **Genome Announc**, [S.l.], v. 4(2):e00050-16. 2016.
- RATCLIFFE, S.; BOSMAN, B.; CARNOL, M. Spatial and temporal variability of biological indicators of soil quality in two forest catchments in Belgium. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 126, p. 148–159, 2018.
- RODRIGUES, M. et al. Legacy phosphorus and no tillage agriculture in tropical oxisols of the Brazilian savanna. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 542, p. 1050–1061, 2016.
- SÁ, J. C. M. et al. Soil carbon fractions and biological activity based indices can be used to study the impact of land management and ecological successions. **Ecological Indicators**, [S.l.], v. 84, p.96–105, 2018.
- SAHA, R. et al. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of Basic Microbiology**, [S.l.], v. 53, p. 303–317, 2013.
- SANTOS, J. V. et al. Soil biological attributes in arsenic-contaminated gold mining sites after revegetation. **Ecotoxicology**, [S.l.], v. 22, p. 1526–1537, 2013.
- SCHAEFER, C. E. G. R. et al. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. In: CARMO; F. F.; KAMINO, L. H. Y. **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: Áreas Prioritárias para a Conservação da Diversidade Geológica e Biológica, Patrimônio Cultural e Serviços Ambientais**. 3i Editora, Belo Horizonte, p. 77–102, 2015.
- SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J.C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, [S.l.], v. 98, p. 255-262, 2003.
- SKIRYCYZ, A. et al. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, [S.l.], v. 5, p. 1–9, 2014.
- SPARLING, G. P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, [S.l.], v. 30, p. 195–207, 1992.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Assay of urease activity in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.l.], v. 4, p. 479–487, 1972.

TABATABAI, M.A. BREMNER, J.M., 1970. Arylsulfatase Activity of Soils. **Soil Science Society of America, Proceedings**, [S.l.], v. 34, p. 225–229, 1970.

TEIXEIRA, A. F. S. et al. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings: Inoculum potential, density, and diversity of spores related to soil properties. **Ciência e Agotecnologia**, Lavras, v.41, n. 5, p. 511–525, 2017.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo In: ALVAREZ V. et al. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, pp. 195-276, 2002.

VARAJÃO, A. F. D. C. et al. Estudo da evolução da paisagem do Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais, Brasil) por meio da mensuração das taxas de erosão ( $^{10}\text{Be}$ ) e da pedogênese. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 5, p. 1409–1425, 2009.

VELÁZQUEZ, E. et al.. The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. In: KUMAR V. et al. **Probiotics and Plant Health**. Springer, Singapore, p 41-70, 2017.

VIEIRA, C. K. et al. 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**, China, p. 1–14, 2017.

VINCENT, R. D. C.; MEGURO, M. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 377-388, Jul./Sep. 2008.

WAGG, C. et al. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.l.], v. 111, p. 5266–5270. 2014.

WAHSHA, M. et al. Microbial enzymes as an early warning management tool for monitoring mining site soils. **Catena**, [S.l.], v. 148, p. 40–45, 2017.

WARDLE, D.A.; GHANI, A. A critique of the microbial metabolic quotient ( $q\text{CO}_2$ ) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. **Soil Biology & Biochemistry**, [S.l.], v. 27, p. 1601- 1610, 1995.

ZAK, D. R. et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? **Ecology**, [S.l.], v. 84, p. 2042–2050. 2003.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1** – Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysiognomies

Artigo aceito para publicação na revista Ecological Indicators

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.073>

Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the  
biological quality of adjacent phytophysionomies

Aline Oliveira Silva<sup>1</sup>; Amanda Monique da Costa<sup>1</sup>, Anita Fernanda dos Santos Teixeira<sup>1</sup>;  
Amanda Azarias Guimarães<sup>1</sup>; Jessé Valentim dos Santos<sup>1</sup>; Fatima Maria de Souza Moreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG, Brazil.

\*Corresponding author

E-mail address: [fmoreira@dcs.ufla.br](mailto:fmoreira@dcs.ufla.br)

Telephone number: +55 35 3829-1254

Abstract: Mining activities modify the landscape and may have severe environmental impacts. The degree of recovery or disturbance of these environments must be determined, and microbiological indicators are most sensitive for this evaluation. The aim of this study was to evaluate the soil microbiological attributes of an area rehabilitated after iron mining activities and evaluate the adjacent phytophysionomies. Soil samples were collected in a rehabilitated area revegetated with grass (RA) and in the phytophysionomies of ironstone outcrops (IO), of neotropical savanna (NS), and of Atlantic Forest (AF) in two climate seasons (dry and rainy). Microbial biomass carbon, soil respiration, and enzyme activities ( $\beta$ -glucosidase, acid and alkaline phosphatase, arylsulfatase, urease, fluorescein diacetate hydrolysis) were determined, and the metabolic coefficient ( $q\text{CO}_2$ ), the microbial coefficient ( $q\text{Mic}$ ), and specific enzyme activities were calculated. Analyses of variance, means testing, and principal component analysis between the soil microbiological and physicochemical attributes were carried out. The microbiological indicators differed according to the type of phytophysionomy and the season. Enzyme activities, microbial biomass,  $q\text{CO}_2$ , soil respiration, and  $q\text{Mic}$  were sensitive in indicating differences among the phytophysionomies, as well as organic carbon, total N, Fe, Cu, and  $\text{Al}^{3+}$  contents, pH, potential acidity, cation exchange capacity, and clay and sand contents. The IO and NS phytophysionomies exhibited the highest organic carbon and total N contents, whereas AF, NS, and IO exhibited the highest values of microbial biomass carbon. In both climate seasons, the AF exhibited higher values of soil respiration and enzyme activities. The Ironstone Outcrops exhibited high microbial biomass that was active in the processes of nutrient cycling, shown by its enzyme activities, whereas lower values of microbial biomass carbon and enzymes and higher values of  $q\text{CO}_2$  were observed in RA. Nevertheless, RA exhibited higher specific enzyme activities and higher  $q\text{Mic}$ , indicating that the process of revegetation with grass favors activity of the microbial community, and promotes recovery of this area.

Keywords: Bioindicators, climate season, ironstone outcrops, rehabilitated area, neotropical savanna, Atlantic forest.

## 1. Introduction

Human activity continuously affects the soil, leading to chemical, physical, and biological changes (Carvalho et al., 2016; Dary et al., 2010; Quadros et al 2016). Mining is among the human activities that have the most significant impact on ecosystems because it intensely modifies the local landscape in extraction, processing, storage for transport, or deposit of sterile wastes and tailings, bringing about changes in the soil, which becomes difficult to rehabilitate (Carneiro et al., 2008; Santos et al., 2013; Santos et al., 2016).

One of the areas of most intense iron mining activity in the world is the *Quadrilátero Ferrífero* (Ferriferous Quadrilateral) in south central Minas Gerais, Brazil. The quantity of mineral resources, especially iron ore, makes this an important region for world supply. The vegetation ecotones of the region are strongly conditioned by pedological characteristics, due to the presence of ferrous rocks (de Carvalho Filho et al. 2015; Varajão et al., 2009). The type of vegetation varies from open fields to forests, including ironstone outcrops, neotropical savanna, and Atlantic Forest, and it is a hotspot of biodiversity (Carmo and Jacobi, 2013; Hoffmann, Rodrigues, 2011; Skiryecz et al., 2014; Teixeira et al., 2017; Torres et al., 2017).

Verifying the diversity of vegetation and soil attributes that occur in this mining area is of extreme importance for evaluating processes of rehabilitation after mining activities (Santos et al., 2016; Skiryecz et al., 2014). Nevertheless, studies concerning diversity and microbial activity in these areas have been lacking. There have been several evaluations of fauna, flora, and soil in ferruginous soil areas (Carmo and Jacobi, 2013; de Carvalho Filho et al. 2010; de Carvalho Filho et al., 2015; Hoffmann and Rodrigues, 2011; Jacobi et al, 2008; Skiryecz et al., 2014; Takahasi and Meirelles, 2014; Varajão et al., 2009). However, studies related to soil microbiota and their activity in these mining areas throughout the world are still scarce (Cao et al., 2015; Castro et al., 2017; Kujur, Patel, 2012; Matias et al., 2009; Mingorance et al., 2017; Pasayat, Patel, 2016; Vieira et al., 2017).

Microbial activity plays a fundamental role in biogeochemical cycles, bringing about decomposition and mineralization of organic materials, thus maintaining ecological processes. Microbiological attributes are sensitive bioindicators of soil quality (Doran and Parkin, 1994; Karlen et al., 1997), and they are used to evaluate agricultural systems (Borges et al., 2014; Lammel et al., 2015; Lammel et al., 2017; Lopes et al., 2013) and soils rehabilitated after contamination with metals (Santos et al., 2013; Santos et al., 2016) and after coal and bauxite mining activities (Carneiro et al., 2008; Ciarkowska, et al., 2014; Claassens, et al., 2008; Mukhopadhyay, et al., 2016; Muñoz-Rojas et al, 2016; Upadhyay et al., 2017). Microbial

biomass, soil respiration,  $q\text{CO}_2$ , and  $q\text{Mic}$  have been widely evaluated in papers already mentioned and in others. Enzyme activities related to C, N, P, and S cycles are other important indicators (Medeiros et al., 2017; Mendes et al., 2012). This highlights the need for including soil microbiological indicators in studies related to evaluation of ferruginous soil areas affected by mining activities. This study makes an important contribution to evaluation of soil quality in these areas by integrating soil biological indicators with chemical and physical indicators.

The hypothesis tested is that soil microbiological indicators are sensitive in detecting significant changes in an area rehabilitated after iron mining activities and in the adjacent phytophysionomies. The aim is to evaluate recovery of the area changed by mining and evaluate the soil quality of adjacent phytophysionomies in two climate seasons by means of physicochemical and microbiological attributes of the soil, as well as verify which of these attributes are most sensitive for indicating disturbances in the environments evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Location of the experiment

The soil was collected in August 2015 (dry season) and in January 2016 (rainy season) in phytophysionomies in the municipality of Nova Lima, at the *Centro de Tecnologia de Ferrosos* (Miguelão), and in the municipality of Brumadinho, at the *Córrego do Feijão* mine of the Vale S.A. company, in the Quadrilátero Ferrífero in Minas Gerais in the Southeast region of Brazil. Climate in the region is Cwa according to the Köppen classification, with a dry winter and rainy summer. Mean annual temperature is from 19 to 22 °C, and mean annual rainfall is from 1100 to 1420 mm.

The phytophysionomies were described by Castro et al. (2017) as Ironstone Outcrops (IO), known as *canga*; Neotropical Savanna (NS) or Brazilian *Cerrado*; Atlantic Forest (AF); and a rehabilitated area revegetated with grass (RA). The RA was affected by mining activity through removal of its native vegetation (Atlantic Forest) for establishment of a pre-transport ore deposit area. When mining activity ceased in 2005, the rehabilitation project began, with planting of tree species (predominantly *Machaerium nycitans* and *Peltophorum dubium*, which did not survive successive fires from human activity), of grasses (*Panicum maximum* Jacq, *Brachiaria decumbens*, *Melinis minutiflora*), and of some leguminous plants (*Neonotonia wightii*, *Mimosa* sp., *Crotalaria juncea*). Currently, grasses predominate in the area and are considered as revegetation plants.

### 2.2. Soil sampling

The soil in each phytophysiognomy was sampled according to a sampling design of two transects at a distance of 50 m from one another. In each transect, five georeferenced points were separated by about 50 m, resulting in 10 points per phytophysiognomy, as shown in Fig. 1, which also shows the topographic moisture index of the sampled phytophysiognomies, obtained by the Geographic Information System. For each point, combined samples composed of five subsamples that were separated by five meters were collected at the depth of 0-0.20 m in a line transversal to the transect. All composite samples (each of 500 g) were stored in sterile plastic bags and immediately taken to the laboratory, where they were sieved (2 mm mesh) and kept at 4° C for 15 days before analysis. This procedure was the same for both sampling seasons.

Soil classes of the phytophysiognomies were Oxisol Plinthic (Brazilian Classification-*Plintossolo Pétrico*) in IO and NS; the AF exhibited a toposequence with Oxisol (Brazilian Classification-*Latossolo Vermelho* and *Latossolo Vermelho-Amarelo*;) and Inceptisols (Brazilian Classification-*Cambissolo Háplico*); and the RA was classified as an anthropic terrain, not considered as soil. Analyses of the chemical and physical attributes were carried out for the dry season (Castro et al., 2017) and rainy season (Table 1). Chemical and physical attributes were evaluated in 10 composite samples for each phytophysionomy. Biological attributes were analyzed in three analytical replicates per composite sample.

### 2.3.Determination of soil indicators

Organic carbon (Corg) was determined by oxidation with potassium dichromate in the presence of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, followed by titration of the excess of dichromate in the sample with a ferrous ammonium sulfate and diphenylamine indicator (1%) solution (Walkley and Black, 1934). Total nitrogen of the soil was determined according to the Kjeldahl method by steam distillation (Joergensen and Brookes, 1990).

Microbial biomass carbon (MBC) was determined from 20 g of soil irradiated in a microwave oven with a power supply of 120 V (60 Hz), frequency of 2450 MHz, and power concentration of 1.35 KW for three minutes to eliminate microorganisms and release cell components (Islam and Weil, 1998). After that, carbon was extracted with potassium sulfate (0.5 mol L<sup>-1</sup>), followed by oxidation with potassium dichromate (0.066 mol L<sup>-1</sup>) in the presence of acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) on a heating plate. After cooling, the solution was titrated with ferrous ammonium sulfate (0.033 mol L<sup>-1</sup>) in the presence of diphenylamine indicator (1%) (Vance et al., 1987).

Soil basal respiration was quantified by incubation of 20 g of soil in a hermetically sealed container for three days at a temperature of 28°C. The CO<sub>2</sub> released from the samples was captured by an NaOH solution (0.5 mol L<sup>-1</sup>), which was titrated with HCl (0.5 mol L<sup>-1</sup>) using phenolphthalein (1%) as an indicator (Anderson and Domsch, 1993). The metabolic quotient ( $q\text{CO}_2$ ) was calculated by the SBR/MBC ratio (Anderson and Domsch, 1993), and the microbial quotient ( $q\text{Mic}$ ) by the MBC/Corg expression (Sparling, 1992).

The activities of the enzymes  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) (Eivazi and Tabatabai, 1988), acid phosphatase and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.2) (Eivazi and Tabatabai, 1977), and arylsulfatase (EC 3.1.6.1) (Tabatabai and Bremner, 1970) were evaluated by incubation and read in a spectrophotometer at 410 nm. Soil samples of 1 g, containing 1 mL of substrate ( $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside for  $\beta$ -glucosidase,  $p$ -nitrophenyl-phosphate for acid phosphatase and alkaline phosphatase, and  $p$ -nitrophenyl-sulfate for arylsulfatase) were incubated for one hour at 37°C in the presence of toluene and buffer solution in pH specific for each activity (pH 6.0 for  $\beta$ -glucosidase, 6.5 for acid phosphatase, 11.0 for alkaline phosphatase, and 5.8 for arylsulfatase). After the incubation period, the reaction was interrupted with the addition of CaCl<sub>2</sub> (0.5 mol L<sup>-1</sup>) and NaOH (0.5 mol L<sup>-1</sup>). The supernatant was filtered (Whatman no. 42 paper), and then readings were made with a spectrophotometer.

Urease activity (EC 3.5.1.5) (Tabatabai and Bremner, 1972) was estimated from 5 g soil samples incubated for two hours at a temperature of 37°C in the presence of toluene, THAM buffer (0.05 mol L<sup>-1</sup>, pH 9.0), and urea solution (0.2 mol L<sup>-1</sup>). The reaction was interrupted with the addition of KCl-Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.5 mol L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>), and the solution was then shaken (150 rpm) for 30 minutes. After shaking, the solution was filtered and ammonium was determined by microdistillation (Keeney and Nelson, 1982).

Total enzyme activity of the soil was estimated by fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) (Dick et al., 1996) on 2.5 g soil samples incubated at a temperature of 37°C together with fluorescein solution (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>) in a sodium phosphate buffer (60 mmol L<sup>-1</sup> at pH 7.0) for 24 hours, with shaking at a speed of 50 rpm. After that, the reaction was interrupted with acetone (50%), and centrifugation was carried out for 5 minutes at 3000 rpm; the supernatant was filtered and reading was made in a spectrophotometer at 490 nm.

The specific activities of the enzymes in the soil samples were calculated by the ratio between the enzyme activities and the microbial biomass carbon, according to the methodology proposed by Waldrop et al. (2000).

Organic carbon was determined by oxidation with potassium dichromate in the presence of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  followed by titration of the excess of dichromate in the sample with a ferrous ammonium sulfate and diphenylamine indicator (1%) solution (Walkley and Black, 1934). Total nitrogen content in the soil was determined according to the Kjeldahl method by steam distillation (Joergensen and Brookes, 1990).

Microbial biomass carbon was determined from 20 g of soil irradiated in a microwave oven with a power supply of 120 V (60 Hz), frequency of 2450 MHz, and power concentration of 1.35 KW for three minutes to eliminate microorganisms and release cell components (Islam and Weil, 1998). After that, carbon was extracted with potassium sulfate ( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ), followed by oxidation with potassium dichromate ( $0.066 \text{ mol L}^{-1}$ ) in the presence of acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  and  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) on a heating plate. After cooling, the solution was titrated with ferrous ammonium sulfate ( $0.033 \text{ mol L}^{-1}$ ) in the presence of diphenylamine indicator (1%) (Vance et al., 1987).

Soil basal respiration (SBR) was quantified by incubating 20 g of soil in a hermetically sealed container for three days at  $28^\circ\text{C}$ . The  $\text{CO}_2$  released from the samples was captured by NaOH solution ( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ), which was titrated with HCl ( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ) using phenolphthalein (1%) as an indicator (Anderson and Domsch, 1993). The metabolic quotient ( $q\text{CO}_2$ ) was calculated by the SBR/MBC ratio (Anderson and Domsch, 1993), and the microbial quotient ( $q\text{Mic}$ ) by the MBC/Corg expression (Sparling, 1992).

The activities of the enzymes  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) (Eivazi and Tabatabai, 1988), acid phosphatase and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.2) (Eivazi and Tabatabai, 1977), and arylsulfatase (EC 3.1.6.1) (Tabatabai and Bremner, 1970) were evaluated by measuring optical density (O.D.) in spectrophotometer at 410 nm. Soil samples of 1 g, containing 1 mL of substrate ( $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside for  $\beta$ -glucosidase,  $p$ -nitrophenyl-phosphate for acid phosphatase and alkaline phosphatase, and  $p$ -nitrophenyl-sulfate for arylsulfatase) were incubated for one hour at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of toluene and buffer solution in pH specific for each activity (pH 6.0 for  $\beta$ -glucosidase, 6.5 for acid phosphatase, 11.0 for alkaline phosphatase, and 5.8 for arylsulfatase). After the incubation period, the reaction was stopped with the addition of  $\text{CaCl}_2$  ( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ) and NaOH ( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ). The supernatant was filtered (Whatman no. 42 paper), and then readings were taken using spectrophotometer.

Urease activity (EC 3.5.1.5) (Tabatabai and Bremner, 1972) was estimated from 5 g soil sample incubated for two hours at a temperature of  $37^\circ\text{C}$  in the presence of toluene, THAM buffer ( $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 9.0), and urea solution ( $0.2 \text{ mol L}^{-1}$ ). The reaction was stopped with the addition of  $\text{KCl-Ag}_2\text{SO}_4$  ( $2.5 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), and the solution was then shaken (150

rpm) for 30 minutes. After shaking, the solution was filtered and ammonium was determined by microdistillation (Keeney and Nelson, 1982).

Total enzyme activity of the soil was estimated by fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) (Dick et al., 1996) where 2.5 g soil sample was incubated at a temperature of 37°C together with fluorescein solution ( $C_{20}H_{12}O_5$  10 mg L<sup>-1</sup>) in a sodium phosphate buffer (60 mmol L<sup>-1</sup> at pH 7.0) for 24 hours, with shaking at a speed of 50 rpm. After that, the reaction was interrupted with acetone (50%), and centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm; the supernatant was filtered and O.D. was taken at 490 nm.

The specific activities of the enzymes in the soil samples were calculated by the ratio between the enzyme activities and the microbial biomass carbon, according to the methodology proposed by Waldrop et al. (2000).

#### 2.4. Statistical analyses

Results obtained for different tests were subjected to analysis of variance ( $p < 0.01$ ) and the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ) between phytophysiognomies and climatic seasons using the Sisvar statistical software (Ferreira, 2011). Principal component analysis (PCA) was carried out using the R software (R Development Core Team, 2011) to show the ordering of the phytophysiognomies and their relationship to the microbiological, chemical, and texture attributes of the soil; eigenvalues greater than 0.6 were considered as indicating high association of the principal components.

### 3. Results

The results of organic carbon and total nitrogen are shown in Figure 2, and microbial biomass carbon, soil basal respiration, and metabolic and microbial coefficients are shown in Table 2. The lowest values of organic carbon, total nitrogen, and microbial biomass carbon and the highest values of  $qCO_2$  and  $qMic$  were in RA, regardless of the season.

Table 3 shows the enzyme activity in the phytophysiognomies of the Cuadrilátero Ferrífero in the dry and rainy seasons. The most intense activity of the enzymes  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, urease, and FDA, regardless of the season evaluated, was in AF, whereas the lowest activity of the enzymes  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase was in RA.

Bioindicators increased in all the phytophysiognomies from the dry season to the rainy season (Table 2 and 3).

#### 3.1. Chemical and physical attributes of the soil

The chemical and soil texture parameters were not very different between the sampling seasons; they followed the same tendency in the dry season and rainy season (Table 1). The pH values ranged from 4.21 to 5.60 in the dry season and from 3.91 to 5.36 in the rainy season, with high values in RA and low values in AF, regardless of the season evaluated ( $p < 0.05$ ). The high values of base saturation were also in RA ( $p < 0.05$ ), probably due to the revegetation process with liming and fertilization for the planting of soil cover plants. AF had the highest exchangeable aluminum contents, as well as aluminum saturation in both sampling seasons. IO had the highest Fe contents (403.72 mg dm<sup>-3</sup> in the dry season and 446.32 mg dm<sup>-3</sup> in the rainy season) ( $p < 0.05$ ); these contents were more than double the contents found in the other areas evaluated. IO and NS had the highest organic matter contents in the soil, while the clay contents were highest in AF, followed by NS, with the lowest contents for RA and IO ( $p < 0.05$ ).

Organic carbon showed the same tendency in the dry and rainy seasons, where IO and NS had the highest values, followed by AF and RA ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2). In contrast, total nitrogen exhibited the highest values in IO, followed by NS, AF, and RA in both seasons.

### 3.2. Microbial biomass carbon, soil respiration, and metabolic and microbial coefficients

Microbial biomass carbon varied among the phytophysiognomies evaluated, from 272.98 to 862.07 mg kg<sup>-1</sup> C in the dry season and from 321.69 to 861.69 mg kg<sup>-1</sup> C in the rainy season (Table 2). In the dry season, NS had the highest values of microbial biomass carbon, followed by AF and IO. In the rainy season, the highest volume of microbial biomass carbon was in AF, followed by NS and OI, which did not differ significantly ( $p < 0.01$ ). RA had microbial biomass carbon values as little as one third of the values of microbial biomass carbon observed in the other phytophysiognomies evaluated. Carbon was found to increase in the rainy season for all phytophysiognomies except for NS (Table 2).

Soil basal respiration was the highest in AF in the dry season. In the rainy season, soil basal respiration was highest in AF and RA ( $p < 0.01$ ) (Table 2). There were increases in the soil respiration rates in the rainy season; this shows the high metabolic activity of the microbiota in this season.

The metabolic coefficient ranged from 18.84 to 48.39 mg h<sup>-1</sup> C-CO<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> microbial C in the dry season, and from 60.87 to 155.15 mg h<sup>-1</sup> C-CO<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> microbial C in the rainy season (Table 2). The  $q_{CO_2}$  was highest in RA in both seasons. The increase in soil respiration in the rainy season raised the  $q_{CO_2}$  values in all the phytophysiognomies. The  $q_{Mic}$  was highest in RA for both seasons (Table 2).

### 3.3. Enzyme activities

The  $\beta$ -glucosidase enzyme values ranged from 34.93 to 87.66 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, with the highest values for AF and NS. In the rainy season, variation in  $\beta$ -glucosidase activity was from 48.01 to 128.94 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, with results in the following decreasing order: AF, NS, IO, and RA. Furthermore,  $\beta$ -glucosidase activity was greater in the rainy season for all the phytophysiognomies (Table 3).

Acid phosphatase activity in the dry season was higher in AF and NS, which was approximately ten times greater than the value found in RA, which had the lowest activity of this enzyme among the phytophysiognomies. In the rainy season, AF was the phytophysiognomy with the highest value of acid phosphatase activity, with 84.18 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, followed by NS, and then RA and IO, which did not differ ( $p < 0.01$ ) (Table 3). The values for alkaline phosphatase ranged from 71.98 to 163.52 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the dry season, and from 53.48 to 144.47 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the rainy season (Table 3). AF had the highest values of alkaline phosphatase activity, and RA had the lowest values.

Arylsulfatase had higher values of activity in the IO in the dry season, followed by AF, RA, and NS. In the rainy season, AF had the highest activity of this enzyme, followed by IO, NS, and RA (Table 3). In evaluation of urease enzyme activity, AF had the highest values in both seasons, and the other phytophysiognomies did not differ among themselves in the dry season ( $p < 0.01$ ), whereas in the rainy season, IO had the lowest value of activity for this enzyme (Table 3).

Total enzyme activity estimated by FDA ranged from 20.16 to 51.30 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the dry season, and from 49.40 to 85.70 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the rainy season, with the highest values in AF, regardless of the season evaluated ( $p < 0.01$ ). There was an increase in FDA activity in the rainy season, which was approximately double that of the dry season, for all the phytophysiognomies (Table 3).

The specific enzyme activities, expressed in mg h<sup>-1</sup> of product of each enzyme mg<sup>-1</sup> C, are shown in Fig. 3. The specific activities of  $\beta$ -glucosidase were higher ( $p < 0.01$ ) in RA, IO, and AF in the dry season. However, IO was lower ( $p < 0.01$ ) than the other areas in the rainy season.

AF had higher specific acid phosphatase in the two seasons. The values of specific alkaline phosphatase did not differ among the phytophysiognomies in either season ( $p < 0.01$ ) (Fig 3). The specific activity of arylsulfatase was higher in RA in the dry season and in AF in the rainy season.

Specific urease was highest in RA and AF in the dry season, but in the rainy season, RA was highest. The specific FDA was highest in RA in both seasons (Fig. 3), with increases in its specific activity in the rainy season for all the phytophysiognomies.

### 3.4. Relations among the soil attributes

The result of PCA among the microbiological, chemical, and soil texture attributes explained 63.23% (PC1 46.33% and PC2 16.90%) of data variance in the dry season, and 69.11% (PC1 43.39% and PC2 25.72%) in the rainy season (Table 4, Fig. 4). The correlation matrix of the combined data separated the phytophysiognomies in different groups in both collection seasons (Fig. 4. a and b).

During the dry season,  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, microbial biomass carbon, soil basal respiration, organic carbon, total nitrogen,  $qCO_2$ , pH,  $Al^{3+}$ , H+Al, CEC,  $CEC_{pH7.00}$ , V%, m%,  $Cu^{2+}$ , and clay content were the variables that had influenced PC1 the most, and the values of  $Fe^{2+}$  and sand content had influenced PC2 mostly (Table 4). The phytophysiognomies were separated and clustered by their soil characteristics, e.g., in IO, higher contents of  $Fe^{2+}$ , sand content, and  $Mn^{2+}$  separated this phytophysiognomy from the others. The NS was separated by high organic carbon, total nitrogen, microbial biomass carbon, potential acidity,  $CEC_{pH7.00}$ ,  $Al^{3+}$ , and m%. For the AF cluster, enzyme activities, soil basal respiration, and clay contents were preponderant. RA was isolated from the other phytophysiognomies, characterized by its higher values of  $qMIC$ , pH, base saturation,  $qCO_2$ , and  $Cu^{2+}$  (Fig. 4.a.).

In the rainy season, the variables that influenced PC1 majorly were  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, microbial biomass carbon, organic carbon, total nitrogen,  $qCO_2$ ,  $qMIC$ , pH,  $Al^{3+}$ , H+Al, CEC,  $CEC_{pH7.00}$ , V%, m%,  $Cu^{2+}$ , S and clay content, whereas PC2 was influenced by FDA, arylsulfatase, urease, soil basal respiration,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , and sand content (Table 4). In phytophysiognomy clustering, the variables that characterized and separated the groups tended to be similar to those in the dry season (Fig. 4.b.). IO was notably influenced by its high contents of  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , and sand content, whereas the NS was clustered by the values of total nitrogen, organic carbon,  $CEC_{pH7.00}$ , H+Al, and alkaline phosphatase in the soil. The AF phytophysiognomy was more influenced by the values of microbial biomass carbon, all the enzyme activities, soil basal respiration, clay content,  $Al^{3+}$ , and m%, whereas in the RA, clustering of the points was influenced by high contents of  $qMIC$ , S, V%, pH,  $Cu^{2+}$ , and  $qCO_2$  (Fig. 4.b.).

## 4. Discussion

The soil microbiological attributes were sensitive in showing differences in phytophysiognomies under the influence of iron mining activity in the Quadrilátero Ferrífero (Tables 1, 2; Fig. 2). Bioindicators respond to changes in soil cover (Medeiros et al 2015; Sá et al., 2018; Villani et al., 2017) and are important tools in monitoring the impact of changes in soil use (Dilly et al., 2018).

The increase in soil biomass, respiration, and enzyme activities in the rainy season (Table 2 and 3) was probably in accordance with an increase in temperature and plant vigor in the rainy season. The Quadrilátero Ferrífero has two well-defined climate seasons, a dry winter and rainy summer, and this climatic seasonality influences vegetation and microbiota. The microbial community is highly sensitive to the direct and indirect effects of changes over the seasons and the variation in soil moisture (Esch et al. 2016; Faucon et al., 2017; Ren et al., 2017). Corroborating these results, Carneiro et al. (2008), Chaer et al. (2009), Mendes et al. (2012), Paulucio et al. (2017), and Villani et al. (2017) also observed higher biomass values and enzyme activities in the rainy seasons.

The high values of Corg and organic matter in IO (Table 1, 2) are common in these rupestrian fields, with the particularity of having “islands of soil” in the midst of rock outcroppings (Carvalho et al., 2012; de Carvalho Filho et al., 2010; Takahasi and Meirelles, 2014), which accumulate more organic matter than the adjacent areas. The soils of the *canga* are shallow and have high Fe contents in their chemical and mineralogical composition, characterized by limitations to infiltration and to water storage (de Carvalho Filho et al.; 2010; de Carvalho Filho et al., 2015; Varajão et al., 2009). These characteristics can favor species endemism and biodiversity different from other phytophysiognomies (Cao et al., 2015; Castro et al., 2017; Skiryecz et al., 2014; Vieira et al., 2017, Teixeira et al. 2017).

The characteristics of the phytophysiognomies and the organic matter content in the soil influenced microbial biomass carbon, with higher values for the AF and NS phytophysiognomies in both seasons; however, in the rainy season, NS did not differ from OI (Fig. 2). With the increase in plant diversity in the phytophysiognomies, there is an increase in the diversity of exudates from roots and from plant litter, which provides more substrates to microorganisms, resulting in a more active and abundant microbial community (Ball et al., 2014; Eisenhauer et al., 2010; Esch et al. 2016; Lange et al., 2014; Santos et al., 2013; Wahsha et al., 2017).

Our results confirm that the IO, or *canga*, is a highly complex environment, with a significantly active microbial biomass, indicated by its high enzyme activities, although these activities are lower than in the other phytophysiognomies (AF and NS). The *canga* is a

hotspot of biodiversity and a potential phytophysiognomy for ore extraction. Therefore, this highlights the importance of studying and understanding aspects of its biodiversity and ecological dynamics to assist in rehabilitation projects because once an environment is exposed to mineral extraction, recovery is difficult.

The RA had the lowest values of organic carbon, microbial biomass, and enzyme activities (Fig. 2, Table 2 and 3) and, in spite of the low values of Corg found in RA ( $8.0 \text{ g kg}^{-1}$ ), they were still higher than the results of Kujur and Patel (2012) ( $1.74 \text{ g kg}^{-1}$ ) in areas after Fe mining activity. The lower values of MBC are similar to those found by Silva et al. (2012) in Atlantic Forest in the Northeast of Brazil. However, they are inverted in relation to the collection seasons ( $200 \text{ mg kg}^{-1}$  in the rainy season, and around  $325 \text{ mg kg}^{-1}$  in the dry season). Our values were also similar to those found by Silva et al. (2014) in agricultural areas under conventional tillage with crop succession.

The higher values of  $q\text{CO}_2$  in RA show that microorganisms in this soil spend more energy in maintaining the microbial community and little in its growth (Carneiro et al., 2008). However, the higher values of  $q\text{Mic}$  in RA indicate that, in spite of the low values of Corg, most of these fractions are very active in this phytophysiognomy, which indicates advances in the rehabilitation process for recovery of this soil.

The enzyme activities of  $\beta$ -glucosidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, arylsulfatase, and FDA were similar in characterization of the phytophysiognomies, and had sensitivity to show the differences (Table 3). Our results are in agreement with other results in the literature that show enzymes as efficient tools for evaluating soil quality under different management practices (Dilly et al., 2018; Medeiros et al., 2015; Sá et al., 2018; Venson et al., 2017; Vinhal-Freitas et al., 2017) and soils rehabilitated after mining bauxite (Carneiro et al., 2008), coal (Ciarkowska et al., 2014; Finkenbein et al., 2013; Wahsha et al., 2017), and gold (Santos et al., 2013).

The  $\beta$ -glucosidase activity was greater in AF (Table 3). This enzyme is sensitive to the type of vegetation and is a good indicator of the quality of soil organic matter (Cenini et al., 2015; Cenini et al., 2016; Lopes et al., 2013). The lower values of  $\beta$ -glucosidase found in RA in the dry and rainy seasons are similar to the values found by Cherubim et al. (2016) in pasture areas with collection in the rainy season ( $39.8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

The phytophysiognomies studies had higher values of alkaline phosphatase than acid phosphatase for both seasons, even in soils with very acidic pH, such as in AF, NS, and IO, differing from the results of Mendes et al. (2012), with higher values of acid phosphatase in acidic soils of the *Cerrado*. In general, in all the phytophysiognomies, arylsulfatase showed

low activity, which may be explained by adequate S contents in the soil (Tables 1 and 3). The arylsulfatase activity exhibits the organic sulfur dynamic in the soil, showing the potential for cycling sulfur and indicating local microbial activity (Medeiros et al., 2017; Sá et al. 2018); however, this enzyme tends to have lower activity in soils with good S availability (Mendes et al., 2012).

The urease and FDA activities were influenced by differences in the phytophysiognomies, with high values in the AF (Table 3). Urease and FDA activities are strongly dependent on organic matter contents, on the quantity of exudates from roots, and on plant litter from the diverse plant species (Chaer et al., 2009; Ciarkowska et al., 2014), and they are indicators of N content and N availability to plants and of microbiota activity (Ianelli et al., 2012; Medeiros et al., 2015). Although RA showed lower urease activity in the dry season, these values are similar to those found by Santos et al. (2016) in a pasture area with *Brachiaria* ( $\sim 5.7 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). The lower values of FDA in NS and RA in the dry season were similar to the values obtained by Chaer et al. (2009) in a conventional tillage system ( $29.57 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and for Atlantic Forest ( $35.93 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) in sample collection in the rainy season.

Higher specific enzyme activities per microbial biomass carbon in RA (Fig. 3) show that the rehabilitation process is effective since the local microbial population is metabolically active, reestablishing adequate soil functions; the more active the microbiota, the greater nutrient cycling in the soil will be (Medeiros et al., 2015; Medeiros et al.; 2017; Raiesi, Beheshti 2014; Trannin et al. 2007).

PCA showed that the soil attributes contributed in a different way toward clustering of the phytophysiognomies (Fig. 4), as seen in the clusterings of RA in both seasons, which was influenced by higher values of pH, V%,  $q\text{Mic}$ ,  $q\text{CO}_2$ , and  $\text{Cu}^{2+}$ . The revegetation process aims at improving soil characteristics, such as increasing pH and base saturation, which directly favors the local microbial community by an increase in the plant root system, C input, and consequent improvement in soil aggregation. Soil pH is one of the attributes that most affects soil microbial diversity (Carvalho et al., 2016; Teixeira et al., 2017) and favors microbiota growth, which assists in soil recovery, as observed for RA through the diversity of nitrogen fixing bacteria (Castro et al., 2017) and arbuscular mycorrhizal fungi (Teixeira et al., 2017; Vieira et al., 2017).

The exchangeable aluminum content was one of the chemical attributes that most contributed to spatial distribution of the phytophysiognomies AF and NS, whereas for the IO phytophysiognomy, clustering occurred in accordance with its higher contents of Fe, Mn, Zn,

and sand content (Fig. 4). It has been reported that soils of the Quadrilátero Ferrífero have high  $\text{Al}^{3+}$  contents due to the main pedological processes that occur there (de Carvalho Filho et al.; 2010; de Carvalho Filho et al., 2015).

The results presented in this study confirm that bioindicators of soil quality are sensitive in evaluating the dynamic of the soil rehabilitation process after Fe mining activity. In our study, we found that the RA has adequate enzyme activity, confirming the efficacy of the rehabilitation process. In addition, we showed how soil bioindicators are important in characterization of a phytophysiognomy as sensitive and unique as the *canga*. In general, the highest plant diversity in the phytophysiognomy (AF>NS>IO>RA) was related to the highest values of biological indicators, regardless of soil class.

## 5. Conclusions

Microbiological attributes indicate differences among the phytophysiognomies and the seasons studied. In general, in the rainy season, the highest values of soil respiration,  $q\text{CO}_2$ , and enzyme activities are found.

The Atlantic Forest, the neotropical savanna, and the ironstone outcrops show higher microbial biomasses and enzyme activities in relation to the area affected by mining.

The soil microbiological attributes that are most sensitive in differentiating phytophysiognomies, both in the rainy season and dry season, were in the following decreasing order: microbial biomass carbon, enzyme activities ( $\beta$ -glucosidase, alkaline phosphatase, acid phosphatase, arylsulfatase, FDA), specific enzyme activities per microbial biomass carbon,  $q\text{CO}_2$ , soil basal respiration, and  $q\text{Mic}$ .

The physicochemical attributes of the soil most sensitive in differentiating the phytophysiognomies of the Quadrilátero Ferrífero, both in the rainy season and dry season, were organic carbon,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , pH, CEC, sum of bases, potential acidity, clay content, and sand content.

The rehabilitated area revegetated with grass has an active microbiota in the process of soil recovery after mining activities, shown by its high specific enzyme activity.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided for the project CRA-RDP-00136-10 (Fapemig/Fapesp/Fapespa/VALE S.A), and wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq), and the Fundação de Amparo a Pesquisa

de Minas Gerais (Fapemig) for the financial support and scholarships granted to the authors. We also thank Teotonio Soares de Carvalho for valuable help in multivariate analysis, and Sérgio Henrique Godinho Silva for help in making the map.

## 6. Bibliographical References

- Alvarez V., V.H., Fonseca, D.M., 1990. Definição de doses de fósforo para determinação da capacidade máxima de adsorção de fosfato e ensaios de casa de vegetação. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 14, 49–55.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1993. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25, 393–395, doi:10.1016/0038-0717(93)90140-7
- Ball, B.A., Carrillo, Y., Molina, M., 2014. The influence of litter composition across the litter-soil interface on mass loss, nitrogen dynamics and the decomposer community. *Soil Biol. Biochem.* 69, 71–82. doi:10.1016/j.soilbio.2013.10.048
- Borges, L.A.B., Ramos, M.L.G., Vivaldi, L.J., Fernandes, P.M., Madari, B.E., Soares, R.A.B., Fontoura, P.R., 2014. Impact of sugarcane cultivation on the biological attributes of an oxisol in the Brazilian Savannah. *Biosci. J.* 30, 1459–1473.
- Bouyoucos, G.J., 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soil. *Soil Sci. Soc. Am. Journal.* 43, 434–437.
- Cao, Y., Chen, F., Li, Y., Wei, S., Wang, G., 2015. *Paenibacillus ferrarius* sp. nov., isolated from iron mineral soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 165–170. doi:10.1099/ijms.0.063552-0
- Carmo, F.F., Jacobi, C.M., 2013. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. *Rodriguesia* 64, 527–541. doi:10.1590/S2175-78602013000300005
- Carneiro, M.A.C., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., Soares, A.L.L., 2008. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronosseqüências de reabilitação após a mineração de bauxita. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 32, 621–632. doi:10.1590/S0100-06832008000200017
- Carvalho, F., Souza, F.A., Carrenho, R., Moreira, F.M.S., Jesus, E.C., Fernandes, G.W., 2012. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 52, 9–19. 2012. doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.001
- Carvalho, T.S., Jesus, E.C., Barlow, J., Gardner, T.A., Soares, I.C., Tiedje, J.M., Moreira, F.M.S., 2016. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology*, v. 97, p. 2760–2771. 2016.
- Castro, J.L., Souza, M.G., Rufini, M., Guimarães, A.A., Rodrigues, T.L., Moreira, F.M.S., 2017. Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 41, 1–20. doi:10.1590/18069657rbcs20160525
- Cenini, V.L., Fornara, D.A., McMullan, G., Ternan, N., Carolan, R., Crawley, M.J., 480 Clément, J.C., Lavorel, S., 2016. Linkages between extracellular enzyme activities and the carbon and nitrogen content of grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* 96, 198–206. doi:10.1016/j.soilbio.2016.02.015 483
- Cenini, V.L., Fornara, D.A., McMullan, G., Ternan, N., Lajtha, K., Crawley, M.J., 2015. Chronic nitrogen fertilization and carbon sequestration in grassland soils: evidence of a microbial enzyme link. *Biogeochemistry* 126, 301–313. doi:10.1007/s10533-015-0157-5

- Chaer, G., Fernandes, M., Myrold, D., Bottomley, P., 2009. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microb. Ecol.* 58, 414–424. doi:10.1007/s00248-009-9508-x
- Cherubin, M.R., Karlen, D.L., Cerri, C.E.P., Franco, A.L.C., Tormena, C.A., Davies, C.A., Cerri, C.C., 2016. Soil quality indexing strategies for evaluating sugarcane expansion in Brazil. *PLoS One* 11, 1–26. doi:10.1371/journal.pone.0150860
- Ciarkowska, K., Solec-Podwika, K., Wieczorek, J., 2014. Enzyme activity as an indicator of soil-rehabilitation processes at a zinc and lead ore mining and processing area. *J. Environ. Manage.* 132, 250–256. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.10.022
- Claassens, S., Jansen Van Rensburg, P.J., Maboeta, M.S., Van Rensburg, L., 2008. Soil microbial community function and structure in a post-mining chronosequence. *Water, Air, Soil Pollut.* 194, 315–329. doi:10.1007/s11270-008-9719-7
- Dary, M., Chamber, P.M.A., Palomares, A.J., Pajuelo, E., 2010. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater.* 177, 323–330 doi:10.1016/j.jhazmat.2009.12.035
- De Carvalho Filho, A., Curi, N., Shinzato, E., 2010. Relações solo-paisagem no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 45, 903–916. doi:10.1590/s0100-204X2010000800017
- De Carvalho Filho, A., Inda, A.V., Fink, J.R., Curi, N., 2015. Iron oxides in soils of different lithological origins in Ferriferous Quadrilateral (Minas Gerais, Brazil). *Appl. Clay Sci.* 118, 1–7. doi:10.1016/j.clay.2015.08.037
- Dick, R.P.; Breakwell, D.P., Turco, R.F., 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: Doran, J.W. & Jones, A.J., eds. *Methods for assessing soil quality.* Madison, Soil Sci. Soc. Am. 247–272.
- Dilly, O., Pompili, L., Benedetti, A., 2018. Soil micro-biological indicators separated land use practices in contrast to abiotic soil properties at the 50 km scale under summer warm Mediterranean climate in northern Italy. *Ecol. Indic.* 84, 298–303. doi:10.1016/j.ecolind.2017.08.013
- Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994 Defining and assessing soil quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A., eds. *Defining soil quality for a sustainable environment.* Madison, Soil Sci. Soc. Am. 1–20.
- Eisenhauer, N., Bessler, H., Engels, C., Gleixner, G., Habekost, M., Milcu, A, Partsch, S., Sabais, A.C.W., Scherber, C., Steinbeiss, S., Weigelt, A, Weisser, W.W., Scheu, S., 2010. Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. *Ecology* 91, 485–496. doi:10.1890/08-2338.1
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, 601–606. doi:10.1016/0038-0717(88)90141-1
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 9, 167–172. doi:10.1016/0038-0717(77)90070-0
- Esch, E.H., Lipson, D., Cleland, E.E., 2017. Direct and indirect effects of shifting rainfall on soil microbial respiration and enzyme activity in a semi-arid system. *Plant Soil* 411, 333–346. doi:10.1007/s11104-016-3027-6
- Faucon, M.-P., Houben, D., Lambers, H., 2017. Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services. *Trends Plant Sci.* 22, 385–394. doi:10.1016/j.tplants.2017.01.005
- Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. agrotec.* 35, 1039–1042.
- Finkenbein, P., Kretschmer, K., Kuka, K., Klotz, S., Heilmeyer, H., 2013. Soil enzyme activities as bioindicators for substrate quality in revegetation of a subtropical coal mining dump. *Soil Biol. Biochem.* 56, 87–89. doi:10.1016/j.soilbio.2012.02.012

Hoefl, R.G, Walsh, L.M., Kenney, D.R., 1973 Evaluation of various extractants for available soil sulfur. *Soil Sci. Soc. Am. Journal* 37, 401–411.

Hoffmann, D., Rodrigues, M., 2011. Breeding biology and reproductive success of *Polystictus superciliaris* (Aves: Tyrannidae), an uncommon tyrant-flycatcher endemic to the highlands of eastern Brazil. *Zool. (Curitiba, Impresso)* 28, 305–311. doi:10.1590/S1984-46702011000300004

Ianelli, R., Bianchi, V., Macci, C., Peruzzi, E., Chiellini, C., Petroni, G., Masciendaro, G., 2012. Assessment of pollution impact on biological activity and structure of seabed bacterial communities in the Port of Livorno (Italy). *Sci Total Environ.* 426, 56–64. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.033

Islam, K.R., Weil, R.R., 1998. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biol Fert Soils* 27, 408–416. doi:10.1007/s003740050

Jacobi, C.M., Carmo, F.F., Vincent, R.D., 2008. Estudo Fitossociológico De Uma Comunidade Vegetal Sobre Canga Como Subsídio Para a Reabilitação De Áreas Mineradas No Quadrilátero Ferrífero, Mg. *Rev. Arvore* 32, 345–353. doi:10.1590/S0100-67622008000200017

Karlen, D.L., Andrews, S.S., Doran, J.W., 2001. Soil quality: Current concepts and applications. *Adv. Agron.* 74, 1–40. doi:10.1016/S0065-2113(01)74029-1

Keeney, D.R., Nelson, D.W., 1982 Nitrogen organic forms. In: PAGE, A.L., ed. *Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties*. 2.ed. Madison, Soil Sci. Soc. Am. 643–698.

Kujur, M., Patel, A., 2012. Comparative Assessment of Microbial Biomass and Soil Enzyme Activities as Potential Indicators of Soil Quality in Different Mine Spoil, Odisha. *J. Environ.* 1, 67–74.

Joergensen, R.G., Brookes, P.C., 1990. Ninhydrin-Reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 mol L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soils extracts. *Soil Biol. Biochem.* 22, 1023–1027. doi: 10.1016/0038-0717(90)90027-W

Lammel, D.R., Butterbach-Bahl, K., Cerri, C.E.P., Louis, S., Feigl, B.J., Cerri, C.C., 2017. C and N stocks are not impacted by land use change from Brazilian Savanna (Cerrado) to agriculture despite changes in soil fertility and microbial abundances *J Plant Nutr.* 67/212, 1–10. doi:10.1002/jpln.201600614

Lammel, D.R., Nüsslein, K., Tsai, S.M., Cerri, C.C., 2015. Land use, soil and litter chemistry drive bacterial community structures in samples of the rainforest and Cerrado (Brazilian Savannah) biomes in Southern Amazonia. *Eur J Soil Biol.* 66, 32–39. doi:10.1016/j.ejsobi.2014.11.001

Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C.A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R.I., MelladoVázquez, P.G., Malik, A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B.C., Trumbore, S.E., Gleixner, G., 2015. Plant diversity drives soil carbon storage by increased soil microbial activity. *Nat. Commun.* 6: 6707, 1–8. doi:10.1038/ncomms7707

Lange, M., Habekost, M., Eisenhauer, N., Roscher, C., Bessler, H., Engels, C., Oelmann, Y., Scheu, S., Wilcke, W., Schulze, E.D., Gleixner, G., 2014. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0096182

Lopes, A.A.C., Sousa, D.M.G, Chaer, G.M., Reis Junior, F.B., Goedert, W.J., Mendes, I.C., 2013. Interpretation of microbial soil indicators as a function of crop yield and organic carbon. *Soil Sci. Soc. Am. Journal* 77, 461–472. doi:10.2136/sssaj2012.0191

Matias, S.R., Pagano, M.C., Muzzi, F.C., Oliveira, C.A., Carneiro, A.A., Horta, S.N., Scotti, M.R., 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. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 259–266. doi:10.1016/j.ejsobi.2009.02.003

- Mclean, E.O. et al. 1958. Aluminum in soils: I. Extraction Methods and Magnitudes in Ohio Clays and Soils 1. Soil Sci. Soc. Am. Journal 22, 382.
- Medeiros, E.V., Duda, G.P., Santos, L.A.R., Lima, J.R.S., Almeida-Cortéz, J.S., Hammecker, C., Lardy, L., Cournac, L., 2017. Soil organic carbon, microbial biomass and enzyme activities responses to natural regeneration in a tropical dry region in Northeast Brazil. *Catena* 151, 137–146. doi:10.1016/j.catena.2016.12.012
- Medeiros, E.V., Notaro, K.A., Barros, J.A., Moraes, W.S., Silva, A.O., Moreira, K.A., 2015. Absolute and specific enzymatic activities of sandy entisol from tropical dry forest, monoculture and intercropping areas. *Soil Tillage Res.* 145, 208–215. doi:10.1016/j.still.2014.09.013
- Mehlich, A., 1953. Determination of P, Ca, Mg, K, Na and NH<sub>4</sub>. Raleigh: North Carolina Soil Testing Division, 195.
- Mendes, I.C., Sousa, D.M.G., Reis Junior, F.B., 2015. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. *CC&T*, 32, 191–209.
- Mendes, I.C., Fernandes, M.F., Chaer, G.M., Reis Junior, F.B., 2012. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant Soil* 359, 183–195. doi:10.1007/s11104-012-1195-6
- Mingorance, M.D., Peña, A., Guzmán, I., Oliva, S. R., 2017. Influence of compost of sewage sludge and low-quality water on pesticide uptake by tomato plants grown in an iron mine soil. *J. Soils Sediments* 17, 1301–1309. doi:10.1007/s11368-015-1232-1
- Mukhopadhyay, S., Masto, R.E., Yadav, A., George, J., Ram, L.C., Shukla, S.P., 2016. Soil quality index for evaluation of reclaimed coal mine spoil. *Sci. Total Environ.* 542, 540–550. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.035
- Muñoz-Rojas, M., Erickson, T.E., Dixon, K.W., Merritt, D.J., 2016. Soil quality indicators to assess functionality of restored soils in degraded semiarid ecosystems. *Restor. Ecol.* 24, S43–S52. doi:10.1111/rec.12368
- Pasayat, M. Patel, A.K., 2016. Microbial population dynamics influence basal soil respiration and it's impact on mine spoil genesis in chronosequence iron mine overburden spoil. *JIPBS* 3, 123–140.
- Paulucio, V.D.O., Silva, C.F., Martins, M.A., Pereira, M.G., Schiavo, J.A., Rodrigues, L.A., 2017. Reforestation of a Degraded Area with *Eucalyptus* and *Sesbania*: Microbial Activity and Chemical Soil Properties. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 41, 1–14. doi:10.1590/0034-7345-2016-0239.
- Quadros, P.D. de, Zhalnina, K., Davis-Richardson, A.G., Drew, J.C., Menezes, F.B., Camargo, F.A. de O., Triplett, E.W., 2016. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Appl. Soil Ecol.* 98, 195–203. doi:10.1016/j.apsoil.2015.10.016
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2011. Available at: URL <http://www.r-project.org>.
- Raiesi, F., Beheshti, A., 2014. Soil specific enzyme activity shows more clearly soil responses to paddy rice cultivation than absolute enzyme activity in primary forests of northwest Iran. *Appl. Soil Ecol.* 75, 63–70. doi:10.1016/j.apsoil.2013.10.012
- Raij, B. Van et al., 2001. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 284.
- Ren, C., Zhao, F., Shi, Z., Chen, J., Han, X., Yang, G., Feng, Y., Ren, G., 2017. Soil Biology & Biochemistry Differential responses of soil microbial biomass and carbon-degrading enzyme activities to altered precipitation. *Soil Biol. Biochem.* 115, 1–10. doi:10.1016/j.soilbio.2017.08.002
- Sá, J.C.M., Gonçalves, D.R.P., Ferreira, L.A., Mishra, U., Inagaki, T.M., Furlan, F.J.F., Moro, R.S., Floriani, N., Briedis, C., Ferreirai, A.O., Soil carbon fractions and biological

activity based indices can be used to study the impact of land management and ecological successions. *Ecol. Indic.* 84, 96–105. doi:10.1016/j.ecolind.2017.08.029

Santos, C.A., Krawulski, C.C., Bini, D., Goulart Filho, T., Knob, A., Medina, C.C., Andrade Filho, G., Nogueira, M.A., 2015. Reclamation status of a degraded pasture based on soil health indicators. *Sci. Agr.* 72, 195–202. doi:10.1590/0103-9016-2013-0274

Santos, J.V., Varón-López, M., Soares, C.R.F.S., Leal, P.L., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., 2016 Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. *Environ. Sci Pollut R.* 23, 6735–6748. doi:10.1007/s11356-015-5904-6

Santos, J.V., Rangel, W.M., Guimarães, A.A., Jaramillo, P.M.D., Rufini, M., Marra, M., Varón-López, M., Silva, M.A.P., Soares, C.R.F.S., Moreira, F.M.S., 2013. Soil biological attributes in arsenic-contaminated gold mining sites after revegetation. *Ecotoxicology* 22, 1526–1537. doi:10.1007/s10646-013-1139-9

Shoemaker, H.E., Mclean, E.O., Pratt, P.F., 1961. Buffer methods for determining lime requirement of soils with appreciable amounts of extractable aluminum. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 25, 274–277.

Silva, A.P.S., Babujia, L.C., Franchini, J.C., Ralisch, R., Hungria, M., Guimarães, M.F., 2014. Soil structure and its influence on microbial biomass in different soil and crop management systems. *Soil Tillage Res.* 142, 42–53. doi:10.1016/j.still.2014.04.006

Silva, D.K.A., Freitas, N.O., Souza, R.G., Silva, F.S.B., Araujo, A.S.F., Maia, L.C., 2012. Soil microbial biomass and activity under natural and regenerated forests and conventional sugarcane plantations in Brazil. *Geoderma* 189–190, 257–261. doi:10.1016/j.geoderma.2012.06.014

Skirycz, A., Castilho, A., Chaparro, C., Carvalho, N., Tzotzos, G., Siqueira, J.O., 2014. Canga biodiversity, a matter of mining. *Front. Plant Sci.* 5, 1–9. doi:10.3389/fpls.2014.00653

Sparling, G.P., 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Aust. J. Soil Res.* 30, 195–207.

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1970. Arylsulfatase Activity of Soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 34, 225–229. doi:10.2136/sssaj1970.03615995003400020016x

Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1972. Assay of urease activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4, 479–487. doi:10.1016/0038-0717(72)90064-8

Takahasi, A., Meirelles, S.T., 2014. Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (cangas) em Corumbá, MS, Brasil. *Hoehnea* 41, 515–528. 2014. doi:10.1590/2236-8906-63/2013

Teixeira, A.F.S., Kimmelmeier, K., Marascalchi, M.N., Stürmer, S.L., Carneiro, M.A.C., Moreira, F.M.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. *Ciênc. Agrotec.* 41, 511–525. doi:10.1590/1413-70542017415014617

Torres, D.M., Fontes, M.A.L., Samsonas, P.H., 2017. Relações solo-vegetação na estruturação de comunidades de cerrado sensu stricto no sul de Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia.* 68, 115–128. 2017. doi:10.1590/2175-7860201768121.

Trannin, I.C.B., Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., 2007. Características biológicas do solo indicadoras de qualidade após dois anos de aplicação de biossólido industrial e cultivo de milho. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* 31, 1173–1184.

Upadhyay, N., Vishwakarma, K., Singh, J., Mishra, M., Kumar, V., Rani, R., Mishra, R.K., Chauhan, D.K., Tripathi, D.K., Sharma, S. 2017. Tolerance and Reduction of Chromium(VI) by *Bacillus* sp. MNU16 Isolated from Contaminated Coal Mining Soil. *Front. Plant Sci.* 8:778. doi: 10.3389/fpls.2017.00778

Vance, E.D., Brooks, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703–707.

Varajão, A.F.D.C., Salgado, A.A.R., Varajão, A.F.D.C., Braucher, R., Colin, F., Nalini-Júnior, H.A., 2009. Estudo da evolução da paisagem do Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais, Brasil) por meio da mensuração das taxas de erosão ( $^{10}\text{Be}$ ) e da pedogênese. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 33, 1409–1425.

Venson, G.R., Marenzi, R.C., Almeida, T.C.M., Deschamps-Schmidt, A., Testolin, R.C., Rörig, L.R., Radetski, C.M., 2017. Restoration of areas degraded by alluvial sand mining: use of soil microbiological activity and plant biomass growth to assess evolution of restored riparian vegetation. *Environ. Monit. Assess.* 189, 1-8. doi:10.1007/s10661-017-5852-3

Vieira, C.K., Marascalchi, M.N., Rodrigues, A.V., de Armas, R.D., Stürmer, S.L., 2017. Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. *J. Environ. Sci. (China)* 1–14. doi:10.1016/j.jes.2017.08.019

Villani, F.T., Ribeiro, G.A.A., Villani, E.M.A., Teixeira, W.G., Moreira, F.M.S., Miller, R., Alfaia, S.S., 2017. Microbial carbon, mineral-n and soil nutrients in indigenous agroforestry systems and other land use in the Upper Solimões Region, Western Amazonas State, Brazil. *Agricultural Sciences*, v. 8, p. 657–674. doi:10.4236/as.2017.87050

Vinhal-freitas, I.C., Corrêa, G.F., Wendling, B., Bobul, L., Ferreira, A.S., 2017. Soil textural class plays a major role in evaluating the effects of land use on soil quality indicators 74, 182–190. doi:10.1016/j.ecolind.2016.11.020

Wahsha, M., Nadimi-Goki, M., Fornasier, F., Al-Jawasreh, R., Hussein, E.I., Bini, C., 2017. Microbial enzymes as an early warning management tool for monitoring mining site soils. *Catena* 148, 40–45. doi:10.1016/j.catena.2016.02.021

Waldrop, M.P., Balser, T.C., Firestone, M.K., 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biol. Biochem.* 32 1837–846.

Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science* 37, 29–38.

Table 1: Chemical attributes and texture of soils of different phytophysiognomies - ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil.

	IO	NS	AF	RA	CV%	IO	NS	AF	RA	CV%
	Dry seasons *					Rainy seasons				
pH (H <sub>2</sub> O)	4.72 c **	4.97 b	4.21 d	5.60 a	5.36	4.47 b	4.66 b	3.91 c	5.36 a	7.45
K (mg dm <sup>-3</sup> )	56.80 a	75.60 a	75.60 a	88.20 a	26.78	64.00 c	83.80 a	78.00 b	85.20 a	27.62
P (mg dm <sup>-3</sup> )	1.60 b	1.36 b	2.15 a	1.66 b	23.50	2.27 b	1.62 b	2.12 b	3.18 a	25.62
P-rem (mg dm <sup>-3</sup> )	12.72 a	4.75 b	11.03 a	11.08	27.26	20.11 a	7.67 c	16.52 b	20.10 a	13.15
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.28 a	0.91 a	0.99 a	0.75 a	45.55	1.34 a	1.23 a	1.15 a	1.15 a	48.86
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.24 a	0.38 a	0.45 a	0.30 a	33.33	0.27 a	0.46 a	0.41 a	0.38 a	47.86
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.85 c	1.56 b	1.90 a	0.09 d	45.07	0.79 b	1.89 a	1.94 a	0.12 c	37.93
H+Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	12.87 b	16.26 a	11.71 b	1.94 c	27.68	23.75 a	24.09 a	19.66 a	2.65 b	37.09
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.66 a	1.47 a	1.63 a	1.27 a	55.74	1.78 a	1.90 a	1.75 a	1.76 a	42.28
V (%)	13.56 b	12.73 b	13.65 b	40.73 a	34.95	9.97 b	11.60 b	10.70 b	40.55 a	46.61
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2.52 b	3.10 a	3.53 a	1.41 c	28.88	2.57 b	3.79 a	3.70 a	1.88 c	21.45
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	14.31 b	16.94 a	13.90 b	3.22 c	30.98	23.80 a	23.20 a	20.29 a	4.40 b	40.29
m (%)	33.78 c	47.78 b	59.28 a	9.61 d	25.46	29.39 c	50.73 b	58.01 a	7.11 d	25.57
S (mg dm <sup>-3</sup> )	26.58 b	36.30 a	29.06 b	45.14 a	28.48	15.74 b	21.33 b	20.18 b	31.08	20.04
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	403.72 a	134.05 b	124.79 b	150.82 b	45.99	446.32 a	185.61 b	150.31 b	94.89 c	31.58
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	88.88 b	112.29 a	40.77 c	103.99 a	28.48	66.88 b	107.40 a	35.63 c	94.02 a	42.16
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	3.29 a	3.14 a	1.93 b	1.61 b	36.69	3.60 a	2.99 b	1.45 c	2.48 b	34.90
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0.57 c	1.29 b	0.81 c	2.14 a	31.06	0.36 a	0.292 a	0.56 a	1.92 a	50.25
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0.27 a	0.20 b	0.20 b	0.15 c	28.32	0.12 a	0.14 a	0.10 a	0.11 a	27.98
EC (μS cm <sup>-1</sup> )	0.05 b	0.06 b	0.23 a	0.03 b	21.82	0.07 c	0.11 b	0.16 a	0.09 b	40.00
SOM (g kg <sup>-1</sup> )	75.90 a	83.00 a	49.50 c	13.90 d	36.60	80.80 a	82.30 a	48.10 b	12.40 c	35.44
Clay (g kg <sup>-1</sup> )	212.00 c	376.00 b	456.00 a	249.00 c	16.02	193.00 c	362.00 b	478.00 a	240.00 c	12.91
Silt (g kg <sup>-1</sup> )	174.00 b	243.00 a	188.00 b	262.00 a	33.48	183.00 b	275.00 a	178.00 b	277.00 a	33.59
Sand (g kg <sup>-1</sup> )	612.00 a	381.00 c	356.00 c	493.00 b	20.16	624.00 a	363.00 c	344.00 c	483.00 b	21.08

\*Data obtained from Castro et al. (2017). \*\* Means followed by the same letter do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ). pH in water (1:2.5). P, K, Fe, Zn, Mn, and Cu extracted by Mehlich-1 solution (Mehlich, 1953). Remaining P (Prem) (Alvarez V. and Fonseca, 1990). Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Al<sup>3+</sup> extracted by 1 mol L<sup>-1</sup> KCl (McLean et al., 1958). Potential acidity (H+Al) by SMP extractant (Shoemaker, McLean and Pratt, 1961). S by monocalcium phosphate in acetic acid extractant (Hoef, Walsh and Kenney, 1973). B extracted in hot water (Raij et al., 2001). Soil organic matter (SOM) by oxidation with potassium dichromate in acid medium (Walkley and Black, 1934). Electrical conductivity (EC). Texture by the Bouyoucos method (Bouyoucos, 1951).

Table 2: Microbial biomass carbon, soil respiration, and metabolic and microbial coefficient of soils of different phytophysiognomies - ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil

Area	Microbial Biomass Carbon		Soil Basal Respiration		$qCO_2$		$qMic$	
	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy
	mg g <sup>-1</sup>		mg kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> C-CO <sub>2</sub>		mg h <sup>-1</sup> C-CO <sub>2</sub> mg <sup>-1</sup> C		%	
IO	494.45 c A*	627.47 b A	14.08b c B	37.25 c A	29.44 b B	63.04 b A	1.31 c A	1.47 c A
NS	862.07 a A	682.25 b B	15.74 b B	42.67 b A	18.84 c B	61.27 b A	2.07 b A	1.45 c A
AF	709.37 b B	861.86 a A	18.51 a B	51.91 a A	27.57 b B	60.87 b A	2.53 b B	3.15 b A
RA	272.98 d A	321.69 c A	12.68 c B	48.76 a A	48.39 a B	155.15 a A	3.49 a B	5.24 a A
CV(%)	19.25	20.16	9.09	12.17	25.14	24.68	38.3	36.34

\*Means followed by the same lowercase letter among areas and uppercase letter between periods do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p < 0.005$ ).

Table 3: Enzyme activities of soils of different phytophysiognomies - ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil

Area	$\beta$ -glucosidase		Acid Phosphatase		Alkaline Phosphatase		Arylsulfatase		Urease		Fluorescein Diacetate Hydrolysis	
	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy
	mg substrate kg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>											
IO	57.98 b A*	65.86 c A	28.46 b A	14.77 c B	103.65 c A	117.81 b A	8.94 a B	13.48 b A	7.11 b A	1.12 c B	36.00 b B	61.30 b A
NS	81.05 a B	106.37 b A	45.59 a A	39.91 b A	127.18 b A	123.17 b A	3.59 c B	10.31 b A	7.02 b B	4.06 b A	24.30 c B	49.40 c A
AF	87.66 a B	128.94 a A	49.57 a B	84.18 a A	163.52 a B	144.47 a A	7.63 b B	37.90 a A	13.72 a A	5.44 a B	51.30 a B	85.70 a A
RA	34.93 c B	48.01 d A	4.03 c B	16.95 c A	71.98 d A	53.48 c A	6.50 b B	9.42 b A	5.58 b A	2.92 b B	29.00 b B	67.00 b A
CV(%)	13.59	13.81	21.45	16.25	10.9	17.77	18.8	22.43	21.97	31.44	20.16	18.39

\*Means followed by the same lowercase letter among areas and uppercase letter between periods do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p < 0.005$ ).

Table 4: Eigenvalues of chemical and physical attributes and biological indicators of soils from ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in principal component analysis of different phytophysionomies in two climate seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil.

Variable	Dry period		Rainy period	
	PC1	PC2	PC1	PC2
	Explained variance (%)			
Individual	46.33	16.90	43.39	25.72
Accumulated	46.33	63.23	43.39	69.11
FDA	0.35	0.43	0.07	<b>0.66</b>
Arylsulfatase	-0.07	-0.23	-0.58	<b>0.71</b>
$\beta$ -glucosidase	<b>0.96</b>	0.25	<b>-0.87</b>	0.51
Acid Phosphatase	<b>0.97</b>	0.22	<b>-0.63</b>	<b>0.84</b>
Alkaline Phosphatase	<b>0.90</b>	0.45	<b>-0.92</b>	0.08
Urease	<b>0.64</b>	0.49	-0.40	<b>0.89</b>
Microbial Biomass Carbon	<b>0.89</b>	0.12	<b>-1.00</b>	0.18
Soil Basal Respiration	<b>0.78</b>	0.51	0.15	<b>0.90</b>
Organic Carbon	<b>0.81</b>	<b>-0.61</b>	<b>-0.82</b>	<b>-0.62</b>
Total Nitrogen	<b>0.73</b>	<b>-0.67</b>	<b>-0.74</b>	<b>-0.71</b>
$q\text{CO}_2$	<b>-0.82</b>	0.10	<b>0.98</b>	0.22
$q\text{Mic}$	-0.54	<b>0.65</b>	<b>0.69</b>	0.56
pH	<b>-0.92</b>	-0.01	<b>0.90</b>	-0.17
$\text{Al}^{3+}$	<b>0.94</b>	<b>0.07</b>	<b>-0.96</b>	0.23
H+Al	<b>0.94</b>	-0.39	<b>-0.89</b>	-0.38
CEC	<b>0.82</b>	0.00	<b>-0.66</b>	0.14
$\text{CEC}_{\text{pH } 7.00}$	<b>0.95</b>	-0.44	<b>-0.89</b>	-0.47
V%	<b>-1.00</b>	0.24	<b>0.90</b>	0.20
m%	<b>1.03</b>	0.13	<b>-0.95</b>	0.24
$\text{Zn}^{2+}$	0.23	-0.56	-0.04	<b>-0.88</b>
$\text{Fe}^{2+}$	0.05	<b>-0.92</b>	-0.33	<b>-0.77</b>
$\text{Mn}^{2+}$	-0.51	-0.35	0.57	-0.24
$\text{Cu}^{2+}$	<b>-0.77</b>	0.33	<b>0.89</b>	0.21
S	-0.53	0.26	<b>0.66</b>	0.44
Clay	<b>0.65</b>	<b>0.75</b>	<b>-0.62</b>	<b>0.81</b>
Sand	-0.37	<b>-0.79</b>	0.27	<b>-0.69</b>

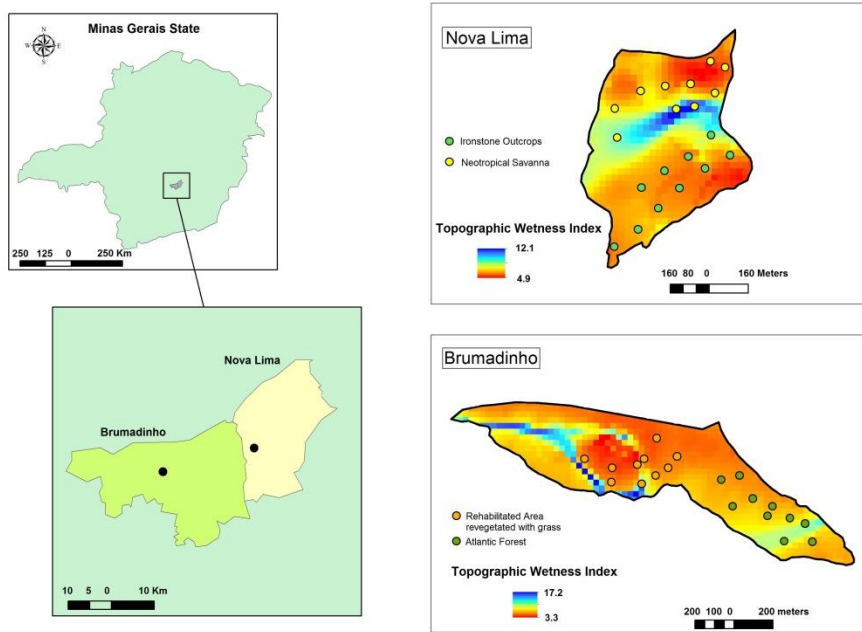


Figure 1: Location of the points sampled and Topographic wetness index map of soils of different phytophysiognomies - ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil.

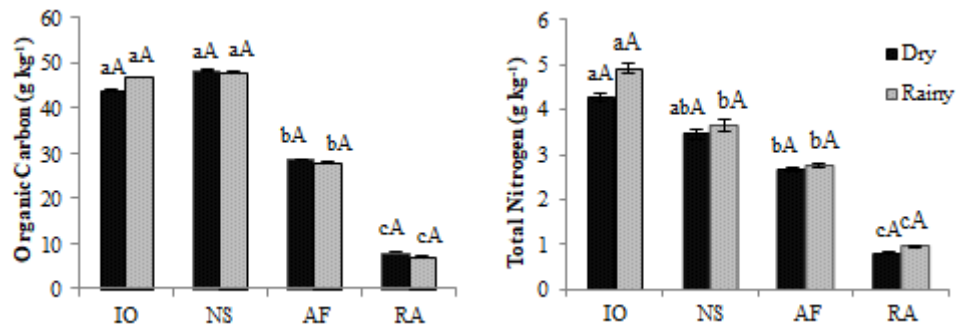


Figure 2: Organic carbon and Total Nitrogen of soils of different phytophysiognomies - ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil. Means followed by the same lowercase letter among areas and uppercase letter between seasons do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p < 0.005$ ). Standard error bar.

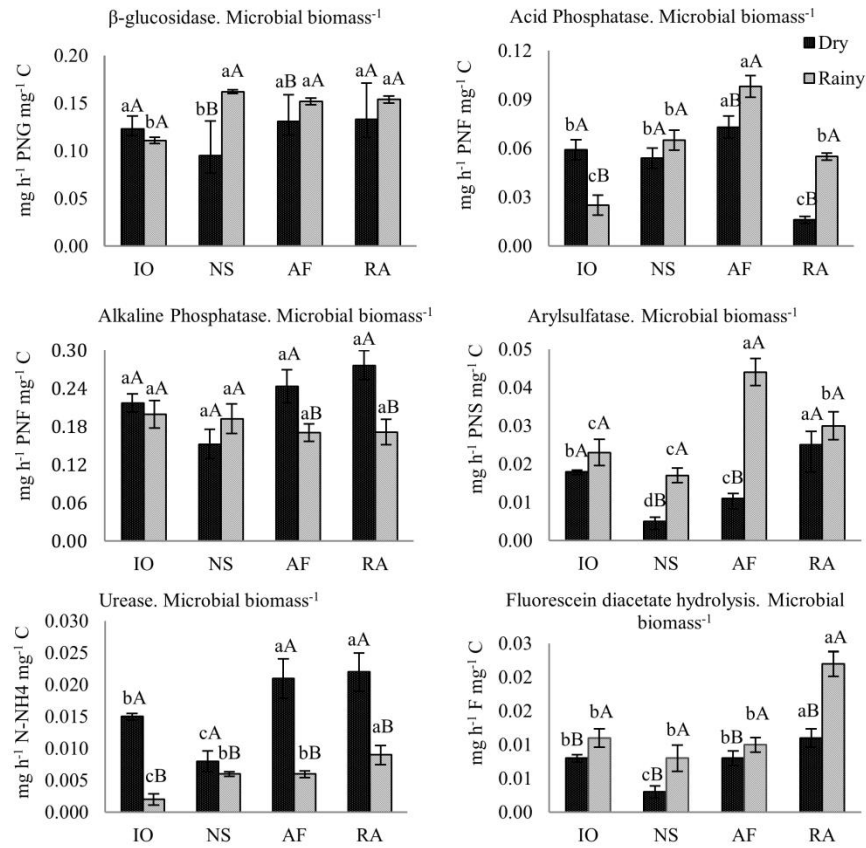


Figure 3: Specific enzyme activities per biomass carbon of soils of different phytophysionomies - ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in two climate seasons (dry and rainy) in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil. Means followed by the same lowercase letter among areas and uppercase letter between seasons do not differ statistically by the Scott-Knott test ( $p < 0.005$ ). Standard error bar.

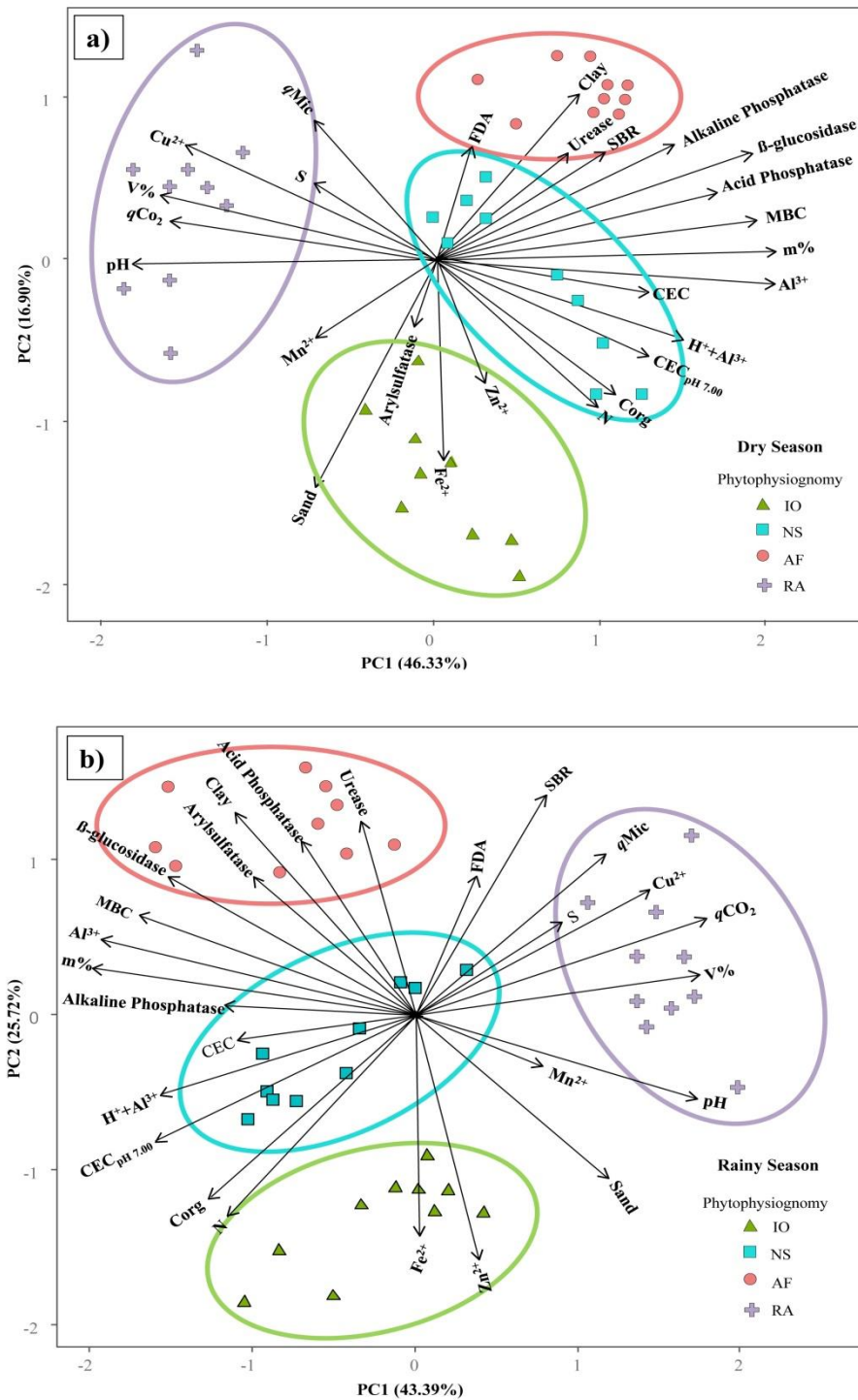


Figure 4: Principal Component Analysis (PCA) relating chemical and physical attributes and biological indicators of soils of ironstone outcrops (IO), neotropical savanna (NS), Atlantic Forest (AF), and a rehabilitated area revegetated with grass (RA) in two climate seasons [dry (a) and rainy (b)] in the Quadrilátero Ferrífero, MG, Brazil.

## **SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 2** – Diversidade de comunidades de bactérias promotoras de crescimento vegetal em área sob influência da mineração de ferro e fitofisionomias adjacentes

Artigo de acordo com as normas da revista Ecological Indicators

Diversidade de comunidades de bactérias promotoras de crescimento vegetal em área  
sob influência da mineração de ferro e fitofisionomias adjacentes

Aline Oliveira Silva<sup>1</sup>; Amanda Azarias Guimarães<sup>1</sup>; Amanda Monique da Costa<sup>1</sup>; Flávia Reis Sales<sup>1</sup>; Fatima Maria de Souza Moreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras - MG, Brazil.

\*Corresponding author

E-mail address: [fmoreira@dcs.ufla.br](mailto:fmoreira@dcs.ufla.br)

Telephone number: +55 35 3829-1254

Resumo: O objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica ou não simbiótica e a diversidade de comunidades de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR - plant growth promoting rhizobacteria) nativas de área em recuperação alterada pela mineração de ferro e em fitofisionomias adjacentes no Quadrilátero Ferrífero – MG - Brasil, em duas estações climáticas (seco – dry e chuvoso – rainy). Amostras de solo foram coletadas em fitofisionomias de Canga (Ironstone Outcrops - IO), Cerrado (Neotropical Savanna – NS), Mata Atlântica (Atlantic Forest – AF) e uma área reavilitada revegetada com capim (Rehabilitated Area revegetated with grass – RA) para análises químicas, físicas e biológicas. Para cada estação, seca e chuvosa, foram conduzidos experimentos armadilha em casa de vegetação, com siratro (*Macroptilium atropurpureum*) como planta isca de rizóbio e outras PGPR. Em cada experimento foram inoculadas suspensões das amostras de solos coletadas das diferentes fitofisionomias nas plantas e comparadas com controles com baixa e alta concentração de N mineral. A eficiência da comunidade de rizóbio e PGPR foi avaliada por meio do número de nódulos, matéria seca dos nódulos, matéria seca da parte aérea e leitura do índice SPAD nas plantas de siratro. Os dados obtidos foram correlacionados com os atributos químicos e físicos dos solos. As bactérias presentes nos nódulos foram isoladas para avaliar a diversidade fenotípica e genotípica. O maior número de nódulos ocorreu no tratamento inoculado com amostras de solo de RA e os menores em IO, nas duas estações. O índice SPAD em siratro foi mais eficaz em detectar a diferença entre as eficiências simbióticas das comunidades de PGPR do que a matéria seca da parte aérea, com leituras de índice SPAD maiores em RA do que no controle com alto N mineral. A eficiência das comunidades foi diretamente correlacionada com pH, saturação de bases,  $\text{Cu}^{2+}$  e argila, e inversamente correlacionada com  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{H}+\text{Al}$ , CTC efetiva, CTC a pH 7,  $\text{Zn}^{2+}$ , C orgânico, N total,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e areia. RA teve a maior eficiência de comunidades, maior pH e saturação de bases. Já IO apresentou os maiores teores de C orgânico, N total,  $\text{Fe}^{2+}$ , areia e a menor eficiência de comunidade. Após o isolamento das bactérias dos nódulos foram obtidas 327 estirpes nas duas estações climáticas, que foram separadas em seis grupos fenotípicos, em função do pH e tempo de crescimento em meio de cultura sólido. A diversidade genética, avaliada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, apresentou 29 gêneros na estação seca e 18 na estação chuvosa. Nas fitofisionomias foram observados gêneros pertencentes aos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria. Os gêneros nodulíferos *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e o endofítico *Paenobacillus* foram os de maior ocorrência em ambas as estações e fitofisionomias. A maior eficiência simbiótica e a elevada diversidade genética da comunidade de bactérias encontrada na RA indicam que a reabilitação do solo está sendo efetiva.

Palavras-chave: Quadrilátero Ferrífero; planta isca; SPAD; *Bradyrhizobium*; *Paenobacillus*; *Rhizobium*.

## 1. Introdução

A mineração é uma atividade antrópica essencial, porém, é uma das que causam maior impacto na paisagem e nos ecossistemas, tornando necessário o uso de processos de reabilitação nas áreas mineiradas, principalmente pelo uso de revegetação para recompor, proteger e promover a melhoria das condições edáficas (Escobar et al., 2015; Melloni et al., 2006; Quadros et al., 2016).

Uma das regiões com maior atividade de mineração de ferro no mundo é o Quadrilátero Ferrífero na região sudeste do Brasil, que compreende uma área de cerca de 7000 km<sup>2</sup> na parte central do estado de Minas Gerais (de Carvalho Filho et al., 2015). Os solos dessa região são oriundos de uma grande diversidade litológica e, geralmente, são de baixa fertilidade, ácidos, rasos a pouco profundos, e com altos teores de ferro (de Carvalho Filho et al. 2010; de Carvalho Filho et al 2015; Varajão et al., 2009). A vegetação local compreende inter-relações entre dois grandes biomas, Cerrado e Atlantic Forest, que são *hotspots* globais de biodiversidade (Bruce et al., 2010; Castro et al., 2016; Myers et al., 2000) e também pelas áreas de Canga, que são campos rupestres com grande diversidade florística, adaptadas as condições edáficas ferruginosas locais (Castro et al., 2017; Neves et al., 2017; Skirycz et al., 2014).

As mudanças causadas pela mineração influenciam a diversidade e densidade dos organismos no solo, afetando processos bioquímicos que são essenciais para a sustentabilidade dos ecossistemas (Claassens et al. 2012; Escobar et al., 2015; Silva et al., 2018). Dentre esses processos, ressaltamos a fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada por bactérias diazotróficas simbióticas e associativas, que é extremamente importante para os ecossistemas por disponibilizarem nitrogênio na forma assimilável pelas plantas, promovendo um melhor desenvolvimento das mesmas. No entanto, a promoção de crescimento vegetal pode ser feita por meio de outros processos como: produção de fitohormônios (Costa et al., 2016; Santoyo et al., 2016), solubilização de fosfato (Angus et al., 2013; Oliveira-Longatti et al., 2015; Costa et al., 2016), produção de sideróforos (Wdowiak-Wróbel et al., 2017) e adaptação a estresses como tolerância a metais (Rangel et al., 2016); em plantas leguminosas e não leguminosas (Velázquez et al 2017).

A diversidade microbiana no solo, principalmente em solos tropicais, é um bom indicador de mudanças ambientais (Borges et al., 2016; Carvalho et al., 2016; Pontes et al., 2017). Além disso, representa recursos genéticos com potencial de aplicação biotecnológica, como as rizobactérias promotoras de crescimento de vegetal (PGPR - plant growth promoting

rhizobacteria). O isolamento destas bactérias pode ser realizada de forma direta de nódulos de plantas encontradas no ambiente a ser estudado (Diabate et al., 2005; Moreira et al., 1992; Moreira et al., 1993; Moreira et al., 1998; Santos et al., 2017), ou indiretamente por meio de uso de espécies de planta isca promiscuas, como *Macroptilium atropurpureum* (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2009; Borges et al., 2016), *Mimosa tenuiflora* (Silva et al., 2017), *Vigna unguiculata* (Castro et al., 2017), *Phaseolus vulgaris* (Dall’Agnol et al., 2016; Melloni et al., 2006), *Glycine max* (Ribeiro et al., 2015), entre outras espécies.

Embora muitos estudos tenham demonstrado que as alterações no uso do solo impulsionam as mudanças na diversidade genotípica e funcional dos organismos sob diferentes coberturas vegetais (Borges et al., 2016; Carvalho et al., 2016; Claassens et al. 2012; Lima et al. 2009; Pontes et al., 2017), ainda são escassos trabalhos relacionados a diversidade de microrganismos em áreas de mineração de ferro (Cao et al., 2015; Castro et al., 2017; Matias et al., 2009; Nogueira et al., 2005; Teixeira et al., 2017; Vieira et al., 2017). Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica e não simbiótica das comunidades de PGPR nativas de área em recuperação alterada pela mineração de ferro e em fitofisionomias adjacentes, utilizando *Macroptilium atropurpureum* como planta isca, em duas estações climáticas (seca e chuvosa) e correlacionar com os atributos químicos e físicos do solo. Além disso, foi determinada a diversidade fenotípica e genotípica das estirpes isoladas das áreas em estudo.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Caracterização da área de estudo e amostragem

O local de estudo situa-se nos municípios de Nova Lima e Brumadinho, pertencentes à empresa Vale S.A., localizadas no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, sudeste do Brasil (Figura S1). O clima é Cwa, com inverno seco e verão chuvoso, segundo classificação de Köppen, com pluviosidade média de 1100 a 1420 mm e temperatura média entre 19 e 22° C.

As amostras de solos foram coletadas em agosto de 2015 (estação seca – dry season) e em janeiro de 2016 (estação chuvosa – rainy season), em quatro fitofisionomias diferentes. A amostragem seguiu um desenho amostral de dois transectos, distanciados a 50 m um do outro. Em cada transecto foram obtidas cinco amostras compostas, em pontos georreferenciados, distanciados a aproximadamente 50 m, resultando em 10 pontos por fitofisionomia. As amostras foram compostas por cinco subamostras, separadas por cinco metros cada, coletadas na camada de 0-0.20 m em linha transversal ao transecto. A descrição dos tipos de solos e das

análises químicas e físicas dos solos da estação seca estão em Castro et al. (2017) e da estação chuvosa em Silva et al (2018).

As fitofisionomias foram descritas em Castro et al. (2017) como Canga (Ironstone Outcrops – IO) e Cerrado (Neotropical Savanna – NS) no Centro de Tecnologia de Ferrosos em Nova Lima; Mata Atlântica (Atlantic Forest – AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (Rehabilitated Area revegetated with grass – RA) na Mina Córrego do Feijão em Brumadinho. A RA foi influenciada pela atividade de mineração ao ter sua vegetação nativa (Mata Atlântica) removida para estabelecimento de um depósito de minério pré-transporte. A revegetação dessa área foi iniciada em 2005 com o plantio de espécies arbóreas e gramíneas. No entanto, atualmente, a presença de gramíneas (*Panicum maximum* Jacq, *Brachiaria decumbens*, *Melinis minutiflora*) é predominante, existindo apenas algumas espécies de leguminosas arbustivas (*Neonotonia wightii*, *Mimosa* sp., *Crotalaria juncea*) no local.

## 2.2. Eficiência simbiótica e captura de comunidades de bactérias promotoras de crescimento vegetal

Para determinar a eficiência da comunidade e capturar as estirpes de bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) foram conduzidos dois experimentos utilizando siratro (*Macroptilium atropurpureum*) como planta isca. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de maio e junho de 2016 (coleta da estação seca) e setembro e outubro de 2016 (coleta da estação chuvosa), na casa de vegetação do Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo - DCS - UFLA.

As plantas foram cultivadas em garrafas de vidro âmbar de 500 mL com solução nutritiva (Hoagland, Arnon, 1950), com baixa (5,25 mg L<sup>-1</sup> de N) ou alta concentração de N (52,5 mg L<sup>-1</sup> de N), diluída quatro vezes e esterilizada. NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub> e Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> foram as fontes de nitrogênio utilizadas. As sementes de siratro foram previamente escarificadas e esterilizadas em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a.) por 15 minutos e imersas em água estéril por 2 horas. Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri, com algodão e papel filtro umedecidos, e mantidas a 28°C por 24 horas para germinação. Uma plântula de siratro foi colocada em cada garrafa. Alíquotas de 1 mL de suspensão de solo de cada amostra foi inoculadas individualmente nas plântulas, com três repetições para cada ponto amostral. As suspensões de solo foram obtidas a partir da suspensão de 50g de cada amostra de solo em 50 mL solução salina (NaCl 0.85%) na proporção de 1:1, agitados por 30 minutos à 120 rpm, conforme a metodologia proposta em Moreira (2010).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com sete tratamentos e três repetições: inoculações com as suspensões de solos de cada fitofisionomia; controle positivo inoculado com uma estirpe eficiente em siratro UFLA 04-212 (*Bradyrhizobium brasilense*) (Costa et al., 2018); controles negativos não inoculados com alta concentração de N (HN – 52,5 mg L<sup>-1</sup>) e com baixa concentração de N (LN – 5,25 mg L<sup>-1</sup>), para verificar possíveis contaminações do experimento e para comparar com as plantas inoculadas com a solução do solo. Os tratamentos inoculados com as suspensões de solo e com a UFLA 04-212 foram cultivados em solução com baixa concentração de N (5,25 mg L<sup>-1</sup> de N).

As plantas foram coletadas 45 dias após a inoculação e determinada a eficiência das comunidades de PGPR por meio da avaliação do número dos nódulos (NN), matéria seca de nódulos (NDM), matéria seca de parte aérea (SDM) e o índice SPAD (soil plant analysis development) das plantas de siratro. Para determinar o NN, estes foram retirados e contados manualmente. A NDM e SDM foram determinadas após secagem em estufa de circulação de ar à 65° C e atingir peso constante. O índice SPAD foi determinado nas folhas dos terços médio e superior das plantas de cada tratamento, usando um medidor de clorofila Minolta SPAD-502, com uma média de 30 leituras por planta.

### 2.3. Caracterização fenotípica e genotípica das estirpes isoladas dos nódulos

Na separação manual dos nódulos foram selecionados dois por planta para o processo de isolamento das estirpes de PGPR. Os nódulos foram desinfestados superficialmente, sendo primeiramente imersos em álcool etílico 95% por 30 segundos, e em seguida em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10%) por dois minutos e, posteriormente, lavados seis vezes em água destilada estéril (Vincent, 1970). A cada desinfestação de nódulos de plantas diferentes foram trocadas as soluções de limpeza (álcool, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e água). Após a desinfestação, os nódulos foram macerados em placas contendo meio de cultura 79 (Fred, Waksman, 1928), também conhecido como YMA (Vincent, 1970), com azul de bromotimol, a pH 6,8. O líquido obtido da maceração dos nódulos foi espalhado em estria compostas para a obtenção de colônias isoladas.

Os diferentes morfotipos de colônias observados foram plaqueados para purificação. Após a purificação dos isolados, as seguintes características culturais foram avaliadas em placa de petri com meio de cultura 79: alteração do pH do meio de cultura (ácido, básico e neutro) e tempo de crescimento avaliado pelo tempo de formação de colônias isoladas (1-3 dias: crescimento rápido; 4-5 dias: crescimento intermediário; > 6 dias crescimento lento), conforme descrito em Moreira et al. (1993). Para o agrupamento fenotípico foram

consideradas as características tempo de crescimento e alteração do pH do meio de cultura de cada uma das estirpes isoladas. Todas as estirpes foram armazenadas em glicerol a 20% a -80°C, em água destilada estéril e liofilizados. A caracterização cultural de cada estirpe está descrito na Tabelas S2.

A identificação das estirpes foi realizada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Para isso, o DNA genômico de cada estirpe foi extraído por meio de lise alcalina (Niemann et al., 1997) após crescimento em meio de cultura 79, de acordo com o tempo de crescimento para atingir a fase log. A amplificação do gene 16S rRNA seguiu metodologia descrita em Guimarães, et al. (2012) e Ribeiro, et al. (2015), utilizando os primers 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') (Lane, 1991). Os produtos de PCR foram enviados ao laboratório Wemseq (Curitiba – PR - Brasil), para purificação e sequenciamento. A qualidade das sequências foi avaliada usando o programa BioNumerics, versão 7.5 (Applied Maths, Austin, TX, EUA) e, posteriormente, submetidas ao programa “*Basic Local Alignment Search Tool*” (BLAST) (Altschul et al., 1997) para comparação com sequências similares depositadas no banco de dados GenBank, do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências determinadas nesse trabalho foram depositadas no GenBank sob os números de acessos: MH310426 à MH310439; MH319950 à MH320092; MH320566 à MH320735 (Tabela S2).

A riqueza de gêneros foi determinada para cada fitofisionomia e calculados os índices de diversidade de Shannon e de Simpson. O índice de diversidade de Shannon foi calculado pela fórmula:  $H' = -\sum (n_i/N) \times \ln (n_i/N)$  e o índice de diversidade de Simpson foi calculado pela fórmula:  $C' = \sum n_i \times (n_i - 1) / N \times (N - 1)$ , onde  $n_i$  = número de indivíduos da  $i$ -ésima espécie;  $N$  = número total de indivíduos;  $\ln$  = logaritmo neperiano.

#### 2.4. Análises Estatísticas

Os testes de normalidade e homogeneidade de médias foram realizados para as variáveis NN, NDM, SDM, RE e índice SPAD. Foram observados que NN e NDM não atendiam ao pressuposto de normalidade e foram transformados utilizando a equação  $\sqrt{(x-1)}$ . Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ( $p < 0.05$ ) e agrupados pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ), usando o software Sisvar (Ferreira, 2011). Análise de componentes principais (PCA) foi realizada para demonstrar a ordenação das fitofisionomias em relação à eficiência simbiótica das comunidades com os atributos físico-químicos do solo usando o software R (R Development Core Team, 2011). A distribuição das estirpes em diferentes

grupos culturais e a diversidade de gêneros foi analisada graficamente por meio de análise estatística descritiva.

### 3. Resultados

#### 3.1. Eficiência de Comunidades de Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

As plantas de siratro apresentaram nódulos quando inoculadas com a suspensão dos solos de todas as fitofisnomias, em ambos os experimentos. Não houve a presença de nódulos nos controles sem inoculação, com baixa ou alta concentração de N, mostrando que os experimentos não foram contaminados. A estirpe referência para siratro (UFLA-04-212), que é uma estirpe de bactéria fixadora de nitrogênio nodulífera em leguminosa, nodulou normalmente, indicando que as condições experimentais foram favoráveis à simbiose, nos dois experimentos. NS, AF e RA apresentaram comunidades bacterianas com capacidade de nodulação em siratro em todos os pontos de coleta. Entretanto, a fitofisnomia IO apresentou nodulação positiva apenas nos tratamentos dos pontos 1, 5, 6, 7 e 8, na estação período seca, e dos pontos 1, 6 e 7, na estação chuvosa.

As variáveis NN, NDM, SDM e índice SPAD apresentaram diferenças significativas entre as fitofisnomias ( $p < 0.05$ ), nas duas estações climáticas avaliadas (Tabela 1). Na estação seca RA apresentou o maior NN, seguido de UFLA 04-212, AF e NS, e com menor NN em IO. Já na estação chuvosa o maior NN foi no tratamento UFLA 04-212, seguido de RA. A RA e UFLA 04-212 apresentaram as maiores NDM, já as demais fitofisnomias não diferiram entre si ( $p < 0.05$ ), em ambas as estações climáticas (Tabela 1). A SDM foi mais alta no controle com alto N nos dois experimentos, sendo pouco eficiente em diferenciar as fitofisnomias avaliadas, provavelmente pelo curto período de condução (45 dias).

A avaliação da eficiência simbiótica das comunidades de bactérias por meio da avaliação do índice SPAD indicou que RA foi a fitofisnomia que apresentou a maior eficiência simbiótica entre as fitofisnomias, em ambos os experimentos (Figura 1). SPAD em RA não diferiu do controle com alto N na estação seca, e foi maior que o controle com alto N na estação chuvosa ( $p < 0.05$ ), demonstrando a alta sensibilidade deste índice para detectar diferenças entre as eficiências das comunidades bacterianas em experimentos de curta duração.

### 3.2. Relação entre a eficiência das comunidades de PGPR e os atributos físicos e químicos do solo

Resultados da análise dos componentes principais (PCA) entre as propriedades físico-químicas do solo e as variáveis de eficiência simbiótica explicaram 74% da variância total (PC1: 53% e PC2: 21%) no experimento da estação seca, e 70% da variância total (PC1: 50% e PC2: 20%) no experimento da estação chuvosa. Esses resultados, juntamente com a matriz de correlação, permitiram uma melhor compreensão da relação entre os atributos físico-químicos dos solos coletados nas diferentes fitofisionomias e na eficiência simbiótica das comunidades bacterianas capturadas por siratro (Figura 2).

Tanto no período seco, quanto no período chuvoso, a análise das PC1 e PC2 mostram que o índice SPAD, NN, NDM e SDM estão diretamente correlacionados com pH, saturação de base,  $\text{Cu}^{2+}$  e argila, e correlacionados inversamente com  $\text{Al}^{3+}$ , H+Al, CEC efetiva,  $\text{CEC}_{\text{pH } 7.00}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , organic C, total N,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e areia ( Tabela 2). Ao se analisar a distribuição espacial dos pontos no PCA (Figura 2), observa-se que houve uma nítida separação entre as fitofisionomias, que seguiu a mesma distribuição espacial nos quadrantes independente da estação que foi coletada. Também se pode inferir que RA está relacionada com índice SPAD, NN, NDM, pH, V% e  $\text{Cu}^{2+}$ , sendo essa a fitofisionomia com a maior eficiência de comunidade, que indica o potencial das PGPR no reestabelecimento de processos biológicos no solo. IO foi agrupada com relação aos seus maiores conteúdos de areia,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e N. NS ficou no centro do gráfico entre IO e AF, com pontos próximos e compartilhando características do solo com AF. A fitofisionomia NS foi agrupada principalmente por seus conteúdos de C orgânico, H+Al, CEC e  $\text{CEC}_{\text{pH } 7.00}$ . E AF foi separada pelos seus maiores conteúdos de argila e  $\text{Al}^{3+}$ .

### 3.3. Diversidade fenotípica das estirpes capturadas

327 estirpes foram isoladas de nódulos de siratro, 157 estirpes na estação seca e 170 estirpes na estação chuvosa. As estirpes foram agrupadas em seis grupos culturais: rápido e ácido (FAC), rápido e neutro (FN), intermediário e ácido (IAC), intermediário e neutro (IN), lento e neutro (SN) e lento e alcalino (SAL) (Figura 3). A distribuição das estirpes em grupos culturais, nas estações seca e chuvosa, respectivamente, foi: FAC: 79 e 78; FN: 15 e 7; IAC: 5 e 3; IN: 12 e 6; SN: 42 e 73; SAL: 5 e 3 (Figura 3). Houve uma predominância de estirpes nos grupos culturais FAC e SN em todas as fitofisionomias e nas duas estações. IO não apresentou isolados representantes de todos os grupos culturais, mas apenas FAC, IN, SN e SAL, sendo isoladas 18 estirpes na estação seca, e 20 na chuvosa, com predomínio de estirpes do grupo

FAC (10 e 7 estirpes, estação seca e chuvosa, respectivamente) e SN (6 e 11 estirpes) (Figura 3). NS, AF e RA tiveram isolados distribuídos em todos os grupos culturais. Na NS foram isoladas 34 e 49 estirpes nas estações seca e chuvosa, respectivamente, com predomínio em FAC (18 e 23 estirpes) e SN (10 e 21 estirpes); na AF foram isolados 57 estirpes na estação seca e 51 estirpes na estação chuvosa, com predomínio em FAC (31 e 27 estirpes) e SN (10 e 17 estirpes). A RA teve 48 e 50 nas estações seca e chuvosa, respectivamente, com predomínio em FAC (20 e 21 estirpes) e SN (10 e 24 estirpes) (Figura 3).

#### 3.4. Diversidade genética das estirpes por sequenciamento do gene 16S rRNA

As 327 estirpes bacterianas isoladas dos nódulos de siratro tiveram o gene 16S rRNA sequenciado. As sequências foram comparadas com sequências do banco de dados Genbank (NCBI), com similaridades que variaram de 96% a 100%, e foram filogeneticamente similares aos gêneros pertencentes aos filos: Proteobacteria (classes  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria e  $\beta$ -Proteobacteria); Firmicutes (classe Bacilli); Bacteroidetes (classe Sphingobacteria); Actinobacteria; Acidobacteria (Acidobacteria) (Figuras 4). A riqueza foi de 29 gêneros na estação seca e 18 na estação chuvosa. Desses gêneros foram isolados quatro gêneros de rizóbios, tanto na estação seca (*Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*), quanto na estação chuvosa (*Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*) (Figura 5 e Tabela S2).

Na IO foram isoladas 18 estirpes na estação seca e 20 na chuvosa, identificados gêneros de rizóbios: *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium*; gêneros endofíticos: *Bacillus*, *Cohnella*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Mucilaginibacter*, *Paenibacillus*; e ainda o gênero *Terriglobus* (Figuras 4). Na NS foram isoladas 34 estirpes na estação seca e 49 estirpes na estação chuvosa, identificados os rizóbios: *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*; os endofíticos: *Cohnella*, *Leifsonia*, *Luteibacter*, *Novosphingobium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*; e também *Chelatococcus* (Figuras 4, Tabelas S2 e S3). Na AF foram isoladas 57 estirpes na estação seca e 51 estirpes na estação chuvosa, identificados os rizóbios: *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*; os endofíticos: *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Brevundimonas*, *Caulobacter*, *Enterobacter*, *Leifsonia*, *Novosphingobium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*; e também *Chitinophaga*, *Dyella*, *Stenotrophomonas*. (Figuras 4). E na RA foram isoladas 48 estirpes na estação seca e 50 estirpes na estação chuvosa, identificadas nos gêneros de rizóbios: *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Rhizobium*; nos gêneros endofíticos: *Bosea*, *Herbaspirillum*, *Leifsonia*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingobium*,

*Sphingomonas*; e em outros gêneros: *Acidovorax*, *Dyella*, *Labrys*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter*, *Variovorax* (Figuras 4). *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Paenibacillus* foram os gêneros com maior ocorrência em todas as fitofisionomias e nas duas estações (Figuras 4 e Tabela S2).

#### 4. Discussão

Embora não seja uma espécie nativa da região do Quadrilátero Ferrífero, o siratro foi eficiente na captura de PGPR nos solos de todas as fitofisionomias estudadas, pois a maioria das plantas de siratro apresentou nodulação positiva. A presença de nódulos na planta isca em um cultivo armadilha demonstra que a densidade de PGPR presente no solo foi suficiente para induzir a nodulação. Estes resultados corroboram que o siratro é uma boa opção de espécie de planta isca para estudos de biodiversidade, pois é um hospedeiro promíscuo, com uma ampla gama de microsimbiontes (Borges et al., 2016; Jesus et al., 2005; Lima et al., 2009).

A RA apresentou maior NN, RE e índice SPAD, em ambas as estações, isso pode decorrer devido à pressão seletiva em um ambiente deficiente de nitrogênio que estimula a fixação biológica de nitrogênio (FBN) pelas comunidades de rizóbios presentes no solo. As diferenças detectadas pelo NN e no índice SPAD, em ambas as estações, nas plantas de siratro inoculadas com suspensão de solo das diferentes fitofisionomias do Quadrilátero Ferrífero, demonstram ser a avaliação da eficiência simbiótica das comunidades de PGPR um eficaz descritor das características de funcionalidade da microbiota dos solos, e assim estimar a qualidade dos mesmos. O número de nódulos formados na planta isca é um reflexo do número de bactérias fixadoras de nitrogênio presentes nas amostras, representando uma medida semiquantitativa de sua densidade, que é útil para comparação entre sistemas de uso da terra (Lima et al. 2009). O N é considerado, juntamente com o P, como os nutrientes mais limitantes em ecossistemas tropicais (Moreira et al., 2009; Ribeiro et al., 2017) e pesquisar microrganismos que podem realizar o processo de FBN se destaca para aplicações em processos de reabilitação do solo após atividade de mineração.

A avaliação do índice SPAD foi mais eficiente em detectar diferenças na eficiência das comunidades bacterianas entre as fitofisionomias que o SDM. O índice SPAD é uma medida indireta do conteúdo de clorofila na folha e pode ser correlacionado com os teores de N na planta (Cerezini et al., 2017; Knoth et al., 2014; Rondon et al., 2007). As leituras do SPAD em RA foram semelhantes e até superiores, o que ocorreu na estação chuvosa, em relação ao controle com N mineral, o que não foi detectado pelo SDM. Provavelmente, isso ocorre devido ao curto período de cultivo (45 dias), que não seria suficiente para que o nitrogênio

absorvido seja convertido em matéria seca, o que torna o índice SPAD uma variável eficaz para avaliar a eficiência simbiótica de comunidades no processo de fixação biológica de N em condições axênicas por períodos curtos. Em estudo de autenticação de BFN, utilizando feijão caupi como planta hospedeira, já havia sido relatada a importância desse índice como ferramenta para determinar a eficiência simbiótica por períodos curtos de cultivo em casa-de-vegetação (Jaramillo et al., 2013).

A eficiência simbiótica das comunidades de PGPR, nos dois períodos de coleta, foi diretamente correlacionada com pH, saturação de base,  $\text{Cu}^{2+}$  e argila, e inversamente correlacionadas com  $\text{Al}^{3+}$ , H+Al, CEC efetiva, CEC a pH 7,  $\text{Zn}^{2+}$ , organic C, total N,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e areia (Figura 2, Tabela 2). A RA apresentou a maior eficiência da comunidade bacteriana capturada por siratro, e foi separada das demais fitofisionomias, nas duas estações, por seus maiores valores de NN, NDM e índice SPAD, que correlacionou com pH, V% e  $\text{Cu}^{2+}$ . De acordo com a literatura, a maioria das estirpes bacterianas são sensíveis aos elevados teores de Cu no solo (Lima et al., 2009; Matsuda et al. 2002; Trannin et al., 2001), no entanto, aquelas isoladas de RA foram indiferentes ao alto teor de Cu nessa área.

A AF e a NS foram agrupadas próximas no gráfico da PCA (Figura 2), até com sobreposição de pontos na estação seca, demonstrando que as mesmas características do solo foram importantes no agrupamento dessas fitofisionomias pelos maiores teores de  $\text{Al}^{3+}$ , H+Al, CEC. AF também apresentou o maior teor de argila entre as fitofisionomias. Os solos com maiores teores de argila favorecem a maior interação entre os microrganismos e as superfícies dos colóides do solo, o que pode aumentar a sua sobrevivência e maior possibilidade de propagar-se (Stotzky 1972), o que explica a maior riqueza de gêneros em AF na estação chuvosa (Figura 4). As fitofisionomias avaliadas nesse estudo levam à deposição de diferentes materiais vegetais no solo em função de suas diferenças na composição florística e densidade de cobertura vegetal. Além disso, as diferentes características físico-químicas do solo proporcionaram condições variadas para o estabelecimento de uma comunidade diversificada nesses solos, como relatado por Castro et al. (2017), Silva et al. (2018) e Vieira et al. (2017).

As maiores riquezas de gêneros foram encontradas em RA e AF, já as menores em IO e NS (Figura 4). Essa menor riqueza de gêneros capturados em IO e NS pode ser associada às características do solo, como serem rasos e com elevado conteúdo de C e N, verificado nas duas estações climáticas (Tabela S1). Silva et al. (2018) mostraram que IO e NS apresentaram atividades microbianas muito relacionada com os maiores teores de C orgânico e N total no solo. IO, provavelmente, por suas características de solo com elevado teor de matéria orgânica, areia e  $\text{Fe}^{2+}$ , não apresentou isolados em todos os pontos de coleta e mostrou uma

menor eficiência de comunidade (Tabela 1, Figura 1). A fertilidade dos solos de Canga está associada principalmente a decomposição da serapilheira, que podem ser suficientes para sustentar a vegetação nativa (Ribeiro et al., 2017).

A Canga é uma fitofisionomia com alta complexidade, principalmente por suas características de solo. Apresenta uma biota adaptada a essas condições, como alto teor de  $Fe^{2+}$ , solos rasos e arenosos, com uma diversidade microbiana ainda pouco estudada (Carvalho et al., 2012; Castro et al., 2017; Matias et al., 2009; Ribeiro et al., 2017; Teixeira et al., 2017; Vieira et al., 2017). Por ser um *hotspot* de biodiversidade e uma área com potencial para a extração de minério de ferro, torna-se importante conhecer e estudar a biodiversidade e a dinâmica ecológica nesses ambientes, o que pode auxiliar na obtenção de recursos biotecnológicos adaptados a estas condições para serem utilizados em projetos de reabilitação após mineração de ferro.

As estirpes bacterianas isoladas das fitofisionomias foram identificadas como pertencentes aos filos Proteobacteria (classes  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria e  $\beta$ -Proteobacteria); Firmicutes (classe Bacilli); Bacteroidetes (classe Sphingobacteria); Actinobacteria; Acidobacteria (Acidobacteria) (Figura 4), demonstrando a alta diversidade genética encontrada. No filo Proteobacteria os gêneros *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium* e *Rhizobium* são reconhecidos como simbióticos de siratro (Angus et al., 2013; Araújo et al., 2017; Ardley et al., 2014; Borges et al., 2016; Lima et al., 2009; Moulin et al., 2001; Sy et al., 2001).

Apesar dos gêneros *Acidovorax*, *Chelatococcus*, *Chitinophaga*, *Dyella*, *Labrys*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter*, *Variovorax*, *Stenotrophomonas* e *Terriglobus* não serem reconhecidos PGPR há registros na literatura de espécies endofíticas com propriedades promotoras de crescimento (Armanhi et al., 2018; Castro et al., 2017; Chou et al., 2007; Hoque et al 2011; Li et al., 2011; Lu et al., 2017; Sun et al., 2017; Thijs et al., 2014; Whang et al., 2014; Xiao et al., 2017). Já os demais gêneros isolados tem registro na literatura como bactérias endofíticas e promotoras de crescimento vegetal (Chen et al 2001; Costa et al., 2016; Flores-Félix et al., 2014; Guglielmetti et al., 2013; Guimarães et al., 2012; Jaramillo et al., 2013; Mendis et al., 2018; Souza et al., 2015; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2017). Embora as relações simbióticas dessas comunidades com o siratro podem ser diferentes daquelas com espécies Leguminosae nativas de cada fitofisionomia (Diabate et al., 2005; Lima et al., 2009; Ribeiro et al., 2017; Santos et al., 2017), mesmo rizóbios podem atuar como PGPR por meio de vários processos contribuindo para a sustentabilidade dos ecossistemas.

Os gêneros simbióticos mais comuns foram *Bradyrhizobium* (28% dos isolados na estação seca e 45% dos isolados na chuvosa) e *Rhizobium* (13% dos isolados na estação seca e 14% dos isolados na chuvosa). Nas fitofisionomias, *Bradyrhizobium* foi o gênero mais comum, representando: 28% e 32% em IO; 43% e 60% em NS; 23% e 35% em AF; 23% e 54% em RA, nas estações seca e chuvosa respectivamente (Figura 4). O predomínio de *Bradyrhizobium* nessas fitofisionomias é uma condição comum a solos tropicais, semelhante ao relatado por Borges et al. (2016), Costa et al. (2013), Guimarães et al. (2012), Jaramillo et al. (2013), Lima et al. (2009) Perrineau et al. (2011) e Quadros et al. (2016). Foram capturados apenas os gêneros nodulíferos em leguminosa *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* em IO, não sendo observado *Burkholderia*, que é relatado por Ribeiro et al. (2017) e por Castro et al. (2017) como gêneros que ocorrem em Canga.

Em todas as fitofisionomias foram isolados gêneros de bactérias endofíticas promotoras de crescimento vegetal. É bem relatado que os nódulos de leguminosas abrigam rizóbios juntamente com outras bactérias endofíticas (Castro et al., 2017; Lima et al., 2009; Peix et al. 2015) cujo papel na simbiose das leguminosas é pouco conhecido. No entanto, eles podem ter efeitos positivos uma vez que muitos desses endófitos apresentaram mecanismos de promoção do crescimento vegetal (Costa et al., 2016; Rangel et al., 2016; Velázquez et al., 2013), que se faz necessário estudar a aplicação desses organismos em estudos de co inoculação em plantas para a revegetação em áreas após a atividade de mineração.

Avaliando a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio nas mesmas áreas do Quadrilátero Ferrífero no período seco, utilizando o caupi (*Vigna unguiculata*) como planta isca, Castro et al. (2017) obtiveram os gêneros simbióticos *Bradyrhizobium*, *Cupriavidus*, *Rhizobium* e *Burkholderia*, sendo este último o gênero predominante nas fitofisionomias. O gênero *Cupriavidus* não foi registrado no presente estudo, assim como os gêneros *Paraburkholderia*, *Agrobacterium* e *Bacteroidetes*, ressaltando a importância do uso de diferentes espécies como planta isca no estudo de diversidade de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Eles também encontraram os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Chitinophaga*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Novosphingobium*, *Paenebacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Terriglobus*, que foram observados em nosso estudo (Figuras 4).

A diversidade de RA semelhante à AF demonstra que o capim foi eficiente em estimular e manter uma comunidade de bactérias promotoras de crescimento vegetal, que além de diversa, foi eficiente (Figuras 1, 5 e Tabela 1). Essas bactérias são multifuncionais, podendo

promover a fixação biológica de N simbiótica e associativa, produzir fitohormônios e sideróforos, e solubizar fosfato (Angus et al., 2013; Costa et al., 2016; Oliveira-Longatti et al., 2015; Rangel et al., 2016; Santoyo et al., 2016; Velázquez et al. 2017; Wdowiak-Wróbel et al., 2017), e podem estar atuando na recuperação dessa área por meio desses processos.

A multifuncionalidade dos ecossistemas apresenta uma forte correlação com a biodiversidade do solo. A composição das comunidades microbianas é um fator chave na regulação do funcionamento dos ecossistemas, ou seja, qualquer alteração que possa gerar perda de biodiversidade ameaça a multifuncionalidade e sustentabilidade desse ambiente. As alterações por meio da atividade de mineração podem diminuir a biodiversidade e a atividade microbiana (Claassens, et al., 2008; Quadros et al., 2016), porém o uso de medidas para a reabilitação dos solos com revegetação pode auxiliar no retorno dessa biodiversidade, como constatado em nossos resultados, em que a riqueza de gêneros em RA foi semelhante a riqueza em AF (Figura 5), e em outras pesquisas em áreas revegetadas após mineração (Escobar et al., 2015; Mukhopadhyay, et al., 2016; Santos et al., 2016; Teixeira et al., 2017, Vieira et al., 2017).

## Conclusões

Os solos da área reabilitada após a mineração de ferro e das fitofisionomias adjacentes apresentam comunidades de bactérias promotoras de crescimento vegetal que foram capturadas por sítio nas duas estações climáticas.

A eficiência de comunidade de bactérias promotoras de crescimento vegetal é maior na área reabilitada (RA) seguida de AF/ NS e IO.

O índice SPAD foi mais eficaz em descrever a eficiência das comunidades do que a matéria seca da parte aérea.

Os atributos químicos e físicos pH, saturação de base,  $\text{Cu}^{2+}$  e argila são diretamente correlacionados com a eficiência de comunidades de bactérias promotoras de crescimento vegetal, já  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{H}^+\text{Al}$ , CEC,  $\text{CEC}_{\text{pH } 7.00}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , C, N,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e areia são inversamente correlacionados.

Há uma alta riqueza de gêneros e diversidade genética nas fitofisionomias, em ambas as estações coletadas. A área reabilitada apresenta uma alta riqueza de gêneros, que foi igual à Mata Atlântica na estação seca.

Gêneros dos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria estão presentes nas fitofisionomias. Sendo que *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Paenebacillus*, pertencentes ao filo Proteobacteria, foram os gêneros predominantes nas fitofisionomias e em ambas as estações.

A maior eficiência simbiótica e a elevada diversidade genética da comunidade de bactérias promotoras de crescimento vegetal encontrada na área reabilitada indicam que a reabilitação do solo está sendo efetiva.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido ao projeto CRA-RDP-00136-10 (Fapemig / Fapesp / Fapespa / VALE SA) e agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro e bolsas concedidas aos autores. Agradecemos também a Teotônio Soares de Carvalho pela valiosa ajuda na análise multivariada.

#### Referencias

Angus, A.A., Lee, A. Lum, M.R., Shehayeb, M., Hessabi, R., Fujishige, N.A., Yerrapragada, S., Kano, S., Song, N., Yang, P., los Santos, P. E., Faria, S.M., Dakora, F.D., Weinstock, G. Hirsch, A.M. 2013. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macropodium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. Plant Soil, 369, 543–562. Doi: 10.1007/s11104-013-1590-7

Araújo, K.S., Carvalho, F., Moreira, F.M.S. 2017. *Burkholderia* strains promote Mimosa spp. growth but not *Macropodium atropurpureum*. Revista Ciência Agrônômica, 48, 41–48.

Ardley, J., Tian, R., Howieson, J., Yates, R., Bräu, L., Han, J., Lobos, E., Huntemann, M., Chen, A., Mavromatis, K., Markowitz, V., Ivanova, N., Pati, A., Goodwin, L., Woyke, T., Kyrpides, N., Reeve, W. 2014. Genome sequence of the dark pink pigmented *Listia bainesii* microsymbiont *Methylobacterium* sp. WSM2598. Stand Genomic Sci, 9–5. Doi: <https://doi.org/10.1186/1944-3277-9-5>

Armanhi, J.S.L., de Souza, R.S.C., Damasceno, N.B., de Araújo, L.M., Imperial, J., Arruda, P. 2018. A community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome. Front. Plant Sci. 8:2191. Doi: 10.3389/fpls.2017.02191

Borges, W.L., Yves Prin, Y., Ducouso, M., Le Roux, C., Faria, S.M. 2016. Rhizobial characterization in revegetated areas after bauxite mining. Brazilian Journal of Microbiology, 47, 314–321. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.009>

Bruce, T., Martinez, I.B., Maia Neto, O., Vicente, A.C., Krüger, R.H., Thompson, F.L. 2010. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. *Microb Ecol.* 60, 840–849. Epub 2010/10/05. Doi: 10.1007/s00248-010-9750-2 PMID: 20886336.

Cao, Y., Chen, F., Li, Y., Wei, S., Wang, G., 2015. *Paenibacillus ferrarius* sp. nov., isolated from iron mineral soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 165–170. Doi:10.1099/ijs.0.063552-0

Carvalho Filho, A., Curi, N., Shinzato, E., 2010. Relações solo-paisagem no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 45, 903–916. Doi:10.1590/s0100-204X2010000800017

Carvalho Filho, A., Inda, A.V., Fink, J.R., Curi, N., 2015. Iron oxides in soils of different lithological origins in Ferriferous Quadrilateral (Minas Gerais, Brazil). *Appl. Clay Sci.* 118, 1–7. Doi:10.1016/j.clay.2015.08.037

Carvalho, F.; Souza, F. A.; Carrenho, R.; Moreira, F. M. S.; Jesus, E. C.; Fernandes, G. W.. The mosaic of habitats in the high-altitude Brazilian rupestrian fields is a hotspot for arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl Soil Ecol.*, 52, 9–19. 2012. Doi:10.1016/j.apsoil.2011.10.001

Carvalho, T.S., Jesus, E.C., Barlow, J., Gardner, T.A., Soares, I.C., Tiedje, J.M., Moreira, F.M.S., 2016. Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria. *Ecology*, v. 97, p. 2760–2771. 2016.

Castro, A. P., Silva, M. R. S. S., Quirino, B. F., Bustamante, M. M. C., Krüger, R. H. 2016. Microbial Diversity in Cerrado Biome (Neotropical Savanna) Soils. *PLoS ONE*, 1-16, 11(2):e0148785. Doi: 10.1371/journal.pone.0148785

Castro, J.L., Souza, M.G., Rufini, M., Guimarães, A.A., Rodrigues, T.L., Moreira, F.M.S. 2017. Diversity and Efficiency of Rhizobia Communities from Iron Mining Areas Using Cowpea as a Trap Plant. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 41:e0160525. Doi: <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20160525>

Cerezini, P., Fagotti, D.S.L., Pípolo, A.E., Hungria, M., Nogueira, M.A. 2017. Water restriction and physiological traits in soybean genotypes contrasting for nitrogen fixation drought tolerance. *Sci. agric.* 74, 110–117. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0462>

Chen, W.M., Laevens, S., Lee, T.M., Coenye, T., de Vos, P., Mergeay, M. Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1729–1735. Doi: 10.1099/00207713-51-5-1729

Chou, Y.J., Elliott, G.N., James, E.K., Lin, K.Y., Chou, J.H., Sheu, S.Y., Sheu, D.S., Sprent, J.I., Chen, W.M. 2007. *Labrys neptuniae* sp. nov., isolated from root nodules of the aquatic legume *Neptunia oleracea*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 577–581. Doi: 10.1099/ijs.0.64553-0

Claassens, S., Jansen van Rensburg, P.J., Maboeta, M.S., van Rensburg, L. 2008. Soil Microbial community function and structure in a post-mining chronosequence. *Water Air Soil Poll*, 194, 315–329. Doi: 10.1007/s11270-008-9719-7

Claassens, S., van Rensburg, P.J., Liebenberg, D., van Rensburg, L. (2012) A Comparison of microbial community function and structure in rehabilitated asbestos and coal discard sites. *Water Air Soil Poll*, 223, 1091–1100. Doi: 10.1007/s11270-011-0927-1

Costa, E.M., Carvalho, F., Nóbrega, R.S.A., Silva, J.S., Moreira, F.M.S. 2016. Bacterial strains from floodplain soils perform different plant-growth promoting processes and enhance cowpea growth. *Sci. Agric.* 73, 301–310. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0294>

Costa, E.M., Guimarães, A.A., Vicentin, R.P., Ribeiro, P.R.A., Leão, A.C.R., Balsanelli, E., Lebbe, L., Aerts, M., Willems, A., Moreira, F.M.S. 2017. *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. *Arch Microbiol*, 199, 1211–1221. Doi: 10.1007/s00203-017-1390-1

Costa, E.M., Nobrega, R.S.A., Carvalho, F., Trochmann, A., Ferreira, L.V.M., Moreira, F.M.S. 2013. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão caupi. *Pesq Agropec Bras.* 48, 1275-84. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012>

Costa, E.M.; Nóbrega, R.S.A.; Ferreira, L.V.M.; Amaral, F.H.C.; Nóbrega, J.C.A.; Silva, A.F.T.; Moreira, F.M.S. 2014. Growth and yield of the cowpea cultivar BRS 32 Guariba inoculated with rhizobia strains in southwest Piauí. *Semin Cienc Agrar.* 35, 3073–3084.

Dall’Agnol, R.F., Plotegher, F., Souza, R.C., Mendes, I.C., Reis Junior, F.B., Béna, G., Moulin, L., Hungria, M. 2016. *Paraburkholderia nodosa* is the main N<sub>2</sub>-fixing species trapped by promiscuous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Brazilian “Cerradão”. *FEMS Microbiol Ecol.* 92, 1–14. Doi: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw108>

Diabate, M., Munive, A., Faria, S.M., Ba, A., Dreyfus, B., Galiana, A. 2005. Occurrence of nodulation in unexplored leguminous trees native to the West African tropical rainforest and inoculation response of native species useful in reforestation. *New Phytologist*, 166, 231–239. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01318.x

Escobar, I.E.C., Santos, V.M., Silva, D.K.A., Fernandes, M.F., Cavalcante, U.M.T., Maia, L.C. 2015. Changes in Microbial Community Structure and Soil Biological Properties in Mined Dune Areas During Re-vegetation. *Environmental Management*, 55, 1433–1445. Doi: 10.1007/s00267-015-0470-8

Ferreira, D.F., 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, 38, 109–112. Doi:10.1590/S1413-70542014000200001

Flores-Félix, J.D., Carro, L., Ramírez-Bahena, M.H., Tejedor, C., Igual, J.M., Peix, A., Velázquez, E. 2014. *Cohnella lupini* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Lupinus albus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 83–87. Doi: 10.1099/ijs.0.050849-0

Fred, E. B; Waksman, S. A. 1928. Laboratory manual of general microbiology, McGraw-Hill, New York, NY. p 33.

Guglielmetti, S., Basilico, R., Taverniti, V., Arioli, S., Piagnani, C., Bernacchi, A. 2013. *Luteibacter rhizovicinus* MIMR1 promotes root development in barley (*Hordeum vulgare* L.) under laboratory conditions. *World J Microbiol Biotechnol.*, 29, 2025–2032. Doi: 10.1007/s11274-013-1365-6

Guimarães, A.A., Jaramillo, P.M.D., Nóbrega, R.S.A.; Florentino, L.A., Silva, K.B., Moreira, F.M.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. *J Appl Environ Microbiol.*, 78, 6726–6733. Doi:10.1128/AEM.01303-12

Hoagland, D., Arnon, D. I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station circular no. 347. University of California, Berkeley, CA.

Hoque, M.S., Broadhurst, L.M., Thrall, P.H., 2011. Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (*Mimosaceae*) across south-eastern Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 299–309. Doi: 10.1099/ijs.0.021014-0

Hungria, M., Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crop Res.* 65, 151–164. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00084-2)

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. *Sci Agr.*, 70, 397–404. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000600004>

Jesus, E.C., Moreira, F.M.S., Florentino, L.A., Rodrigues, M.I.D., Oliveira, M.S. 2005. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesq. Agrop. Bras.*, 40, 769–776.

Knoth, J.L., Kim, S.H., Ettl, G.J., Doty, S.L., 2014. Biological nitrogen fixation and biomass accumulation within poplar clones as a result of inoculations with diazotrophic endophyte consortia. *New Phytologist*, 201, 599–609, 2014. Doi: 10.1111/nph.12536

Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley and Sons, 115–75.

Li, D., Rothballer, M., Schmid, M., Esperschütz, J., Hartmann, A. 2011. *Acidovorax radicis* sp. nov., a wheat-root-colonizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2589–2594 Doi: 10.1099/ijs.0.025296-0

Lima, A.S., Nóbrega, R.S.A., Barberi, A., Silva, K., Ferreira, D.F., Moreira, F.M.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

Lu, X-M., Lu, P.-Z., Yang, K. 2017. Restoration using *Azolla imbricata* increases nitrogen functional bacterial groups and genes in soil. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 101, 3849–3859. Doi: 10.1007/s00253-017-8108-9

Matias, S.R., Pagano, M.C., Muzzi, F.C., Oliveira, C.A., Carneiro, A.A., Horta, S.N., Scotti, M.R., 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. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 259–266. Doi:10.1016/j.ejsobi.2009.02.003

Matsuda, A., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2002. Tolerance of rhizobia genera from different origins to zinc, copper and cadmium. *Pesq Agropec Bras.*, 37, 343–355.

Melloni, R.; Moreira, F.M.S.; Nobrega, R.S.A.; Siqueira, J.O. 2006. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. Ver. Bra. Ciênc. Solo, 30, 235–246.

Mendis, H.C., Thomas, V.P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J.-T., Waidyarathne, P., Kloepper, J., De La Fuente, L. 2018. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. PLoS ONE, 13(2): e0193119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193119>

Moreira, F.M.S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K. and Franco, A.A. 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. Syst Appl Microbiol, 16, 135–146.

Moreira, F.M.S., Haukka, K., Young, J.P.W. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. Mol Ecol., 7, 889–895. Doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00411.x

Moreira, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: Moreira, F.M.S., Huising, E.J., Bignell, D.E., ed. Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: Editora UFLA; 2010. p. 279 – 312.

Moreira, F.M.S., Nóbrega, R.S.A., Jesus, E.C., Ferreira, D.F., Pérez, D.V. 2009. Differentiation in the fertility of Inceptisols as related to land use in the upper Solimões river region, western Amazon. Science of the Total Environment, 408, 349–355. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.09.007

Moreira, F.M.S., Silva, M.F., Faria, S.M. 1992. Ocorrência de nodulação em legum espécies in the Amazon region of Brazil. New Phytology. 121, 563–570. Doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb01126.x

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of proteobacteria. Nature, 411, 948–950. Doi:10.1038/35082070

Mukhopadhyay, S., Masto, R.E., Yadav, A., George, J., Rama, L.C., Shukla, S.P., 2016. Soil quality index for evaluation of reclaimed coal mine spoil. Sci Total Environ, 542, 540–550. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.035>

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J.N. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403, 853–858. Doi: 10.1038/35002501

Neves, D.M., et al., Lack of floristic identity in campos rupestres—A hyperdiverse mosaic of rocky montane savannas in South America. Flora (2017), Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.011>

Niemann, S.; Puehler, A.; Tichy, H. V.; Simon, R.; Selbitshka, W. 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. v. 82, p. 477-484. 1997.

Nogueira, R.E., Pereira, O.L., Kasuya, M.C.M., Lanna, M.C.S., Mendonça, M.P. 2005. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 19, 417–424. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062005000300001>

Oliveira-Longatti, S.M., Sousa, P.M., Marra, L.M., Ferreira, P.A.A., Moreira F.M.S. 2015. *Burkholderia fungorum* promotes common bean growth in a dystrophic oxisol. *Ann Microbiol*, 65, 1825–1832. Doi: [10.1007/s13213-014-1020-y](https://doi.org/10.1007/s13213-014-1020-y)

Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Velázquez, E.; Bedmar, E.J. 2015. Bacterial Associations with Legumes. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 34, 17–42. Doi: [10.1080/07352689.2014.897899](https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899).

Perrineau, M.M., Le Roux, C., Faria, S.M., Balieiro, F.C., Galiana, A., Prin, Y., Béna, G. 2011. Genetic diversity of symbiotic Bradyrhizobium elkanii populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. *Syst Appl Microbiol.*, 34, 376–384. Doi: [10.1016/j.syapm.2011.03.003](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.03.003)

Pontes, J.S., Oehl, F., Pereira, C.D., Machado, C.T.T., Coyne, D., Silva, D.K.A., Maia, L.C. 2017. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the Brazilian's Cerrado and in soybean under conservation and conventional tillage. *Appl. Soil Ecol.*, 117–118, 178–189. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.023>

Quadros, P.D., Zhalnina, K., Davis-Richardson, A.G., Drew, J.C., Menezes, F.B., Camargo, F.A.O., Triplett, E.W. 2016. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. *Appl. Soil Ecol.* 98, 195–203. Doi: [10.1016/j.apsoil.2015.10.016](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.10.016)

Rangel, W.M., Thijs, S., Moreira, F.M.S., Weyens, N., Vangronsveld, J., Van Hamme, J.D., Bottos, E.M., Rineau, F. 2016. Draft genome sequence of *Mesorhizobium* sp. UFLA 01-765, a multitolerant, efficient symbiont and plant growth-promoting strain isolated from Zn-mining soil using *Leucaena leucocephala* as a trap plant. *Genome Announc.*, 4, 2:e00050-16. Doi: [10.1128/genomeA.00050-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.00050-16).

Ribeiro, P.C.D., Menendez, E., Silva, D.L., Bonieck, D., Ramírez-Bahena, M.H., Resende-Stoianoff, M.A., Peix, A., Velázquez, E., Mateos, P.F., Scotti, M.R. 2017. Invasion of the Brazilian campo rupestre by the exotic grass *Melinis minutiflora* is driven by the high soil N availability and changes in the N cycle. *Science of the Total Environment*, 577, 202–211. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.162>

Ribeiro, P.R.A., Santos, J.V., Costa, E.M., Lebbe, L., Assis, E.S., Louzada, M.O., Guimarães, A.A., Willems, A., Moreira, F.M.S. 2015. Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 212, 85–93. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.017>

Rondon, M. A., Lehmann, J., Ramírez, J., Hurtado, M. 2007. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. *Biol Fertil Soils*, 43, 699–708. Doi: [10.1007/s00374-006-0152-z](https://doi.org/10.1007/s00374-006-0152-z)

Santos, J. V., Varón-López, M. ; Soares, C. R. F. S ; Leal, P. L.; Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S. 2016. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. *Environ Sci Pollut Res.* 23, 6735–6748. Doi: [10.1007/s11356-015-5904-6](https://doi.org/10.1007/s11356-015-5904-6)

Santos, J.M.F., Alves, P.A.C., Silva, V.C., Ferreira, M., Rhem, K., James, E.K., Gross, E. 2017. Diverse genotypes of *Bradyrhizobium* nodulate herbaceous *Chamaecrista* (Moench)

(Fabaceae, Caesalpinioideae) species in Brazil. *Syst Appl Microbiol.*, 40, 69–79. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2016.12.004>

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M.C., Glick, B.R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>

Silva, A.F., Freitas, A.D.S., Costa, T.L., Fernandes-Júnior, P.I., Martins, L.M.V., Santos, C.E.R.S., Menezes, K.A.S., Sampaio, E.V.S.B. 2017. Biological nitrogen fixation in tropical dry forests with different legume diversity and abundance. *Nutr Cycl Agroecosyst*, 107, 321–334. Doi: [10.1007/s10705-017-9834-1](https://doi.org/10.1007/s10705-017-9834-1)

Silva, A.O., Costa, A.M., Teixeira, A.F.S., Guimarães, A.A., Santos, J.V., Moreira, F.M.S. 2018. Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. *Ecological Indicators*, Aceito para publicação.

Skirycz, A., Castilho, A., Chaparro, C., Carvalho, N., Tzotzos, G., Siqueira, J.O., 2014. Canga biodiversity, a matter of mining. *Front. Plant Sci.* 5, 1–9. Doi: [10.3389/fpls.2014.00653](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00653)

Souza, R., Meyer, J., Schoenfeld, R., Costa, P.B., Passaglia, L.M.P., 2015. Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with rice cropped in iron-stressed soils. *Ann Microbiol*, 65, 951–964. Doi: [10.1007/s13213-014-0939-3](https://doi.org/10.1007/s13213-014-0939-3)

Stotzky G (1972) Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. *Crit Rev Microbiol*, 1, 59–137. Doi: [10.3109/10408417209108383](https://doi.org/10.3109/10408417209108383)

Sun, H., Kang, B., Chai, Z., Sun, H., Du, H., Gao, J., Feng, Q., Zhang, C., Cao, Q., Guo, L. 2017. Characterization of root-associated microbiota in medicinal plants *Astragalus membranaceus* and *Astragalus mongholicus*. *Ann Microbiol*, 67, 587–599. Doi: [10.1007/s13213-017-1285-z](https://doi.org/10.1007/s13213-017-1285-z)

Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., De Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., Dreyfus, B. 2001. *Methylophilic methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*. 214–220. Doi: [10.1128/JB.183.1.214–220.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.1.214-220.2001)

Teixeira, A.F.S., Kimmelmeier, K., Marascalchi, M.N., Stürmer, S.L., Carneiro, M.A.C., Moreira, F.M.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. *Ciênc. Agrotec.* 41, 511–525. Doi: [10.1590/1413-70542017415014617](https://doi.org/10.1590/1413-70542017415014617)

Thijs, S., Van Dillewijn, P., Sillen, W., Truyens, S., Holtappels, M., D’Haen, J., Carleer, R., Weyens, N., Ameloot, M., Ramos, J.-L., Vangronsveld, J. 2014. Exploring the rhizospheric and endophytic bacterial communities of *Acer pseudoplatanus* growing on a TNT-contaminated soil: towards the development of a rhizocompetent TNT-detoxifying plant growth promoting consortium. *Plant Soil*, 385, 15–36. Doi: [10.1007/s11104-014-2260-0](https://doi.org/10.1007/s11104-014-2260-0)

Trannin, I.C.B., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., Lima, A. 2001. Tolerance of *Bradyrhizobium* and *Azorhizobium* strains and isolates to zinc, cadmium and copper “in vitro”. *Rev Bras Cienc Solo*, 25, 305–316.

Varajão, A.F.D.C., Salgado, A.A.R., Varajão, A.F.D.C., Braucher, R., Colin, F., Nalini-Júnior, H.A., 2009. Estudo da evolução da paisagem do Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais,

Brasil) por meio da mensuração das taxas de erosão ( $^{10}\text{Be}$ ) e da pedogênese. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 33, 1409–1425.

Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J.D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M.-H., Mulas, R., González-Andrés, F., Martínez-Molina, E., Peix, A. 2017. The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. In: Kumar V., Kumar M., Sharma S., Prasad R. (eds) *Probiotics and Plant Health*. Springer, Singapore. 41-70. Doi: 10.1007/978-981-10-3473-2\_3

Vieira, C.K., Marascalchi, M.N., Rodrigues, A.V., de Armas, R.D., Stürmer, S.L., 2017. Morphological and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated iron-mining site has the same magnitude of adjacent pristine ecosystems. *J. Environ. Sci. (China)* 1–14. Doi:10.1016/j.jes.2017.08.019

Vincent, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria, p 73–101. International biological programme handbook no. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom. 1970.

Wagg, C., Bender, S.F., Widmer, F., van der Heijden, M.G.A. 2014. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *PNAS*, 111, 5266–5270. Doi: 10.1073/pnas.1320054111

Wang, C., Zhou, J., Liu, J., Jiang, K., Du, D., 2017. Responses of soil N-fixing bacteria communities to *Amaranthus retroflexus* invasion under different forms of N deposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 247, 329–336. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.07.012>

Wdowiak-Wróbel, S., Marek-Kozaczuk, M., Kalita, M., Karás, M., Wójcik, M., Małek, W. 2017. Diversity and plant growth promoting properties of rhizobia isolated from root nodules of *Ononis arvensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110, 1087–1103. Doi: 10.1007/s10482-017-0883-x

Whang, K.-S., Lee, J.-C., Lee, H.-R., Han, S.-I., Chung, S.-H. 2014. *Terriglobus tenax* sp. nov., a novel exopolysaccharide producing acidobacterium isolated from rhizosphere soil of a medicinal plant. *Int J Syst Evolut Microbiol* 64(2):431–437. Doi: 10.1099/ijs.0.053769-0.

Xiao, X., Fan, M., Wang, E., Chen, W., Wei, G., 2017. Interactions of plant growth-promoting rhizobacteria and soil factors in two leguminous plants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 8485–8497. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8550-8>

Zhang, C., Lin, Y., Tian, X., Xu, Q., Chen, Z., Lin, W. 2016. Tobacco bacterial wilt suppression with biochar soil addition associates to improved soil physiochemical properties and increased rhizosphere bacteria abundance, *Appl. Soil Ecol.* Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.12.005>

Zhao, L.F., Xu, Y.J., Lai, X.H. 2017. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.007>

Tabela 1. Número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (NDM) e matéria seca da parte aérea (SDM) de plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) que foram inoculadas com amostras de solos de diferentes fitofisionomias, Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil, e comparadas a controles

Fitofisionomia/control s	NN		NDM		SDM	
			g plant <sup>-1</sup>		g plant <sup>-1</sup>	
	Dry	Rainy	Dry	Rainy	Dry	Rainy
IO	6.73 c*	4.13 d	0.009 b	0.002 b	0.139 c	0.082 e
NS	17.99 b	13.37 c	0.014 b	0.012 b	0.165 c	0.129 d
AF	17.29 b	14.9 c	0.014 b	0.009 b	0.119 c	0.054 e
RA	24.10 a	23.63 b	0.034 a	0.032 a	0.246 c	0.193 c
UFLA 04-212	16.40 b	46.10 a	0.034 a	0.068 a	0.135 c	0.429 b
HN	0	0	0	0	0.801 a	0.844 a
LN	0	0	0	0	0.141 c	0.159 d
CV %	29.63	26.61	0.6	0.49	21.7	16.25

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). UFLA 04-212-estirpe de *Bradyrhizobium brasilense* eficiente em siratro; HN (52,5 mg L<sup>-1</sup> de N), LN (5,25 mg L<sup>-1</sup> de N).

Tabela 2. Autovalores de atributos químicos e físicos do solo e a eficiência simbiótica de comunidades de bactérias isoladas de nódulos de plantas de siratro (*Macropodium atropurpureum*) que foram inoculadas com solos de Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil.

Variable	Dry period		Rainy period	
	PC1	PC2	PC1	PC2
	Explained variance (%)			
Individual	0.53	0.21	0.50	0.20
Accumulated	0.53	0.74	0.50	0.70
pH	<b>-0.97*</b>	0.31	<b>-0.97</b>	0.44
Al <sup>3+</sup>	<b>0.93</b>	-0.57	<b>0.91</b>	<b>-0.65</b>
H+Al	<b>1.14</b>	-0.09	<b>1.08</b>	0.13
CEC	<b>0.98</b>	-0.41	<b>0.82</b>	-0.42
CEC <sub>pH 7.00</sub>	<b>1.10</b>	-0.15	<b>1.03</b>	0.04
V%	<b>-1.04</b>	0.32	<b>-1.08</b>	0.23
Zn <sup>2+</sup>	<b>0.79</b>	0.59	0.22	<b>0.87</b>
Fe <sup>2+</sup>	0.41	<b>0.86</b>	<b>0.62</b>	<b>0.80</b>
Mn <sup>2+</sup>	-0.38	<b>0.77</b>	<b>-0.64</b>	0.44
Cu <sup>2+</sup>	<b>-1.02</b>	0.06	<b>-0.99</b>	0.06
Clay	0.42	<b>-1.07</b>	0.40	<b>-1.06</b>
Sand	-0.15	<b>1.00</b>	-0.03	<b>0.99</b>
Organic Carbon	<b>1.05</b>	0.16	<b>1.00</b>	0.24
Total Nitrogen	<b>1.02</b>	0.29	<b>1.01</b>	0.50
SPAD	<b>-0.92</b>	<b>-0.61</b>	<b>-0.75</b>	-0.12
NN	<b>-0.84</b>	<b>-0.65</b>	<b>-0.80</b>	-0.48
NDM	<b>-1.01</b>	-0.31	<b>-1.00</b>	-0.16
SDM	<b>-0.89</b>	-0.09	<b>-0.92</b>	0.19

\*Em negrito valores com maiores que 0.60. Capacidade de troca de cátions (CEC), capacidade de troca de cátions a pH 7.00 (CEC<sub>pH 7.00</sub>), índice SPAD (SPAD), número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (NDM) e matéria seca da parte aérea (SDM).

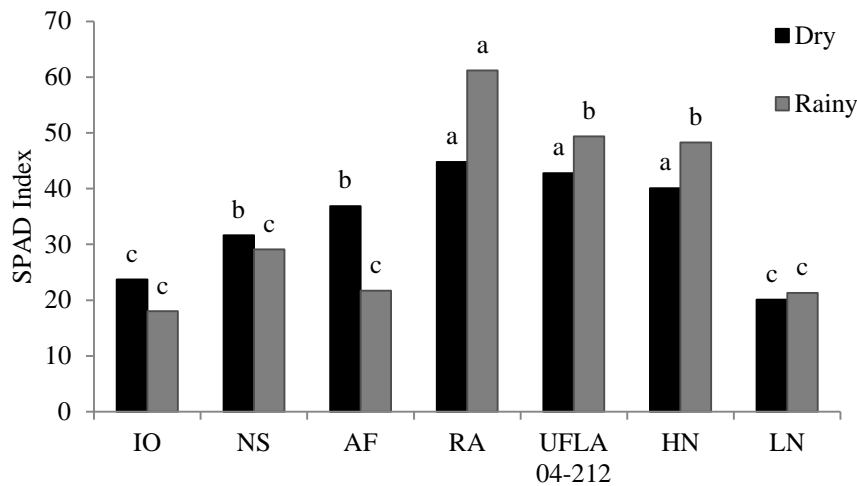


Figura 1. Eficiência simbiótica de comunidades de bactérias por meio da leitura do índice SPAD de plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) que foram inoculadas com solos de diferentes fitofisionomias: Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). UFLA 04-212- estirpe de *Bradyrhizobium brasilense* eficiente em siratro, HN ( $52,5 \text{ mg L}^{-1}$  de N), LN ( $5,25 \text{ mg L}^{-1}$  de N). A eficiência relativa foi calculada pela equação:  $RE = (\text{matéria seca da parte aérea do tratamento inoculado} / \text{matéria seca da parte aérea do controle HN}) \times 100$

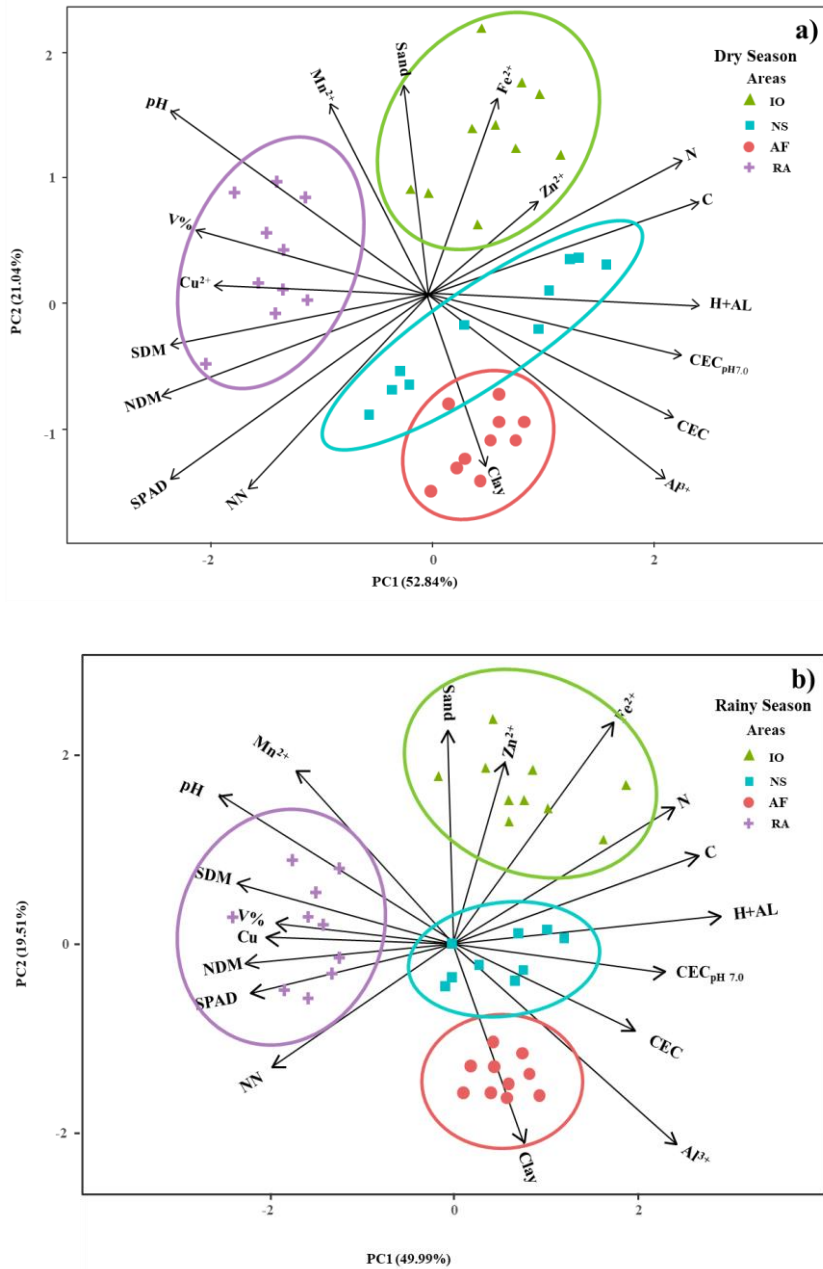


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) relacionando atributos químicos e físicos do solo e a eficiência simbiótica de comunidades de bactérias isoladas de nódulos de plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) que foram inoculadas com solos de Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. Capacidade de troca de cátions (CEC), capacidade de troca de cátions a pH 7.00 (CEC<sub>pH 7.00</sub>), índice SPAD (SPAD), número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (NDM) e matéria seca da parte aérea (SDM).

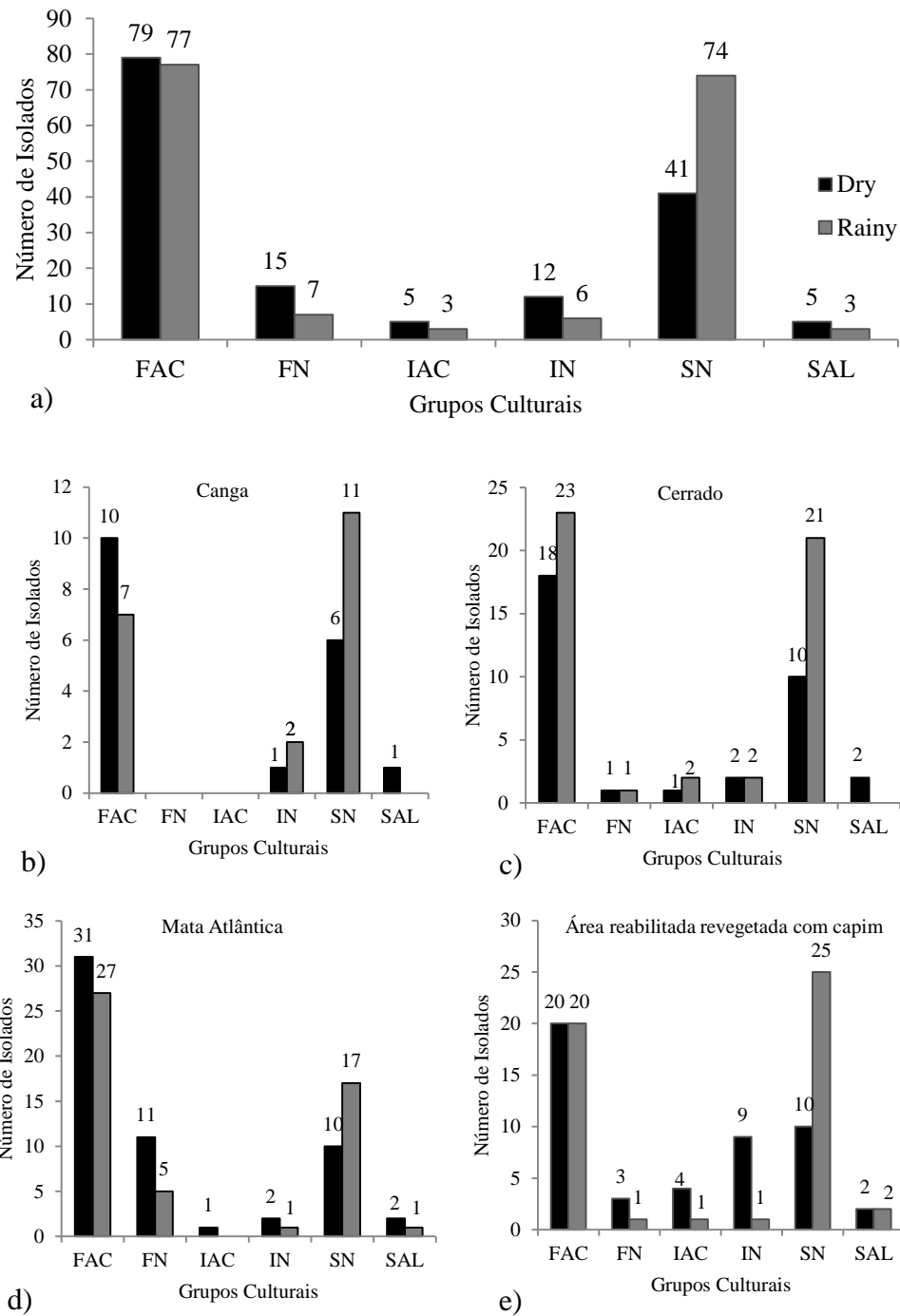


Figura 3. Grupos culturais de estirpes de bactérias isoladas de nódulos de plantas de siratro (*Macropitilium atropurpureum*) que foram inoculadas com solos de Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. FAC (fast and acid – rápido e ácido), FN (fast and neutro – rápido e neutro), IAC (intermediary and acid – intermediário e ácido), IN (intermediary and neutro – intermediário e neutro), SN (slow and neutro – lento e neutro) e SAL (slow and alcaline – lento e alcalino).

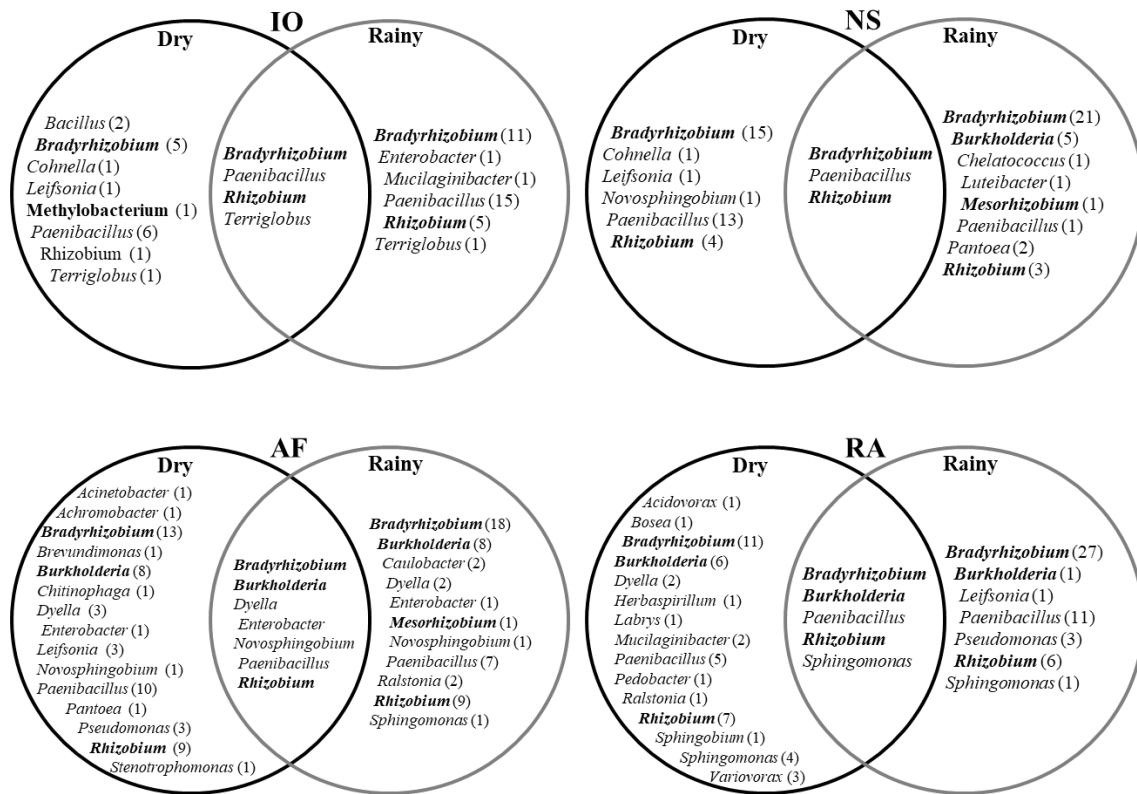


Figura 4. Distribuição por estação climática, seca e chuvosa, de gêneros de bactérias isoladas de nódulos de plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) que foram inoculadas com solos de Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. Na intercessão estão os gêneros que ocorreram nas duas estações; em negrito estão os gêneros simbióticos; o número de isolados em cada fitofisionomia está descrito entre parênteses.

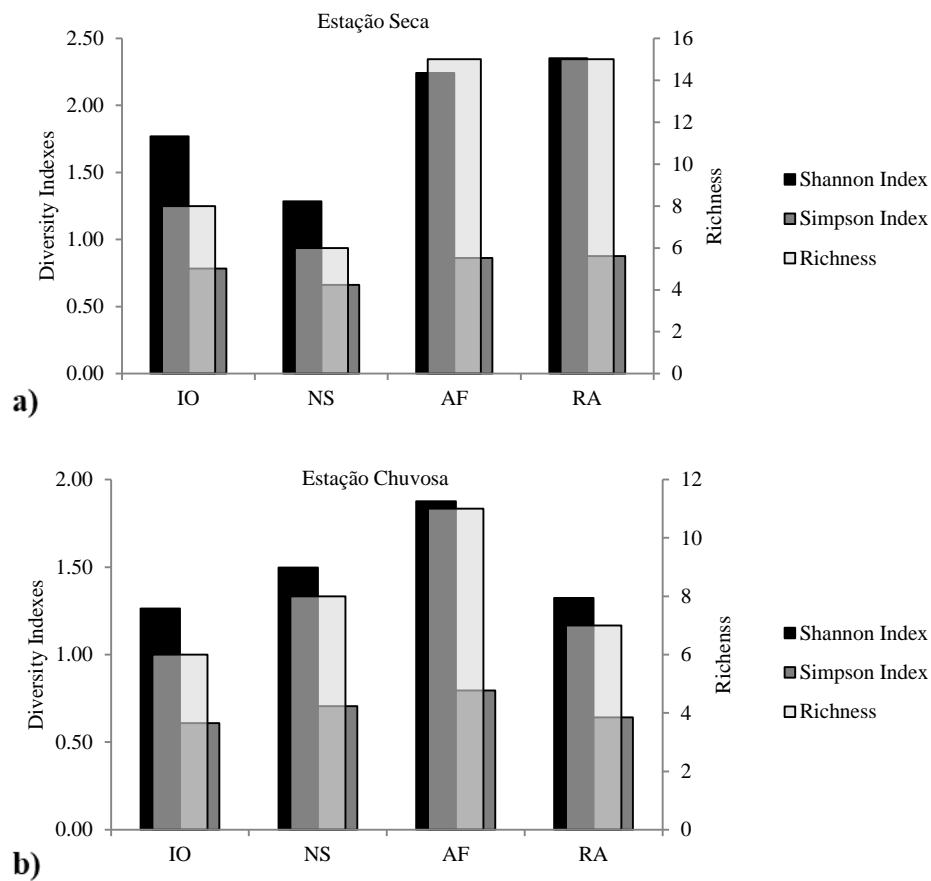


Figura 5. Índices de diversidade (Diversity Indexes) de Shannon e de Simpson e riqueza (Richness) de gêneros na estação seca (a) e na estação chuvosa (b), de bactérias isoladas de nódulos de plantas de siratro (*Macropodium atropurpureum*) que foram inoculadas com solos de Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil.

Tabela S1. Atributos químicos e textura de solos de diferentes fitofisionomias - Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil.

	IO	NS	AF	RA	CV%	OI	NS	AF	RA	CV%
	Estação seca *					Estação Chuvosa**				
pH (H <sub>2</sub> O)	4.72 c ***	4.97 b	4.21 d	5.60 a	5.36	4.47 b	4.66 b	3.91 c	5.36 a	7.45
K (mg dm <sup>-3</sup> )	56.80 a	75.60 a	75.60 a	88.20 a	26.78	64.00 c	83.80 a	78.00 b	85.20 a	27.62
P (mg dm <sup>-3</sup> )	1.60 b	1.36 b	2.15 a	1.66 b	23.50	2.27 b	1.62 b	2.12 b	3.18 a	25.62
P-rem (mg dm <sup>-3</sup> )	12.72 a	4.75 b	11.03 a	11.08	27.26	20.11 a	7.67 c	16.52 b	20.10 a	13.15
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.28 a	0.91 a	0.99 a	0.75 a	45.55	1.34 a	1.23 a	1.15 a	1.15 a	48.86
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.24 a	0.38 a	0.45 a	0.30 a	33.33	0.27 a	0.46 a	0.41 a	0.38 a	47.86
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0.85 c	1.56 b	1.90 a	0.09 d	45.07	0.79 b	1.89 a	1.94 a	0.12 c	37.93
H+Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	12.87 b	16.26 a	11.71 b	1.94 c	27.68	23.75 a	24.09 a	19.66 a	2.65 b	37.09
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1.66 a	1.47 a	1.63 a	1.27 a	55.74	1.78 a	1.90 a	1.75 a	1.76 a	42.28
V (%)	13.56 b	12.73 b	13.65 b	40.73 a	34.95	9.97 b	11.60 b	10.70 b	40.55 a	46.61
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2.52 b	3.10 a	3.53 a	1.41 c	28.88	2.57 b	3.79 a	3.70 a	1.88 c	21.45
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	14.31 b	16.94 a	13.90 b	3.22 c	30.98	23.80 a	23.20 a	20.29 a	4.40 b	40.29
m (%)	33.78 c	47.78 b	59.28 a	9.61 d	25.46	29.39 c	50.73 b	58.01 a	7.11 d	25.57
S (mg dm <sup>-3</sup> )	26.58 b	36.30 a	29.06 b	45.14 a	28.48	15.74 b	21.33 b	20.18 b	31.08	20.04
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	403.72 a	134.05 b	124.79 b	150.82 b	45.99	446.32 a	185.61 b	150.31 b	94.89 c	31.58
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	88.88 b	112.29 a	40.77 c	103.99 a	28.48	66.88 b	107.40 a	35.63 c	94.02 a	42.16
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	3.29 a	3.14 a	1.93 b	1.61 b	36.69	3.60 a	2.99 b	1.45 c	2.48 b	34.90
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0.57 c	1.29 b	0.81 c	2.14 a	31.06	0.36 a	0.292 a	0.56 a	1.92 a	50.25
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0.27 a	0.20 b	0.20 b	0.15 c	28.32	0.12 a	0.14 a	0.10 a	0.11 a	27.98
EC (μS cm <sup>-1</sup> )	0.05 b	0.06 b	0.23 a	0.03 b	21.82	0.07 c	0.11 b	0.16 a	0.09 b	40.00
SOM (g kg <sup>-1</sup> )	75.90 a	83.00 a	49.50 c	13.90 d	36.60	80.80 a	82.30 a	48.10 b	12.40 c	35.44
Clay (g kg <sup>-1</sup> )	212.00 c	376.00 b	456.00 a	249.00 c	16.02	193.00 c	362.00 b	478.00 a	240.00 c	12.91
Silt (g kg <sup>-1</sup> )	174.00 b	243.00 a	188.00 b	262.00 a	33.48	183.00 b	275.00 a	178.00 b	277.00 a	33.59
Sand (g kg <sup>-1</sup> )	612.00 a	381.00 c	356.00 c	493.00 b	20.16	624.00 a	363.00 c	344.00 c	483.00 b	21.08

\*Dados obtidos de Castro et al. (2017) e \*\*Silva et al. (2018). \*\*\*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). pH em água (1:2.5). P, K, Fe, Zn, Mn, e Cu extraídos por solução de Mehlich-1 (Mehlich, 1953). Fósforo remanescente P (Prem) (Alvarez V. and Fonseca, 1990). Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Al<sup>3+</sup> extraído por 1 mol L<sup>-1</sup> KCl (McLean et al., 1958). Acidez potencial (H+Al) pelo extractor SMP (Shoemaker, McLean and Pratt, 1961). SB (soma de bases). V (saturação por bases). m (saturação por alumínio). t (capacidade de troca de cátions). T (capacidade de troca de cátions à pH 7.00). S (Hoef, Walsh and Kenney, 1973). B (Raij et al., 2001). Matéria orgânica do solo (SOM) (Walkley and Black, 1934). Condutividade elétrica (EC). Textura (Bouyoucos, 1951).

Tabela S2. Identificação com base no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes bacterianas isoladas de nódulos de plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) que foram inoculadas com solos de Canga (IO), Cerrado (NS), Mata Atlântica (AF) e uma área reabilitada revegetada com capim (RA) em duas estações climáticas (seca – dry e chuvosa – rainy) no Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil.

Origin	Código UFLA	Accession number	Cultural groups	Nº pb	Most similar sequences found in the GenBank		
					Espécie	SI %	Accession
<b>Dry season</b>							
IO	UFLA 04-611	MH320050	IN	472F	<i>Terriglobus</i> sp.	99	KX555422.1
IO	UFLA 04-612	MH320067	SN	505R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY463503.1
IO	UFLA 04-613	MH319975	SN	1143C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KX289859.1
IO	UFLA 04-614	MH320068	SN	463R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KX272794.1
IO	UFLA 04-615	MH319976	FAC	1237C	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	HQ424943.1
IO	UFLA 04-616	MH320010	FAC	633F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KX418946.1
IO	UFLA 04-617	MH320091	FAC	1193C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566644.1
IO	UFLA 04-618	MH319977	FAC	1204C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1
IO	UFLA 04-619	MH320011	SN	643F	<i>Cohnella</i> sp.	99	NR133731.1
IO	UFLA 04-620	MH319978	SN	1146C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KX555426.1
IO	UFLA 04-621	MH320092	FAC	303R	<i>Bacillus</i> sp.	100	JN975953.1
IO	UFLA 04-622	MH320069	SN	668R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713277.1
IO	UFLA 04-623	MH319979	FAC	1245C	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	KF925453.1
IO	UFLA 04-624	MH320012	FAC	630F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX154326.1
IO	UFLA 04-625	MH319980	FAC	1181C	<i>Leifsonia</i> sp.	99	JF330166.1
IO	UFLA 04-626	MH310432	FAC	309F	<i>Bacillus</i> sp.	100	KY886248.1
IO	UFLA 04-627	MH319981	SAL	1141C	<b><i>Methylobacterium</i> sp.</b>	99	NR044105.1
IO	UFLA 04-628	MH319982	FAC	1140C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	FJ025129.1
NS	UFLA 04-576	MH320081	SN	611R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713280.1
NS	UFLA 04-577	MH320033	FN	1083C	<i>Novosphingobium</i> sp.	99	JQ917960.1
NS	UFLA 04-578	MH320034	FAC	1157C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	MF624723.1
NS	UFLA 04-579	MH320042	SN	456F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KC113621.2
NS	UFLA 04-580	MH320035	SN	1159C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	LC095708.1
NS	UFLA 04-581	MH320043	FAC	694F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX266342.1
NS	UFLA 04-582	MH320006	SN	675F	<i>Cohnella</i> sp.	99	NR133731.1
NS	UFLA 04-583	MH310427	SN	305R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	NR147716.1
NS	UFLA 04-584	MH319966	FAC	1282C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	NR044487.1
NS	UFLA 04-585	MH320044	SN	667F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	NR145861.1
NS	UFLA 04-586	MH320007	FAC	561F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EU182895.1
NS	UFLA 04-587	MH319967	SN	1150C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KX555413.1
NS	UFLA 04-588	MH320066	SN	161F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY246980.1
NS	UFLA 04-589	MH319968	FAC	1185C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	NR147768.1
NS	UFLA 04-590	MH320004	FAC	1183C	<i>Leifsonia</i> sp.	100	AB366295.1
NS	UFLA 04-591	MH320045	FAC	546F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KF925453.1

NS	UFLA 04-592	MH310428	SN	622R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	NR145861.1
NS	UFLA 04-593	MH320046	FAC	521F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KF479643.1
NS	UFLA 04-594	MH320090	SN	758R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713273.1
NS	UFLA 04-595	MH310429	FAC	606R	<b>Rhizobium sp.</b>	100	KY486840.1
NS	UFLA 04-596	MH320085	SN	474F	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY246979.1
NS	UFLA 04-597	MH319969	FAC	1194C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EU571177.1
NS	UFLA 04-598	MH319970	SAL	1144C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY548160.1
NS	UFLA 04-599	MH320008	FAC	516F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EU182895.1
NS	UFLA 04-600	MH320009	SN	297F	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	KX396582.1
NS	UFLA 04-601	MH319971	FAC	1203C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KF011664.1
NS	UFLA 04-602	MH320047	FAC	435F	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	KF925453.1
NS	UFLA 04-603	MH310430	FAC	321R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB073206.1
NS	UFLA 04-604	MH320048	FAC	606F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KX418770.1
NS	UFLA 04-605	MH319972	SN	1150C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713273.1
NS	UFLA 04-606	MH320049	FAC	525F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	HQ424943.1
NS	UFLA 04-607	MH319973	FAC	1141C	<b>Rhizobium sp.</b>	99	AY490104.1
NS	UFLA 04-608	MH310431	SN	302R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KR779530.3
NS	UFLA 04-609	MH320087	SN	1159C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	LC095708.1
NS	UFLA 04-610	MH319974	FAC	1277C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB073206.1
AF	UFLA 04-629	MH320070	FAC	671R	<b>Burkholderia sp.</b>	99	KT957901.1
AF	UFLA 04-630	MH319983	FAC	1193C	<b>Burkholderia sp.</b>	99	AJ300686.1
AF	UFLA 04-631	MH320071	FN	715R	<i>Dyella</i> sp.	99	CP008884.1
AF	UFLA 04-632	MH310433	FAC	600R	<b>Rhizobium sp.</b>	99	JX855178.1
AF	UFLA 04-633	MH310434	FN	649R	<i>Novosphingobium</i> sp.	99	KM020908.1
AF	UFLA 04-634	MH319984	SAL	1188C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	FJ390906.1
AF	UFLA 04-635	MH320013	FAC	626F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	HQ424943.1
AF	UFLA 04-636	MH320014	FAC	518F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	HF585011.1
AF	UFLA 04-637	MH310435	SN	515R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KX527927.1
AF	UFLA 04-638	MH319985	FAC	1190C	<b>Burkholderia sp.</b>	99	AY773194.1
AF	UFLA 04-639	MH319986	FAC	1185C	<b>Burkholderia sp.</b>	99	AY773194.1
AF	UFLA 04-640	MH320036	SN	1158C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	JX284227.2
AF	UFLA 04-641	MH320072	FAC	502R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1
AF	UFLA 04-642	MH319987	FAC	1141C	<b>Rhizobium sp.</b>	99	EU748920.1
AF	UFLA 04-643	MH310436	FAC	659R	<i>Paenibacillus</i> sp.	96	NR116365.1
AF	UFLA 04-644	MH320073	SN	569R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KC113621.2
AF	UFLA 04-645	MH319988	FAC	1194C	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	LC075708.1
AF	UFLA 04-646	MH319989	FAC	1197C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB898298.1
AF	UFLA 04-647	MH319990	FAC	1181C	<b>Rhizobium sp.</b>	99	FJ025118.1
AF	UFLA 04-648	MH320037	FAC	1183C	<b>Rhizobium sp.</b>	100	EU748920.1
AF	UFLA 04-649	MH319991	FAC	1229C	<b>Burkholderia sp.</b>	99	FN543722.1
AF	UFLA 04-650	MH320051	FAC	624R	<i>Leifsonia</i> sp.	99	AB495171.1
AF	UFLA 04-651	MH310437	FN	307R	<i>Dyella</i> sp.	100	KY682053.1
AF	UFLA 04-652	MH319992	FAC	1139C	<b>Rhizobium sp.</b>	100	KY713253.1
AF	UFLA 04-653	MH320082	SN	634R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713277.1
AF	UFLA 04-654	MH310438	FAC	559R	<i>Pantoea</i> sp.	99	CP002206.1
AF	UFLA 04-655	MH319993	FAC	1164C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1

AF	UFLA 04-656	MH320038	FN	1204C	<i>Dyella</i> sp.	99	AB366319.1
AF	UFLA 04-657	MH320088	SN	1183C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713273.1
AF	UFLA 04-658	MH320039	FAC	1196C	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	KY713255.1
AF	UFLA 04-659	MH320015	FAC	659F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	HQ424943.1
AF	UFLA 04-660	MH320083	FN	510R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KR055002.1
AF	UFLA 04-661	MH320040	IN	1241C	<i>Achromobacter</i> sp.	99	FJ613798.1
AF	UFLA 04-662	MH320086	SN	478F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY548123.1
AF	UFLA 04-663	MH319994	FN	1285C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX266342.1
AF	UFLA 04-664	MH320041	FN	1147C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	JX292423.1
AF	UFLA 04-665	MH320084	FN	623R	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	100	MF962589.1
AF	UFLA 04-666	MH319995	FAC	1136C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	AY490119.1
AF	UFLA 04-667	MH320074	IN	429R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713275.1
AF	UFLA 04-668	MH320075	SN	599R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713275.1
AF	UFLA 04-669	MH320076	SN	442R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713275.1
AF	UFLA 04-670	MH319996	FAC	1192C	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	FN543720.1
AF	UFLA 04-671	MH320016	FAC	600F	<i>Paenibacillus</i> sp.	90	HF585081.1
AF	UFLA 04-672	MH320077	SN	576R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713278.1
AF	UFLA 04-673	MH320017	FAC	541F	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	KT957906.1
AF	UFLA 04-674	MH319997	FAC	1139C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	FJ025130.1
AF	UFLA 04-675	MH320089	FAC	1183C	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	KC195875.1
AF	UFLA 04-676	MH319998	FN	1163C	<i>Brevundimonas</i> sp.	100	AJ227781.1
AF	UFLA 04-677	MH320052	SAL	437R	<i>Chitinophaga</i> sp.	98	KX418917.1
AF	UFLA 04-678	MH319999	FAC	1139C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	EU748920.1
AF	UFLA 04-679	MH310439	FAC	561R	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	KU644697.1
AF	UFLA 04-680	MH320000	FAC	1178C	<i>Leifsonia</i> sp.	99	JF330166.1
AF	UFLA 04-681	MH320001	FN	1196C	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	KC257019.1
AF	UFLA 04-682	MH320002	FAC	1244C	<i>Enterobacter</i> sp.	99	KR189277.1
AF	UFLA 04-683	MH320053	IAC	530R	<i>Leifsonia</i> sp.	100	HG794292.1
AF	UFLA 04-684	MH320078	SN	385R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KX555397.1
AF	UFLA 04-685	MH320018	FN	599F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	HF585081.1
RA	UFLA 04-526	MH320054	SN	604R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713261.1
RA	UFLA 04-527	MH319950	FAC	1240C	<i>Variovorax</i> sp.	99	AF532868.1
RA	UFLA 04-528	MH320019	FAC	1241C	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	CP013102.1
RA	UFLA 04-529	MH319951	FAC	1136C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	FJ025129.1
RA	UFLA 04-530	MH319952	FAC	1234C	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	100	GU144372.1
RA	UFLA 04-531	MH319953	IN	1150C	<i>Sphingomonas</i> sp.	97	NR133865.1
RA	UFLA 04-532	MH319954	IN	1185C	<i>Mucilagibacter</i> sp.	98	KR703525.1
RA	UFLA 04-533	MH320020	SN	1156C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	FJ390913.1
RA	UFLA 04-534	MH319955	IN	1150C	<i>Labrys</i> sp.	99	NR043801.1
RA	UFLA 04-535	MH320021	FAC	1079C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	AY490119.1
RA	UFLA 04-536	MH320022	FAC	1231C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	KJ128395.1
RA	UFLA 04-537	MH320023	IAC	1200C	<i>Bosea</i> sp.	99	KY713258.1
RA	UFLA 04-538	MH319956	IN	1234C	<i>Herbaspirillum</i> sp.	99	AJ238359.1
RA	UFLA 04-539	MH320024	IAC	1241C	<i>Acidovorax</i> sp.	98	JQ782388.1
RA	UFLA 04-540	MH319957	FAC	1233C	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	AY773190.1
RA	UFLA 04-541	MH319958	FAC	1191C	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	AJ300686.1

RA	UFLA 04-542	MH319959	FN	1147C	<i>Sphingobium</i> sp.	100	U37525.1
RA	UFLA 04-543	MH320025	IAC	1144C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	AY490119.1
RA	UFLA 04-544	MH320026	IAC	1144C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	AF510368.1
RA	UFLA 04-545	MH320055	SN	358R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713275.1
RA	UFLA 04-547	MH320056	SN	373R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713275.1
RA	UFLA 04-548	MH320057	SN	521R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713280.1
RA	UFLA 04-549	MH319960	IN	1151C	<i>Sphingomonas</i> sp.	98	JF906101.1
RA	UFLA 04-550	MH320027	SAL	1204C	<i>Ralstonia</i> sp.	99	AB366318.1
RA	UFLA 04-551	MH320058	FAC	735R	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	AB911049.1
RA	UFLA 04-552	MH320059	IN	710R	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	KR181809.1
RA	UFLA 04-553	MH320060	FAC	410R	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	100	HF674713.1
RA	UFLA 04-554	MH320003	FAC	1139C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	KY713254.1
RA	UFLA 04-555	MH320028	FN	1206C	<i>Dyella</i> sp.	99	AB366321.1
RA	UFLA 04-556	MH320029	FN	1208C	<i>Dyella</i> sp.	99	AB366322.1
RA	UFLA 04-557	MH319961	FAC	1179C	<i>Pedobacter</i> sp.	98	NR115008.1
RA	UFLA 04-558	MH319962	FAC	1239C	<i>Variovorax</i> sp.	99	KC294025.1
RA	UFLA 04-560	MH320030	FAC	1205C	<i>Variovorax</i> sp.	99	KC294025.2
RA	UFLA 04-561	MH320061	SN	523R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713274.1
RA	UFLA 04-562	MH319963	FAC	1196C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	HQ424943.1
RA	UFLA 04-563	MH320079	SN	551R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713274.1
RA	UFLA 04-564	MH320062	FAC	696R	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	KY713276.1
RA	UFLA 04-565	MH320005	FAC	519F	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	HQ424943.1
RA	UFLA 04-566	MH320031	FAC	1188C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	JQ771199.1
RA	UFLA 04-567	MH320063	SN	645R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713273.1
RA	UFLA 04-568	MH310426	FAC	321R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB073206.1
RA	UFLA 04-570	MH320080	FAC	741R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KF925453.1
RA	UFLA 04-571	MH320032	SN	1157C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	NR149804.1
RA	UFLA 04-572	MH320064	IN	514R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713275.1
RA	UFLA 04-573	MH319964	IN	1153C	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	KF465966.1
RA	UFLA 04-574	MH319965	IN	1181C	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	99	NR116405.1
RA	UFLA 04-575	MH320065	SN	605R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY246975.1

#### Rainy season

IO	04-785	MH320660	SN	1239C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	FJ390903.1
IO	04-786	MH320697	SN	387F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713275.1
IO	04-787	MH320661	SN	1241C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	FJ025099.1
IO	04-788	MH320733	FAC	635R	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	KY713291.1
IO	04-789	MH320662	FAC	1150C	<i>Enterobacter</i> sp.	99	KJ526919.1
IO	04-790	MH320663	FAC	1056C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	KY820826.1
IO	04-791	MH320664	SN	1338C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	FJ390903.1
IO	04-792	MH320665	SN	1152C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	DQ354607.1
IO	04-793	MH320721	SN	708R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KU557387.1
IO	04-794	MH320666	FAC	1189C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	KY820826.1
IO	04-795	MH320667	IN	1117C	<i>Terriglobus</i> sp.	99	KX555420.1
IO	04-796	MH320698	FAC	726F	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	KX555395.1
IO	04-797	MH320722	SN	473R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713280.1

IO	04-798	MH320668	SN	1197C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713273.1
IO	04-799	MH320723	IN	618R	<i>Mucilaginibacter</i> sp.	99	NR_116406.1
IO	04-800	MH320699	FAC	744F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	HQ424943.1
IO	04-801	MH320669	SN	1152C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713277.1
IO	04-802	MH320670	SN	1193C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	KY713273.1
IO	04-803	MH320671	SN	1134C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	KY713278.1
IO	04-804	MH320700	FAC	612F	<b>Rhizobium sp.</b>	99	KX555415.1
NS	04-736	MH320581	FAC	1081C	<b>Rhizobium sp.</b>	100	AB456627.1
NS	04-737	MH320600	FAC	486F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX266342.1
NS	04-738	MH320633	FAC	377R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KF479643.1
NS	04-739	MH320634	SN	600R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713280.1
NS	04-740	MH320635	IN	602R	<i>Chelatococcus</i> sp.	95	JQ776652.1
NS	04-741	MH320636	SN	609R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	NR_149804.1
NS	04-742	MH320637	FAC	759R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	NR_116517.1
NS	04-743	MH320601	SN	478F	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY246959.1
NS	04-744	MH320582	SN	1158C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	GU552890.1
NS	04-745	MH320583	FN	1232C	<b>Mesorhizobium sp.</b>	100	NR_135857.1
NS	04-746	MH320602	SN	492F	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY246959.1
NS	04-747	MH320638	FAC	833R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1
NS	04-748	MH320584	SN	1157C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	LC095708.1
NS	04-749	MH320585	FAC	1206C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KR181829.1
NS	04-750	MH320639	SN	699R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713277.1
NS	04-751	MH320603	FAC	503F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB089250.1
NS	04-752	MH320604	FAC	487F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EU442242.1
NS	04-753	MH320640	IAC	718R	<b>Burkholderia sp.</b>	99	KY713255.1
NS	04-754	MH320641	FAC	547R	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	JX566546.1
NS	04-755	MH320586	SN	1200C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713273.1
NS	04-756	MH320605	FAC	589F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX266342.1
NS	04-757	MH320587	IAC	1286C	<b>Burkholderia sp.</b>	99	KT957908.1
NS	04-758	MH320588	SN	1157C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	KY713261.1
NS	04-759	MH320589	SN	1161C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713277.1
NS	04-760	MH320590	FAC	1233C	<b>Rhizobium sp.</b>	99	KJ128395.1
NS	04-761	MH320606	FAC	486F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX266342.1
NS	04-762	MH320607	SN	445F	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713289.1
NS	04-763	MH320608	IN	573F	<i>Luteibacter</i> sp.	99	NR_043618.1
NS	04-764	MH320644	SN	1147C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713278.1
NS	04-765	MH320645	SN	1190C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713278.1
NS	04-766	MH320646	FAC	1099C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1
NS	04-767	MH320647	FAC	1247C	<i>Pantoea</i> sp.	99	KF447415.1
NS	04-768	MH320648	SN	1192C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	LC095708.1
NS	04-769	MH320649	FAC	1337C	<b>Burkholderia sp.</b>	99	FJ528270.1
NS	04-770	MH320650	FAC	1225C	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	KF925453.1
NS	04-771	MH320651	SN	1178C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	JQ778978.1
NS	04-772	MH320652	FAC	801C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX266342.1
NS	04-773	MH320653	FAC	1274C	<b>Burkholderia sp.</b>	99	KT957908.1
NS	04-774	MH320654	SN	1240C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	NR_145861.1

NS	04-775	MH320655	FAC	1189C	<i>Rhizobium</i> sp.	99	AF514801.1
NS	04-776	MH320719	SN	308F	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KY713289.1
NS	04-777	MH320694	FAC	711F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KX418946.1
NS	04-778	MH320656	FAC	1237C	<i>Burkholderia</i> sp.	99	KT957901.1
NS	04-779	MH320720	FAC	737R	<i>Pantoea</i> sp.	99	FJ593743.1
NS	04-780	MH320695	FAC	502F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JN819621.1
NS	04-781	MH320657	SN	1240C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	AY904749.1
NS	04-782	MH320658	SN	1197C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KX555399.1
NS	04-783	MH320696	SN	489F	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KY713289.1
NS	04-784	MH320659	SN	1156C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KY713277.1
AF	04-805	MH320701	SN	356F	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KY246980.1
AF	04-806	MH320724	FAC	476R	<i>Burkholderia</i> sp.	99	HE864338.1
AF	04-807	MH320702	FAC	666F	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KX555415.1
AF	04-808	MH320672	FN	1207C	<i>Dyella</i> sp.	99	NR_043258.1
AF	04-809	MH320673	FAC	1229C	<i>Caulobacter</i> sp.	99	JX566545.1
AF	04-810	MH320725	SN	727R	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KY246975.1
AF	04-811	MH320674	FAC	1327C	<i>Burkholderia</i> sp.	98	FJ025135.1
AF	04-812	MH320726	FAC	643R	<i>Paenibacillus</i> sp.	97	NR_112054.1
AF	04-813	MH320727	SN	615R	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KY713265.1
AF	04-814	MH320675	FAC	1118C	<i>Rhizobium</i> sp.	100	NR_044053.1
AF	04-815	MH320703	FAC	500F	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KY713285.1
AF	04-816	MH320704	SN	792F	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	NR_149804.1
AF	04-817	MH320676	FAC	1276C	<i>Burkholderia</i> sp.	99	KT957908.1
AF	04-818	MH320728	SN	605R	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	KY713280.1
AF	04-819	MH320705	SN	666F	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KT694162.1
AF	04-820	MH320677	FAC	1144C	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JQ771199.1
AF	04-821	MH320706	FN	716F	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99	HF931040.1
AF	04-822	MH320734	FAC	525F	<i>Rhizobium</i> sp.	100	KX555429.1
AF	04-823	MH320707	FAC	751F	<i>Enterobacter</i> sp.	99	KJ933404.1
AF	04-824	MH320708	IN	574F	<i>Sphingomonas</i> sp.	99	KR181808.1
AF	04-825	MH320678	FAC	1280C	<i>Burkholderia</i> sp.	99	JQ659722.1
AF	04-826	MH320679	SAL	1152C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	NR_117791.1
AF	04-827	MH320729	SN	367R	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KY713275.1
AF	04-828	MH320709	FAC	785F	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KY713253.1
AF	04-829	MH320680	SN	1235C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99	JX284232.2
AF	04-830	MH320710	FAC	502F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB089250.1
AF	04-831	MH320711	FAC	779F	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FN543676.1
AF	04-832	MH320681	FAC	1211C	<i>Burkholderia</i> sp.	99	KT957901.1
AF	04-833	MH320682	SN	1235C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	FJ390910.1
AF	04-834	MH320730	FAC	521R	<i>Paenibacillus</i> sp.	97	NR_115140.1
AF	04-835	MH320683	FAC	1222C	<i>Rhizobium</i> sp.	99	JQ771199.1
AF	04-836	MH320684	SN	1178C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	FJ390910.1
AF	04-837	MH320712	FAC	390F	<i>Rhizobium</i> sp.	99	KY203966.1
AF	04-838	MH320685	SN	1175C	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KY713277.1
AF	04-839	MH320686	FAC	1186C	<i>Burkholderia</i> sp.	100	CP013103.1
AF	04-840	MH320713	SN	511F	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	KX555410.1

AF	04-841	MH320731	FAC	348R	<i>Caulobacter</i> sp.	100	FJ719362.1
AF	04-842	MH320687	FAC	1020C	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	EF602565.1
AF	04-843	MH320688	FN	1207C	<i>Dyella</i> sp.	99	KY682053.1
AF	04-844	MH320714	FAC	395F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB089250.1
AF	04-845	MH320715	SN	579F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KX555426.1
AF	04-846	MH320689	FAC	1205C	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	KR181829.1
AF	04-847	MH320716	FAC	616F	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	KX555382.1
AF	04-848	MH320735	SN	594F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	JX284222.1
AF	04-849	MH320732	SN	588R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713273.1
AF	04-850	MH320717	SN	472F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713275.1
AF	04-851	MH320690	SN	1222C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	JX284227.2
AF	04-852	MH320691	FN	1232C	<i>Novosphingobium</i> sp.	99	JN082747.1
AF	04-853	MH320692	FN	1235C	<i>Ralstonia</i> sp.	99	JX187406.1
AF	04-854	MH320718	FAC	589F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX154326.1
AF	04-855	MH320693	FAC	1233C	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1
RA	04-686	MH320609	SN	618R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713280.1
RA	04-687	MH320566	SN	1088C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713268.1
RA	04-688	MH320610	SN	670R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713277.1
RA	04-689	MH320567	SN	1241C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY246975.1
RA	04-690	MH320591	SN	470F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713289.1
RA	04-691	MH320592	FAC	515F	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	HQ424943.1
RA	04-692	MH320593	FAC	533F	<i>Paenibacillus</i> sp.	97	KX419021.1
RA	04-693	MH320594	FAC	484F	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	HQ424943.1
RA	04-694	MH320568	SN	1161C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713268.1
RA	04-695	MH320569	IN	1213C	<i>Sphingomonas</i> sp.	100	FJ455075.1
RA	04-696	MH320611	FN	707R	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	KX290164.1
RA	04-697	MH320612	SN	534R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713289.1
RA	04-698	MH320570	SN	1157C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	JQ796662.1
RA	04-699	MH320613	FAC	361R	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	KP128826.1
RA	04-700	MH320614	SN	605R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713279.1
RA	04-701	MH320615	FAC	753R	<b><i>Burkholderia</i> sp.</b>	99	HF674713.1
RA	04-702	MH320595	SN	490F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY246980.1
RA	04-703	MH320596	FAC	589F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX266342.1
RA	04-704	MH320571	SN	1206C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KX555399.1
RA	04-705	MH320572	FAC	1193C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	99	KY820826.1
RA	04-706	MH320616	SN	683R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713289.1
RA	04-707	MH320573	SN	1160C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	LT630292.1
RA	04-708	MH320574	FAC	1150C	<b><i>Rhizobium</i> sp.</b>	100	HQ836163.1
RA	04-709	MH320575	SN	1158C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713277.1
RA	04-710	MH320576	SN	1161C	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713277.1
RA	04-711	MH320642	SAL	503R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY713280.1
RA	04-712	MH320617	SN	482R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	KY713280.1
RA	04-713	MH320597	SN	471F	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	100	KY246980.1
RA	04-714	MH320618	FAC	831R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB073206.1
RA	04-715	MH320619	SN	698R	<b><i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	99	NR_149803.1
RA	04-716	MH320620	FAC	734R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1

RA	04-717	MH320621	SN	611R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	KY713280.1
RA	04-718	MH320577	FAC	1080C	<b>Rhizobium sp.</b>	99	KY820826.1
RA	04-719	MH320622	FAC	548R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1
RA	04-720	MH320623	FAC	648R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX840390.1
RA	04-721	MH320624	SN	591R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY246975.1
RA	04-722	MH320625	FAC	577R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566644.1
RA	04-723	MH320626	SAL	426R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	KY713280.1
RA	04-724	MH320627	FAC	834R	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	JX566546.1
RA	04-725	MH320628	SN	605R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713265.1
RA	04-726	MH320629	SN	632R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	99	KY713280.1
RA	04-727	MH320630	IAC	610R	<i>Leifsonia</i> sp.	100	KF682177.1
RA	04-728	MH320631	SN	673R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713277.1
RA	04-729	MH320632	FAC	655R	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	LC075708.1
RA	04-730	MH320578	FAC	1158C	<b>Rhizobium sp.</b>	99	KJ734020.1
RA	04-731	MH320579	FAC	1248C	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	KX280777.1
RA	04-732	MH320598	FAC	447F	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AB898298.1
RA	04-733	MH320599	FAC	455F	<b>Rhizobium sp.</b>	99	KY463509.1
RA	04-734	MH320643	SN	470R	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	FR872446.1
RA	04-735	MH320580	SN	939C	<b>Bradyrhizobium sp.</b>	100	KY713278.1

Figura S1. Dados no formato KWB do Google maps.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os atributos microbiológicos, químicos e físicos do solo foram eficazes em indicar as diferenças entre a área reabilitada após a mineração de ferro e as fitofisionomias adjacentes, nas estações climáticas estudadas. Foi observado que durante a estação chuvosa houve as maiores atividades enzimáticas, respiração e biomassa microbiana. A diversidade genética das comunidades de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal foi elevada, com gêneros identificados nos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria, com predominância do gênero *Bradyrhizobium* (filo Proteobacteria) em todas as fitofisionomias e em ambas as estações.

A área reabilitada revegetada com capim possui uma microbiota ativa no processo de recuperação do solo após atividades de mineração, evidenciada pelas relações existentes entre a sua alta atividade enzimática específica por biomassa microbiana no solo e por sua maior eficiência simbiótica e elevada diversidade genética da comunidade de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal.

O aumento na atividade biológica no solo e a alta diversidade de um grupo funcional tão importante para a manutenção do equilíbrio ecológico, como as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, indicam que o processo de reabilitação do solo está sendo efetivo na melhoria da qualidade do solo. Entretanto, mais pesquisas devem ser realizadas em áreas após a mineração de ferro, principalmente por meio de aplicação de processos de revegetação com vegetação nativa que possa ser inoculada com microrganismos que auxiliem no crescimento vegetal, avaliando a sobrevivência das plantas e a qualidade do solo após esse processo.