



MESTRADO PROFISSIONAL  
USO SUSTENTÁVEL DE RECURSOS NATURAIS EM REGIÕES  
TROPICAIS

PAULO HENRIQUE DE OLIVEIRA COSTA

**DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA A RIZOSFERA  
DE *Dioclea apurensis* kunth EM ÁREAS DE CANGA E DE  
RECUPERAÇÃO AMBIENTAL EM CARAJÁS**

Belém / PA

2021



INSTITUTO  
TECNOLÓGICO  
VALE

PAULO HENRIQUE DE OLIVEIRA COSTA

**DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA A RIZOSFERA  
DE *Dioclea apurensis* kunth EM ÁREAS DE CANGA E DE  
RECUPERAÇÃO AMBIENTAL EM CARAJÁS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais, do Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITV DS).

Orientador: Rafael B. da Silva Valadares, Dr.  
Coorientador: José Augusto Bitencourt, Dr.

**Belém / PA**

**2021**

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- C837 Costa, Paulo Henrique de Oliveira  
Diversidade microbiana na rizosfera de *Dioclea apurensis* kunth em áreas nativas e de recuperação em Carajás / Paulo Henrique de Oliveira Costa ... [et al]. Belém: ITV, 2021.  
21 p.: il.
- Dissertação (Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais) - ITV DS, 2021  
Orientador: Dr. Rafael Borges da Silva Valadares  
Coorientador: Dr. José Augusto Pires Bitencourt
1. Genômica - Rizosfera. 2. Genômica - Planta. 3. Microrganismos - Plantas. 4. Recuperação de áreas - Carajás, Serra dos (PA). I. Echeverria, Hector Andres Herrera. II. Nascimento, Sidney Vasconcelos do. III. Bitencourt, José Augusto. IV. Caldeira, Cecílio. V. Valadares, Rafael Borges da Silva. VI. Título.

CDD 23. ed. 622.752098115

PAULO HENRIQUE DE OLIVEIRA COSTA

**DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA A RIZOSFERA  
DE *Dioclea apurensis* kunth EM ÁREAS DE CANGA E DE  
RECUPERAÇÃO AMBIENTAL EM CARAJÁS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Mestrado Profissional em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais, do Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável (ITV DS).

Data de aprovação:

Banca examinadora:

---

Rafael Borges da Silva Valadares  
Orientador - Instituto tecnológico Vale (ITV)

---

Eder Soares Pires  
Membro Interno - Instituto tecnológico Vale (ITV)

---

Hector Andres Herrera Echeverria  
Membro Externo - Universidade de La Frontera

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Teodoro e Marilene, através dos incentivos que me impulsionaram para a realização desse sonho. Agradeço as oportunidades que vocês me proporcionaram e ao amor que vocês sempre demonstraram.

Agradeço ao Bruno Rafael, meu irmão, por todo ensinamento e pelo apoio incondicional.

Agradeço a Keila Jamille, por todo o carinho e cumplicidade durante esses anos ao meu lado.

Agradeço ao Dr. Rafael Borges da Silva Valadares por abrir as portas do laboratório do Instituto tecnológico Vale e por todo apoio e aprendizado dados a mim, bem como o Dr. José Augusto Bitencourt.

Agradeço ao Instituto tecnológico Vale pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

## RESUMO

As raízes das plantas oferecem um ambiente específico para o desenvolvimento natural de comunidades microbianas, a rizosfera. Os microrganismos rizosféricos possuem alta diversidade genética e metabólica, resultando numa variedade de compostos orgânicos e nutrientes liberados nesta região, muitas vezes beneficiando o desenvolvimento das plantas. *Dioclea apurensis* é uma planta endêmica da canga de Carajás que apresenta bom desenvolvimento quando empregada em áreas de recuperação. É esperado que, juntamente a mecanismos de adaptação fisiológica e morfológica, devem ocorrer interações microbianas que favoreçam o desempenho desta espécie, tanto no ambiente nativo como nas áreas antropizadas. Neste trabalho, acessamos a diversidade microbiana do solo rizosférico e não-rizosférico de *D. apurensis* em canga e em áreas em recuperação, na busca de microrganismos que sejam importantes para o estabelecimento desta planta e enriquecimento do ambiente. O DNA total do solo foi extraído e foram sequenciadas as regiões 16S e ITS para acessar a diversidade de bactérias e fungos, respectivamente. O índice *Shannon* indicou uma maior diversidade de fungos e bactérias nas áreas em recuperação, tanto no solo rizosférico como no não-rizosférico, provavelmente devido ao efeito positivo da aplicação de matéria orgânica na implantação das parcelas. Também foi possível diferenciar as comunidades microbianas habitando a rizosfera de *D. apurensis* quando comparado com o solo não-rizosférico. Esta separação foi maior na canga do que no ambiente recuperado, e também mais evidente para a comunidade de fungos do que de bactérias. Na canga, *D. apurensis* apresentou uma alta afinidade por fungos associados a tolerância das plantas ao estresse hídrico, endófitos septados escuros (DSE) e fungos micorrízicos, além de bactérias fixadoras de nitrogênio. Nas áreas de recuperação, as plantas também estavam associadas a microrganismos promotores do crescimento de plantas, o que ajuda a explicar o bom desempenho da planta naqueles ambientes. Além do manejo já empregado a inoculação com organismos específicos, obtidos de seu habitat natural, deve ajudar a enriquecer o ambiente e reestabelecer a estrutura da comunidade microbiana. O emprego de matéria orgânica e de microrganismos benéficos em projetos de recuperação de áreas mineradas beneficia não apenas a espécie em estudo, mas aumenta a riqueza do ambiente, melhorando a qualidade do solo e a resiliência da comunidade vegetal.

**Palavras-chave:** planta, rizosfera, microrganismos, interação.

## ABSTRACT

The Plant roots offer a specific environment for the natural development of microbial communities, the rhizosphere. Rhizospheric microorganisms, in turn, have strategies that enable a variety of interactions, often benefiting plant development. *Dioclea apurensis* is an endemic plant of the Carajás canga that shows good development when used in recovery areas. Thus, along with the mechanism of physiological and morphological adaptation, microbial interactions should occur that favor the performance of this species. In this work, results of rhizospheric soil metagenomics associated with *D. apurensis* in canga and recovering areas were compared. Total soil DNA was extracted and sequenced as 16S and ITS regions to access the diversity of bacteria and fungi, respectively. The Shannon index indicated a greater diversity of fungi and bacteria in the recovering areas, both in soil and non-rhizospheric rhizosphere, probably due to the positive effect of the application of organic matter in the implantation of the plots. It was possible to differentiate how microbial communities inhabiting the rhizosphere of *Dioclea apurensis*. This effect was greater in the canga than in the recovered environment, and was also more pronounced for the fungi community than for bacteria. In the canga, *D. apurensis* showed a high affinity for fungi related to water stress tolerance, dark septate endophytes (DSE) and mycorrhizal fungi, in addition to nitrogen fixing bacteria. In the recovery area, microorganisms with potential to promote plant growth were also identified, which helps to explain the good performance of the plant in those environments. In addition to management, inoculation with specific organisms of their natural habitat, should help enrich the environment and reestablish a structure of the microbial Community. The use of beneficial microorganisms in projects to recover mined areas benefits not only one type under study, but improves the richness of the environment, improving soil quality and the resilience of the plant community.

**Keywords:** plant, rhizosphere, microorganisms, interaction.

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1** - Localização de coleta das amostras de solo rizosférico e não-rizosférico para cada ambiente de estudo..... 18
- Figura 2** - Índices de diversidade alfa (Shannon e Chao1) e número total de OTUs de sequências de fungos (A-C) e bactérias (D-F) em amostras de solos não-rizosféricos (canga-B/DMR-B) e rizosféricos (canga-R/DMR-R) associadas a *Dioclea apurensis* (D). Os gráficos foram considerados estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ). ..... 22
- Figura 3** - Abundância relativa em nível de gênero das principais sequências de fungos obtidas de *Dioclea apurensis* (A) e sequências bacterianas obtidas de *Dioclea apurensis* (B) de solo não-rizosférico (canga-B/DMR-B) e rizosférico (canga-R/DMR-R) em canga e área de recuperação (DMR). Os números no eixo x representam as réplicas de cada solo ..... 9
- Figura 4** - A análise de coordenadas principais identifica que *Dioclea apurensis* obteve maior seletividade de comunidades de fungos em canga comparado com área de recuperação (A). Em relação as comunidades de bactérias, *Dioclea apurensis* demonstrou uma maior similaridade em amostras de canga e em área de recuperação (B). As análises foram obtidas de amostras de solos rizosféricos (canga-R/DMR-R) e não-rizosféricos (canga-B/DMR-B) de *Dioclea apurensis* (D) em ecossistemas de canga e área de recuperação (DMR). ..... 10

## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1 CANGA .....	9
1.2 RECUPERAÇÃO DE ÁREA DEGRADADA (RAD) .....	9
1.3 RIZOSFERA .....	10
1.4 METAGENÔMICA .....	12
<b>ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 GERAL .....	16
3.2 ESPECÍFICO .....	16
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
4.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM .....	17
4.2 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA .....	18
4.3 BIOINFORMÁTICA .....	20
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	21
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
5.1 VISÃO GERAL DE MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS .....	21
5.2 DIVERSIDADE DE MICROORGANISMOS BASEADA NA ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E FUNGOS EM SOLOS DE CANGA E DE ÁREAS EM RECUPERAÇÃO ..	22
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>13</b>
<b>REFERÊNCIA .....</b>	<b>14</b>

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

### 1.1 CANGA

As regiões de canga na Serra dos Carajás no estado do Pará apresentam solos compostos por fragmentos ferruginosos de diferentes tamanhos, formado por substratos rochosos e solos primários que podem provocar algumas restrições que dificultam o desenvolvimento das plantas existentes na região, como exemplo a restrição hídrica, baixo teor de nutrientes no solo, baixa capacidade de infiltração e resistência ao intemperismo (LOHMANN; FIRETTI; GOMES, 2018). O alto nível de Fe e Mn encontrados no solo prejudicam as adaptações morfológicas e fisiológicas das plantas, proporcionando uma seleção de espécies existentes nestes ambientes (SCHAEFER *et al.*, 2015). A vegetação identificada neste ecossistema é denominada na literatura como vegetação de canga, campos ferruginosos ou campos rupestres ferruginosos (VINCENT; MEGURO, 2008).

A vegetação de canga é caracterizada por plantas que possuem a facilidade e capacidade de armazenar em seu tecido celular grandes concentrações de metais pesados. Portanto plantas que se desenvolvem nestes locais apresentam mecanismos adaptativos que envolvem alterações fisiológicas e morfológicas. Esses fatores sinalizam para a importância da seleção de espécies nativas existentes nesses ambientes (VINCENT; MEGURO, 2008) a fim de utiliza-las na revegetação de áreas em recuperação.

### 1.2 RECUPERAÇÃO DE ÁREA DEGRADADA (RAD)

A mineração é um dos setores básicos da economia do país, onde contribui de forma importante para o bem-estar e a melhoria da qualidade de vida das presentes e futuras gerações, sendo primordial ao desenvolvimento da sociedade, desde que seja operada com responsabilidade social, buscando sempre as práticas do desenvolvimento sustentável (GALVÃO, 2000). No entanto, a atividade antrópica está causando diversos problemas que resultam na degradação dos ecossistemas. As áreas degradadas caracterizam-se pela remoção do horizonte superficial do solo, o que ocasiona perda de nutrientes e de matéria orgânica, diminuição de atividade biológica, propriedades físicas alteradas, favorecendo a ocorrência de processos erosivos e a acidificação do substrato (ARTICO, 2018).

Nesse contexto, a recuperação de áreas degradadas se torna cada vez mais necessária, com a finalidade da diminuição dos efeitos negativos que acarreta na destruição dos ambientes naturais (ANDRÉ *et al.*, 2019). O termo recuperação vem sendo relacionado diretamente com as áreas degradadas, referindo à aplicação de técnicas para recuperações

agronômicas, biológica e de engenharia, visando à recomposição topográfica e à revegetação de áreas em que o relevo foi descaracterizado pela mineração, pela abertura de estradas ou dentre outras atividades (TATSCH, 2011).

Na recuperação dessas áreas deve ser lembrado que, nem sempre, na prática, isso ocorre de uma maneira fácil, pois fazer uma opção biológica que envolva os aspectos como preparo do substrato, implantação de uma comunidade de espécies vegetais, a restauração da macrofauna e da microfauna edáfica é realizado após a produção de muita pesquisa (SOUZA *et al.*, 2016). A revegetação de áreas degradadas é uma prática muito utilizada e recomendada para a obtenção de um novo solo. Nesta prática, tanto espécies vegetais nativas ou não podem ser utilizadas, porém o restabelecimento das espécies nativas se constitua na prática ecologicamente mais recomendada (FARIA; CHADA, 2003).

### 1.3 RIZOSFERA

O solo é um meio natural complexo que promove o desenvolvimento, a multiplicação, a sobrevivência e outras atividades dos organismos (LI *et al.*, 2016). No solo ocorrem inúmeras interações biológicas, incluindo competição, predação, parasitismo, comensalismo e o mutualismo. Estas interações são importantes nas atividades do solo, isto é, na sua capacidade de amparar a vida tanto das plantas como dos animais e outros seres vivos (BAKKER *et al.*, 2015). Os microrganismos não vivem no solo na forma isolada, mas sim, na forma de comunidade, podendo ser mais ou menos complexa, no qual uma ampla variedade de interações é desenvolvida. A rizosfera, região do solo sob influência direta da presença das raízes, apresenta características distintas das do solo livre, caracterizada por ser a região onde ocorre a maior parte das interações entre os microrganismos e as plantas (HENKES *et al.*, 2018).

A microbiota dos solos está recebendo progressivamente mais atenção por sua participação na funcionalidade e sustentabilidade dos solos. Diante disso, a microbiota é a sustentabilidade do solo, uma vez que é a principal responsável pelas reações bioquímicas relacionadas à modificação da matéria orgânica e do intemperismo de rochas, colaborando para a gênese do solo e atuando como reguladora de nutrientes, especialmente através de processos de decomposição e ciclagem de nutrientes (ARIAS *et al.*, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA 2006; ANDREOLA; FERNANDES, 2007).

As plantas exercem forte influência sobre as populações microbianas em suas raízes. Isso se explica pela capacidade diferenciada que os microrganismos possuem em metabolizar

as diferentes fontes de carbono disponíveis (WANG *et al.*, 2017). Plantas e microrganismos do solo evoluíram simultaneamente, por intermédio de um sistema de sinalização química, através da secreção de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares, no qual favorece o desenvolvimento de microrganismos na rizosfera (JIANG *et al.*, 2017). Assim, o conhecimento do potencial enzimático e funcional dos microrganismos é importante para avaliar a qualidade, uma vez que essa microbiota pode estar associada a estabilidade do ecossistema (JURBURG; SALLES, 2015). Aproximadamente 5-21% do carbono orgânico total produzido pela fotossíntese são deslocados para a rizosfera através dos exsudatos radiculares (HAICHAR *et al.*, 2014) e utilizado na manutenção dos microrganismos presentes no solo. Logo, os exsudatos radiculares são capazes de afetar a estrutura da comunidade microbiana (LAVECCHIA *et al.*, 2015).

Sobre as interações determinadas entre os microrganismos com as plantas, pesquisas vem demonstrando a importância da interação Planta-microrganismo. Por exemplo, a interação fungo micorrízico e plantas foi essencial para o controle do espaço terrestre pelas plantas. Na atualidade, mais de 82% das plantas encontradas no planeta exercem simbiose com fungos micorrízicos (arbusculares ou ectomicorrizas) (FULTHORPE *et al.*, 2018). Assim como interações com bactérias, no qual as espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* possuem tempos de desenvolvimento respectivamente 1,5 e 2,5 vezes maiores na rizosfera do que no solo não-rizosférico em consequência do aumento na disponibilidade de substratos. Devido a isso, considera-se que a rizosfera é um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Estudos informaram que plantas não relacionadas filogeneticamente (distantes na escala evolutiva) selecionam microrganismos de táxons distintos (BURNS *et al.*, 2015). Entretanto, uma característica importante dessa seleção diz respeito a manutenção quase que constante das atividades exercidas pela microbiota. Funções essas associadas a captação de nutrientes, proteção contra patógenos, entre outras, são funcionalidade que provocam o desenvolvimento e a sanidade da planta (MENDES *et al.*, 2013). Indiscutivelmente, a planta seleciona os microrganismos que vão estar presente na sua rizosfera e muitos fatores contribuem para essa seleção. Entretanto, ainda não há estudos sobre interação planta-microrganismo com espécies nativas de Carajás.

#### 1.4 METAGENÔMICA

A metagenômica é o estudo do conjunto de genomas recuperado diretamente de amostras ambientais. Acredita-se que uma quantidade muito baixa de microrganismos sejam cultiváveis por técnicas de cultivo laboratorial (DIMITROV, 2009). Com isso, extrair o DNA diretamente do ambiente, permite o acesso a dados genéticos de organismos ainda não cultiváveis.

O sequenciamento do metagenoma de amostras ambientais está sendo amplamente utilizado para compreender a dinâmica das comunidades microbianas em diferentes ambientes. A metagenômica, consiste em uma ferramenta que viabiliza estimar a diversidade microbiana ou vias metabólicas presentes no ambiente através da extração direta do material genético de uma amostra ambiental sem necessidade de realizar etapas prévias de isolamento e cultivo dos microrganismos, aumentando as chances de caracterizar mais precisamente a comunidade presente naquele ambiente específico (PALHETA, 2017). A diversidade microbiana pode ser analisada através da amplificação de genes como o 16S rRNA (procariotos) ou a maior subunidade ribossomal (eucariotos) onde esse método está sendo amplamente utilizado no estudo da composição e diversidade de comunidades microbianas em habitats diversos (ZEPEDA; LEON; FLORES, 2015).

Os solos são ambientes complexos e constituídos por inúmeros microrganismos. Entretanto, a contribuição desses microrganismos para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas ainda não foi totalmente compreendida. Desta forma, pesquisas sobre estudos biogeoquímicos de ambientes de solo têm contribuído para determinar os fatores ecológicos-chaves que definem a diversidade e a composição microbiana relacionada a cada ecossistema (PASTERNAK *et al.*, 2013). Com isso, o objetivo dos projetos que incluem a análise do metagenoma frequentemente inclui identificar genes funcionais, estimar a diversidade microbiana, compreender a dinâmica da população de microrganismos, montar o genoma de um organismo não cultivado e identificar biomarcadores importantes para classificar um processo ocorrido em ambientes específicos (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2011).

## **ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

O presente trabalho se encontra organizado sob a forma de relatório técnico, como disposto no Regulamento Interno do Programa de Pós-Graduação em Uso Sustentável de Recursos Naturais em Regiões Tropicais do ITV DS.

## **RELATÓRIO TÉCNICO**

**DIVERSIDADE MICROBIANA NA RIZOSFERA DE *Dioclea apurensis* kunth EM  
ÁREAS NATIVAS E DE RECUPERAÇÃO EM CARAJÁS**

### **Sob autoria de**

Paulo Henrique de Oliveira Costa, Hector Andres Herrera Echeverria, José Augusto Bitencourt, Sidney Vasconcelos do Nascimento, Cecílio Frois Caldeira, Rafael Borges da Silva Valadares

**PROD.TEC.ITV.DS – N004/2021  
DOI 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2021.04.Costa**

**Belém / PA  
Fevereiro / 2021**

## 2 INTRODUÇÃO

A Serra dos Carajás, localizada no estado do Pará, possui um ecossistema que é composto por flora e fauna específicas, formando uma vegetação típica e altamente diversa que se caracteriza por uma camada arbustiva-herbácea denominada canga (JACOBI *et al.*, 2007). As plantas desse ecossistema apresentam inúmeras adaptações morfológicas que podem promover sua adaptação ou sobrevivência a esse ambiente (MITRE *et al.*, 2018). Neste ambiente os microrganismos desempenham funções fundamentais na manutenção dos ecossistemas, como elementos importantes de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos, o que os torna essenciais para a manutenção desse ecossistema (ANDREOLA; FERNANDES, 2007). O solo é um sistema biológico complexo e dinâmico, onde os microrganismos degradam praticamente todos os compostos orgânicos (NANNIPIERI *et al.*, 2017). No solo, as plantas oferecem um ambiente bastante específico para o desenvolvimento natural de comunidades microbianas. Durante a evolução, essas comunidades desenvolveram estratégias que possibilitaram sua interação com as plantas (WANG *et al.*, 2017).

As interações podem ser benéficas, portanto, sem provocar danos para as plantas, ou prejudiciais, quando microrganismos patogênicos provocam desequilíbrio bioquímico nas plantas, gerando diferentes tipos de doenças (ÁLVAREZ *et al.*, 2016). Apesar disso, diversos processos mediados através dos microrganismos do solo são fundamentais à ciclagem de nutrientes, como a fixação de C, mineralização da matéria orgânica, fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização de fosfatos (MOREIRA *et al.*, 2010).

As raízes das plantas são heterotróficas, sendo que suas principais funcionalidades são de sustentação, absorção de água e nutrientes (LAVECCHIA *et al.*, 2015). Entretanto, as raízes realizam outras importantes funções, determinadas por meio da liberação de compostos orgânicos, como aminoácidos, carboidrato e ácidos orgânicos provenientes da fotossíntese que, nesse caso, possuem efeitos importantes sobre o solo (CARVALHO, 2016).

O conceito de rizosfera foi estabelecido inicialmente por Hiltner em 1904, no qual compreende a região do solo que é influenciada pelas raízes das plantas proporcionando um ambiente dinâmico e com intensa atividade microbiana (HASSAN *et al.*, 2019). A conexão entre esses microrganismos e a planta é fundamental para o sucesso das plantas em ambientes naturais.

Os exsudatos das raízes simbolizam fontes relevantes de energia para os microrganismos da rizosfera e governam a estrutura da comunidade microbiana existente. O perfil destes exsudatos difere de acordo com espécies de plantas, estágio de desenvolvimento,

pH, textura do solo e na disponibilidade de nutrientes (JIANG *et al.*, 2017). Desta forma, as plantas influenciam na diversidade dos microrganismos, e os microrganismos estimulam a exsudação das plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). A heterogeneidade de compostos orgânicos e a diversidade de microrganismos depositados na rizosfera é superior comparado com solos não-rizosféricos (LU *et al.*, 2018).

Segundo Mechi e Sanches (2010), as atividades relacionadas à mineração proporcionam grandes impactos para a vegetação, podendo prejudicar sua regeneração. As atividades de mineração culminam com a retirada do horizonte pedológico superficial “A”, de onde é obtida a maior quantidade de minerais primários para a planta, fundamentais para boas taxas de fertilidade. Os horizontes “B” e “C” ficam expostos e vulneráveis à atuação de processos erosivos com impactos negativos nas coberturas vegetais. A atividade de exploração mineral pode também provocar assoreamento de corpos hídricos, no qual acarreta prejuízo às populações ao redor.

Nesse contexto, a recuperação de áreas degradadas se torna cada vez mais necessária, visando a diminuição dos efeitos negativos que promovem a destruição dos ambientes naturais (GUERRA, 2017). Estes fatores comprovam a relevância de estudos e pesquisas para melhor identificação de grupos de organismos presentes em determinado ecossistema e como alguns impactos (desmatamentos e mineração) podem promover modificações nesses ambientes (SÁNCHEZ, 2015). Neste contexto, a biologia do solo disponibiliza inúmeras alternativas para o desenvolvimento de novas tecnologias para monitoramento ambiental.

Dentre as técnicas utilizadas nas pesquisas em áreas ambientais está a metagenômica, que consiste em uma ferramenta que viabiliza estimar a diversidade microbiana presentes no ambiente através da extração direta do material genético de uma amostra ambiental (PALHETA, 2017). Os genomas são obtidos diretamente das amostras ambientais, sem necessidade de realizar etapas prévias de isolamento e cultivo dos microrganismos, aumentando as chances de caracterizar mais precisamente a comunidade presente no ambiente estudado.

Na vegetação nativa de canga, espécie *Dioclea Apurensis* Kunth, da família Fabaceae, ocorre em ambiente nativo e possui alta taxa de sobrevivência em áreas em recuperação na Serra dos Carajás. Essa planta é caracterizada pela capacidade em armazenar grandes concentrações de metais pesados nos tecidos celulares e de estabelecer simbiose com microrganismos, proporcionando condições favoráveis ao seu estabelecimento nesse ecossistema. (DAGHINO *et al.*, 2016; VINCENT; MEGURO, 2008). Simultaneamente a

mecanismos de adaptações fisiológicas e morfológicas, ocorrem possíveis interações microbianas que favorecem o desenvolvimento dessa espécie (FARIA *et al.*, 2011). A identificação e quantificação de microorganismos presentes na rizosfera associada à *D. apurensis* é fundamental para a proposição e melhoria de estratégias para o estabelecimento dessa planta em projetos de recuperação de áreas degradadas em Carajás.

Apesar da importância ecológica dos ecossistemas de canga, poucos são os estudos que abordam a interação de plantas e microrganismos nesses ambientes nativos afetados pela mineração. Assim, o presente estudo tem por objetivo analisar a microbiota associada a solo rizosférico e não-rizosférico de *Dioclea apurensis*, endêmica da Serra dos Carajás, visando identificar microrganismos possivelmente relacionados à adaptação desta planta ao ambiente nativo de canga e em área em recuperação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

- Identificar os microrganismos presentes em solos rizosféricos que sejam essenciais para o estabelecimento de populações de *Dioclea apurensis* ao ambiente de canga nativa e de recuperação.

#### 3.2 ESPECÍFICO

- Acessar a diversidade de fungos e bactérias em solos rizosféricos e não-rizosféricos associados a *Dioclea apurensis* em áreas nativas e em recuperação.
- Comparar o ambiente de canga e de área em recuperação para analisar a biodiversidade de microrganismos e a possível influência na seleção destes grupos pela *Dioclea apurensis*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

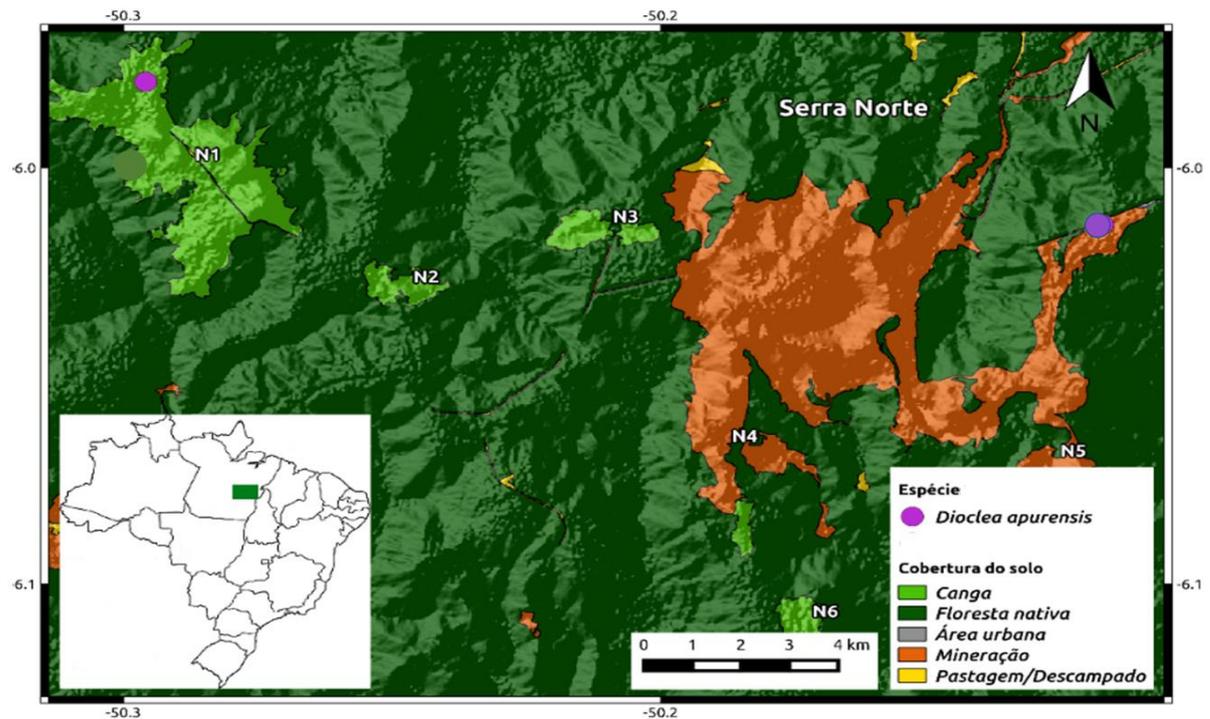
### 4.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM

Os locais de amostragem incluíram um ecossistema nativo de canga ( $6^{\circ} 00'41,0''$  S  $50^{\circ} 17'45,0''$  W) e uma área afetada por mineração em recuperação, denominada "DMR" ( $6^{\circ} 02'32,0''$  S  $50^{\circ} 07'04,0''$  W) localizado na serra de Carajás, no estado do Pará (Figura 1). A revegetação da área em recuperação iniciou no ano de 2014 com plantas comerciais e nativas, onde foi utilizado uma fertilização com NPK 04-14-08, *mulch*, composto orgânico e fixador AG60.

Foram coletadas quatro réplicas independentes de solo rizosférico e solo não-rizosférico de *Dioclea apurensis* na canga e quatro em área de recuperação (DMR), totalizando dezesseis amostras coletadas. As amostragens de solos rizosféricos foram realizadas com a planta sendo cuidadosamente removidas do solo, e o solo aderido às raízes foram removidos por agitação manual. A coleta do material foi realizada utilizando luvas descartáveis (preferencialmente de acetonitrila) e espátulas de metal limpas (utilizando álcool 70%) para cada local amostrado.

O solo do ambiente rizosférico foi coletado utilizando espátulas (profundidade de 0 a 10 cm). Quanto ao solo não-rizosférico, amostras foram coletadas em pontos aleatórios da área de canga e de recuperação, com distância de cinco metros para a raiz de *Dioclea apurensis* e com a profundidade de 0 a 10 cm. Durante a coleta os materiais foram acondicionados em Falcon de 50 ml estéreis, mantidos em gelo e posteriormente armazenados em  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração de DNA.

**Figura 1**-Localização de coleta das amostras de solo rizosférico e não-rizosférico para cada ambiente de estudo



Fonte: próprio autor, (2021).

#### 4.2 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

O DNA foi extraído a partir de 0,25g de solo, usando o kit de extração de DNA QIAGEN PowerSoil® DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi verificada através do Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). A qualidade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.).

A construção das bibliotecas de sequências bacterianas foi realizada com o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA), no qual foi utilizado o mesmo protocolo com adaptações para a construção da biblioteca de fungo. As análises das comunidades bacterianas foram realizadas com as regiões V3-V4 do 16S rRNA, onde foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram utilizados o par de primers “S-D-Bact-0341-b-S-17-N” (5’-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3’) e “S-D-Bact-0785-a-A-21-N” (5’-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3’) com adaptadores para a plataforma MiSeq-Illumina.

As análises das comunidades de fungos foram realizadas com a região Espaçadora do Transcrito Interno (ITS), no qual foi amplificada usando o par de *primers* “fITS7i” (5’-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGARTCATCGAATCTTTG-3’) e “ITS4i” (5’-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) com adaptadores para a plataforma Miseq-Illumina. Os *primers* utilizados tanto para bactéria quanto para fungos, contêm sequências nucleotídicas chamadas *overhang*, que permitem a adição dos *indexs* nas etapas posteriores. Controles negativos foram utilizados na extração de DNA e na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a primeira PCR foi utilizado 12,5 µL de enzima 2x Kapa Hifi HotStart Ready Mix, 5 µL de cada primer e 2,5 µL de DNA. A construção da biblioteca para fragmentos bacterianos possui uma etapa inicial no termociclador de 3 minutos a 95 °C, seguida por 25 ciclos em 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e 72 °C por 5 minutos. A construção da biblioteca para fragmentos de fungos, começa em uma etapa inicial no termociclador de 94 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 30 segundos e 72 °C por 7 min. Em seguida, foi realizada a quantificação do DNA através do Kit de quantificação de DNA Qubit™dsDNA HS (High Sensitivity) Assay (Thermo Fisher Scientific) e fluorímetro Qubit ®3.0 (Thermo Fisher Scientific). A qualidade dos *amplicons* foi verificada quanto ao tamanho dos fragmentos, por meio de eletroforese capilar, utilizando o Bioanalyzer Agilent Technology 2100 (PANARO et al., 2000). Os produtos da PCR foram purificados com o kit de esferas magnéticas AMPure XP beads (Bechman Coulter) e indexado em uma nova PCR com o kit Nextera XT (Illumina) com adaptadores de sequências únicas (*indexs*) que foram adicionados a cada amostra. Para a segunda PCR, foi utilizado 2,5 µL de Nextera XT index Primer1, 2,5 µL de Nextera XT index Primer2, 12,5 µL de enzima 2x Kapa Hifi HotStart Ready Mix, 5 µL de água ultrapura e 2,5 µL de produto de PCR. Logo após, foi realizado novamente a purificação com as esferas magnéticas utilizando o kit Agencourt AMPure XP e quantificada através do Qubit ® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

Posteriormente, a biblioteca foi padronizada para concentração de 4 nM e o *pool* genômico foi agrupado de acordo com o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA). Após o preparo da biblioteca foi realizado o sequenciamento de *amplicons* na plataforma Miseq-Illumina utilizando o kit de corrida MiSeq V3 600 ciclos. O sequenciamento de nova geração das regiões V3-V4 para

bactérias e regiões ITS para fungos foi sequenciado no Laboratório da Universidade Federal do Pará.

#### 4.3 BIOINFORMÁTICA

As sequências obtidas através do sequenciamento de *amplicons* da região ITS e 16S das amostras de solos rizosféricos e não-rizosféricos, foram alinhadas usando o pipeline do PIMBA (*A Pipeline for MetaBarcoding Analysis*), um *pipeline* aplicado para análise de dados de *metabarcoding* que possibilita utilizar bancos de dados taxonômicos distintos. O PIMBA foi desenvolvido pelo grupo de bioinformática do Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável para análise de metabarcodes e tem como base o *pipeline* QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO *et al.* 2010, BOLYEN *et al.* 2019).

Os dados de sequenciamento de fungo foram processados utilizando as etapas de trimagem que consiste na retirada de contaminantes e na remoção dos adaptadores. Posteriormente, foi realizado a filtragem por qualidade (Phred >20) utilizando a ferramenta *Prinseq*. Em seguida, somente as sequências *forward* e *reverse* foram montadas através do montador *Pear* (ZHANG *et al.* 2014). Após a montagem, ocorreu a etapa de derreplicação e em seguida foi truncado em 200. Logo após, todas as sequências menores que 50 bp foram descartadas e a filtragem para quimeras foi realizado. As sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) utilizando o VSEARCH. O agrupamento das sequências de OTUs é usada para classificar grupos de indivíduos com similaridade > 97% . Com isso, a classificação taxonômica foi realizada através do banco de dados UNITE (ABARENKOV *et al.*, 2010).

As sequências bacterianas foram processadas de forma similar com o pipeline do PIMBA (*A Pipeline for MetaBarcoding Analysis*), onde foi realizado as etapas de trimagem e remoção dos adaptadores. Em seguida, foi realizado a filtragem por qualidade (Phred >20) utilizando a ferramenta *Prinseq*. Dessa forma, as sequências *forward* e *reverse* foram montadas através do montador *Pear* (ZHANG *et al.* 2014). Após a montagem, ocorreu a etapa de derreplicação e em seguida foi truncado em 240. Diante disso, todas as sequências menores que 50 bp foram descartadas e a filtragem para quimeras foi realizado. As sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) utilizando o VSEARCH. O agrupamento das sequências OTUs é utilizada para classificar grupos de indivíduos com

similaridade > 97%. Logo após, a classificação taxonômica foi realizada através do banco de dados *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os pacotes *phyloseq* v.1.30.0, *ggplot* v.3.3.0 e *vegan* v.2.5-6 do *softwares* R (v.3.6.3). A construção dos gráficos foi realizada através da composição taxonômica para cada amostra de solo rizosférico e não-rizosférico, onde considerou matriz de abundância relativa e os parâmetros de alfa e beta diversidade com valor de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. A diversidade beta foi calculada e a análise de coordenadas principais (PCoA) construída usando as distâncias ponderadas do UniFrac no software R v.3.6.3. A diversidade alfa foi estimada para conhecer a diversidade de espécies em cada um dos três índices, incluindo Shannon, Chao1 e Observed, calculados usando o software R v.3.6.3.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VISÃO GERAL DE MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS

O sequenciamento da região ITS2 produziu um total de 3.948.832 leituras brutas em 16 bibliotecas de entrada. Após a filtragem de qualidade, 2.760.666 sequências de *amplicons* foram consideradas. Solos de canga apresentaram mais sequências fúngicas (1.404.745) do que área em recuperação (1.355.921). Os índices de diversidade de Shannon e Chao1, bem como OTUs observados de sequências fúngicas, foram maiores nas amostras em área em recuperação (figura 2).

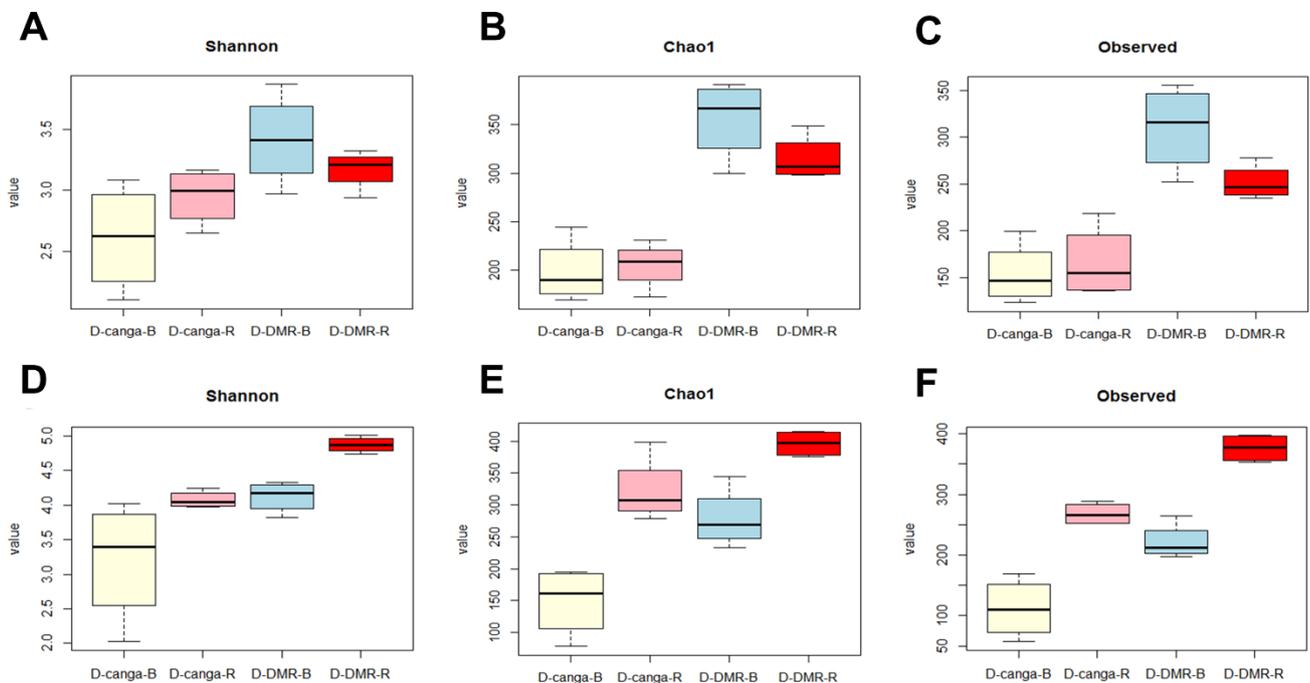
O sequenciamento 16S produziu um total de (4.208.259) leituras brutas em 16 bibliotecas de entrada. Após a filtragem de qualidade, foram consideradas (1.361.859) sequências. Os solos em área em recuperação apresentaram maior número de sequências (769.122) do que solos de canga (592.737). Os índices de diversidade de Shannon e Chao1, bem como OTUs observados, foram maiores nas amostras em área em recuperação (figura 2).

O microbioma associado à *D. apurensis* em áreas em recuperação, apresentou maior diversidade de fungos e bactérias nas amostras de solos rizosféricos e não-rizosféricos comparado com canga. Essa abundância microbiana elevada nas amostras de áreas em recuperação pode ser consequência de estratégias de recuperação de área, no qual a adição de solo superficial que contém alta matéria orgânica, restos de plantas e microrganismos latentes

do solo podem promover a diversidade microbiana e o crescimento da planta durante a recuperação do solo (FOWLER *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2018).

Essa maior diversidade microbiana após alterações significativas no solo é relatada anteriormente em zonas afetadas por incêndios florestais, em que tal microbiota pode ser considerada como a chave para promover a recuperação do ecossistema (BRAUN *et al.*, 2006; FUENTES-RAMIREZ *et al.*, 2018)

**Figura 2**—Índices de diversidade alfa (Shannon e Chao1) e número total de OTUs de sequências de fungos (A-C) e bactérias (D-F) em amostras de solos não-rizosféricos (canga-B/DMR-B) e rizosféricos (canga-R/DMR-R) associadas a *Dioclea apurensis* (D). Os gráficos foram considerados estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ).



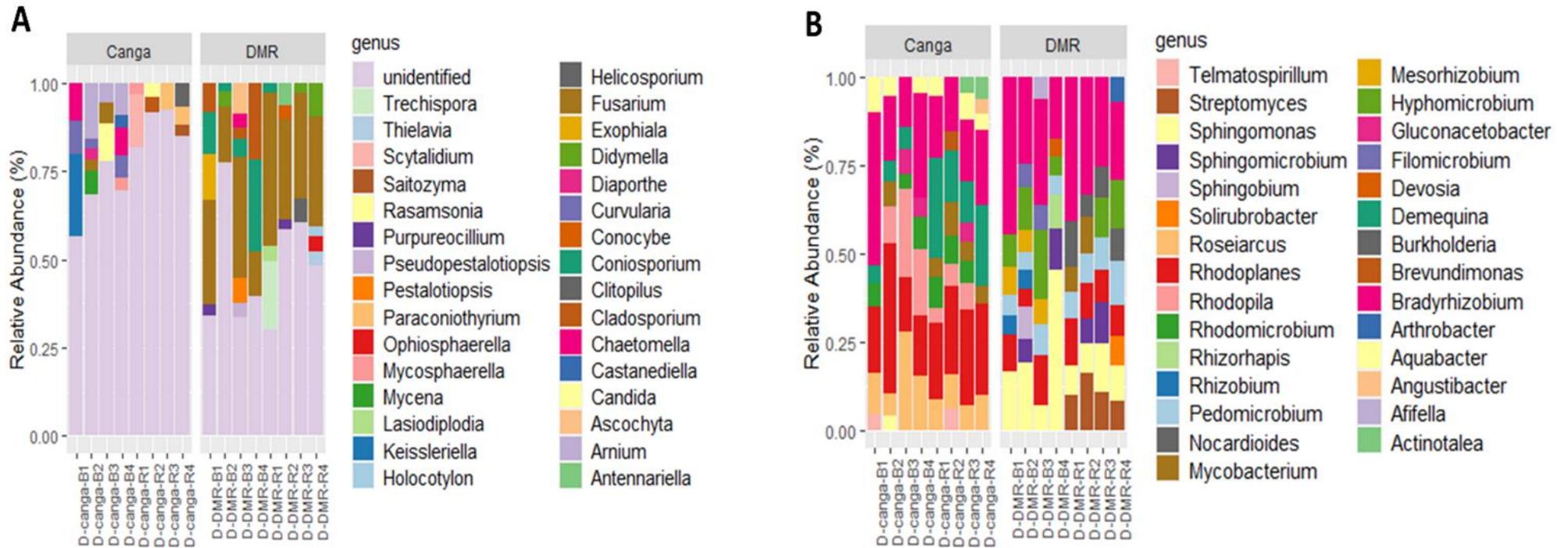
Fonte: próprio autor, (2021).

## 5.2 DIVERSIDADE DE MICROORGANISMOS BASEADA NA ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E FUNGOS EM SOLOS DE CANGA E DE ÁREAS EM RECUPERAÇÃO

Na canga, as análises das sequências fúngicas obtidas de *D. apurensis* identificou o filo Ascomycota como o mais abundante na rizosfera e nos solos não-rizosféricos, com abundância relativa (AR) de 93,8 e 87,7%, respectivamente. Basidiomycota foi o segundo filo mais abundante nas amostras de solos rizosféricos e não-rizosféricos, com AR de 4,4 e 1,6%, respectivamente. Glomeromycota também foi detectado em solos não-rizosféricos apresentando um AR de 1,43%. Em nível de gênero (Figura 3), as sequências fúngicas mais abundantes associadas à rizosfera de *D. apurensis*, foram relacionados aos fungos não

identificados (AR 77,3%), seguido por *Paraconiothyrium* (AR 2,9%), *Scytalidium* (AR 2,2%) e *Clitopilus* (AR 1,7%), enquanto em solos não-rizosféricos os gêneros não identificados também foram os mais abundantes (AR 61,9%), seguidos por *Arnium* (AR 7,6%) e *Keissleriella* (AR 6,4%).

**Figura 3**-Abundância relativa em nível de gênero das principais seqüências de fungos obtidas de *Dioclea apurensis* (A) e seqüências bacterianas obtidas de *Dioclea apurensis* (B) de solo não-rizosférico (canga-B/DMR-B) e rizosférico (canga-R/DMR-R) em canga e área de recuperação (DMR). Os números no eixo x representam as réplicas de cada solo



Fonte: próprio autor, (2021).

Em relação às sequências bacterianas obtidas em *D. apurensis*, Acidobacteria, Proteobacteria e Actinobacteria foram os três filos mais abundantes em solos rizosféricos e não-rizosféricos, com AR de 42,8, 38,7 e 16,1%; 53,2, 35,8 e 10,2%, respectivamente. Em nível de gênero (Figura 3), sequências associadas à rizosfera de *D. apurensis* foram *Rodoplanos* (AR 20,0%), seguido por *Bradyrhizobium* (AR 14,4%), *Demequina* (AR 13,9%) e *Roseiarcus* (AR 6,54%), enquanto em solo não-rizosférico *Bradyrhizobium* foi o mais abundante (AR 24,3%), seguido por *Rhodoplanes* (AR 14,0%), *Roseiarcus* (AR 11,9%) e *Rhodopila* (AR 10,2%).

Em área de recuperação, as análises das sequências fúngicas identificou o filo Ascomycota como dominante na rizosfera e nos solos não-rizosféricos associados a *D. apurensis*, com AR de 78,0 e 85,2%, respectivamente. Basidiomycota foi o segundo filo mais abundante em solos rizosféricos e em solos não-rizosféricos, com um AR de 21,0 e 13,0%, respectivamente. Glomeromycota também foi detectado na rizosfera e em solos não-rizosféricos, apresentando AR de 0,61 e 0,8%, respectivamente. Em nível de gênero (Figura 3), as sequências fúngicas mais abundantes identificadas na rizosfera de *D. apurensis* foram relacionadas a fungos não identificados (AR 49,9%), seguido por *Fusarium* (AR 22,7%) e *Trechispora* (AR 5,0%), enquanto que no solo não-rizosférico os gêneros não identificados foram o mais abundante (AR 52,4%), seguido por *Fusarium* (AR 16,9%) e *Coniosporium* (RA 6,0%).

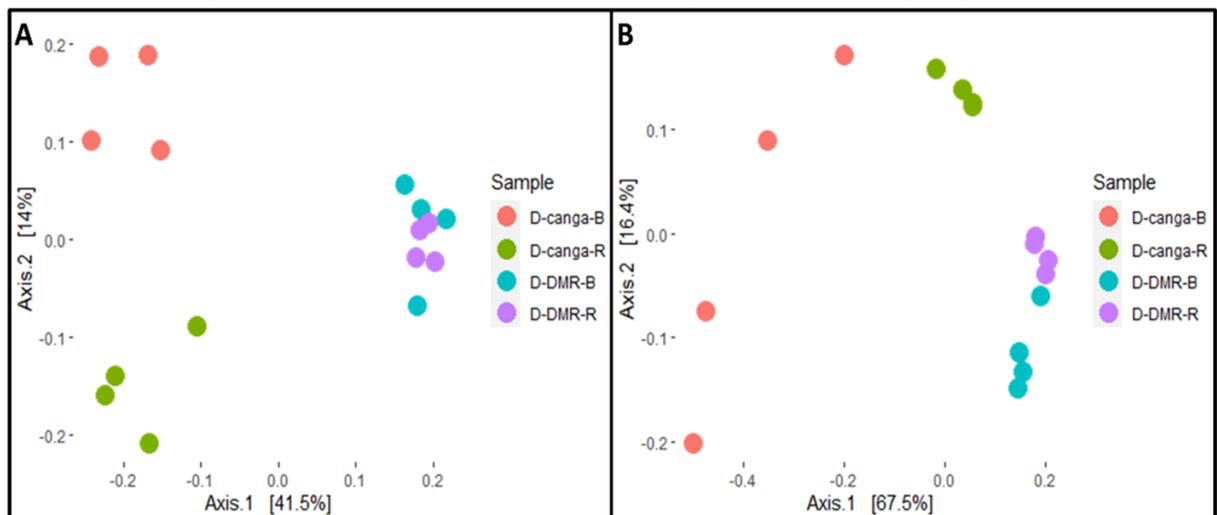
Em relação às sequências bacterianas obtidas em solos associados a *D. apurensis*, Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria foram os três filos mais abundantes em ambos, rizosfera e solos não-rizosféricos, com AR de 64,1, 18,0 e 14,9%; e 67,0, 23,3 e 8,63%, respectivamente. Em nível de gênero (Figura 3), sequências mais abundantes associadas à rizosfera de *D. apurensis* foram relacionadas a *Bradyrhizobium* (AR 14,5%), seguido por *Streptomyces* (AR 5,5%), *Rhodoplanes* (AR 4,8%) e *Sphingomonas* (AR 4,2%); enquanto no solo não-rizosférico *Bradyrhizobium* foi o mais abundante (AR 18,5), seguido por *Sphingomonas* (AR 12,0%), *Hyphomicrobium* (AR 6,9%) e *Rodoplanos* (AR 5,3%).

A Análise de Coordenadas Principais (PCoA) de comunidade microbiana demonstrou que as comunidades eram distintas entre os dois ambientes de amostragem (área em recuperação e canga nativa), no qual foi possível diferenciar as comunidades microbianas habitando a rizosfera de *Dioclea apurensis*. Em canga, esse efeito é maior comparado com área de recuperação, e também foi mais pronunciado para a comunidade de fungos do que de

bactérias. No entanto, foram identificadas semelhanças entre as amostras de solos no ambiente em recuperação nas comunidades de fungos e bactérias (Figura 4).

**Figura 4-** A análise de coordenadas principais identifica que *Dioclea apurensis* obteve maior seletividade de comunidades de fungos em canga comparado com área de recuperação (A).

Em relação as comunidades de bactérias, *Dioclea apurensis* demonstrou uma maior similaridade em amostras de canga e em área de recuperação (B). As análises foram obtidas de amostras de solos rizosféricos (canga-R/DMR-R) e não-rizosféricos (canga-B/DMR-B) de *Dioclea apurensis* (D) em ecossistemas de canga e área de recuperação (DMR).



Fonte: próprio autor, (2021).

As análises demonstraram que os filos bacterianos (Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria) e os filos de fungos (Ascomycota e Basidiomycota) foram os mais abundantes para a planta em ambiente de canga e área em recuperação. Esses resultados estão de acordo com Vieira *et al.* (2018), que identificaram Proteobacteria, Acidobacteria e Actinobacteria, bem como Ascomycota e Basidiomycota como filos dominantes em uma área de mineração de ferro revegetada no Cerrado brasileiro. Dentro desses filos podem ser detectados diversos microrganismos patogênicos, saprofíticos, simbióticos, endofíticos, patogênicos e promotores de crescimento de plantas, que foram identificados nesse estudo, e podem desempenhar papéis cruciais na manutenção dos serviços ecológicos durante os estágios iniciais de colonização de plantas em áreas em recuperação.

Os resultados também identificam microrganismos com potencial para atuarem na promoção do crescimento de plantas. Em canga, fungos endofíticos potenciais, como os gêneros *Paraconiothyrium* e *Scytalidium* foram detectados na rizosfera da planta. Estudos com *Paraconiothyrium* demonstrou que espécies deste gênero foram isoladas da raiz de *Gymnocarpus przewalskii*, que se desenvolvem em solos desérticos e podem contribuir com

efeitos positivos no crescimento de plantas inoculadas sobre estresse hídrico (LI *et al.*, 2018). Além disso, o gênero *Scytalidium* foi associado a raiz de *Pinus merkusii* no qual são capazes de solubilizar fosfato (MUJAHIDAH *et al.*, 2019). Da mesma forma, espécies do gênero *Clitopilus* foi detectado na rizosfera de *D. apurensis*. Estudos demonstram que espécies desse gênero podem aumentar a absorção de N e K em plantas inoculadas (JIN *et al.*, 2019).

Os gêneros de bactérias *Bradyrhizobium* e *Rhodoplanes* foram detectados na rizosfera da planta no ambiente de canga e área em recuperação. Esses gêneros têm sido relatados como microrganismos benéficos que contribuem para o ciclo do nitrogênio e como promotoras de crescimento da planta (GONZÁLEZ *et al.*, 2019). Outro gênero de bactéria detectado foi *Sphingomonas*, que possui espécies capazes de aumentar a tolerância de metais em plantas (BILAL *et al.*, 2018).

Nas áreas em recuperação, os gêneros de fungos *Fusarium* e *Coniosporium* foram detectados nas rizosferas das plantas. O gênero *Fusarium* possui principalmente espécies fitopatogênicas (ZAIN *et al.*, 2019). O gênero *Coniosporium* possui espécies com potencial antagonista a patógenos presentes no solo (DONG *et al.*, 2016). O gênero *Trechispora* também foi identificado na rizosfera de *D. apurensis*, no qual apresenta espécies com potencial para associação com ectomicorriza com outras espécies (VANEGAS-LEÓN *et al.*, 2019).

Nas plantas coletadas na canga, foram detectados vários microrganismos envolvidos na mineralização de N, incluindo *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhodomicrobium* e *Roseiarcus*. Esses resultados concordam com Castro *et al.* (2017), que identificaram esses grupos de bactérias em rizosfera de *Vigna unguiculate*, e com Oliveira *et al.* (2020), que também identificaram diversos gêneros formadores de nódulos proporcionados por bactérias fixadoras de nitrogênio em amostras de solo. Portanto, tais táxons bacterianos podem ser considerados como chave para a promoção do crescimento vegetal, no qual podem ser inoculados em plantas para promover o desenvolvimento vegetal em áreas degradadas, principalmente se apresentarem características que auxiliam no crescimento vegetal, incluindo formação de biofilme, sideróforos, entre outros (TIWARI & LATA, 2018). Assim como na canga, os gêneros de bactéria *Bradyrhizobium*, *Rhodoplanes*, *Sphingomonas* também foram associados a rizosfera de *D. apurensis* em área de recuperação. A ocorrência destes organismos, provavelmente oriundos da matéria orgânica adicionada no solo, são cruciais para o bom desempenho desta espécie nas áreas em recuperação.

Os táxons de fungos identificados com papéis benéficos para plantas que estão submetidas a condições de estresse, incluem fungos micorrízicos arbusculares, endófitos septados escuros (DSE) e alguns extremófilos. Os resultados mostraram *Rasamsonia* na rizosfera de *D. apurensis*, em que foram definidas como potenciais promotores de crescimento de plantas endofíticas associadas a *Nicotiana spp.* que se desenvolvem em regiões áridas (DASTOGEER *et al.*, 2018). Esses endófitos mesofílicos e termofílicos de plantas podem contribuir para o estabelecimento da planta, principalmente em solos com exposição direta à luz como os ambientes em recuperação. Logo, esses grupos fúngicos também são considerados como chave para a promoção do crescimento vegetal, no qual podem ser inoculados em plantas para promover o desenvolvimento vegetal em áreas degradadas. Dessa forma, a inoculação com os grupos de fungos e bactérias específicos encontrados nas áreas nativas, mas ainda não presentes nas áreas de recuperação, podem melhorar o desempenho das plantas e contribuir para o enriquecimento biológico do solo em projetos de recuperação.

Os resultados indicam que *Dioclea apurensis* seleciona microrganismos benéficos na rizosfera o que influencia positivamente o processo de recuperação de áreas. Os fatores ambientais como temperatura e umidade do solo podem interferir na abundância das populações microbianas e influenciar os resultados da composição dos grupos dessas populações. Contudo, a funcionalidade desses grupos deve ser aplicada para compreender os mecanismos de restauração de plantas em ambientes degradados (LIU *et al.*, 2017).

Os resultados desse estudo fornecem indícios sobre o papel relevante da microbiota associado a *D. apurensis* em áreas de canga e em recuperação. Desta forma, foram identificados fungos e bactérias associados à rizosfera com papéis benéficos que contribuem para o desenvolvimento da planta por meio da mineralização de P através de micorrizas, obtenção de N por bactérias fixadoras de nitrogênio, e alguns mesófilos e extremófilos que agregados podem melhorar o desempenho da planta sobre condições de estresse em áreas de canga e em recuperação. Desse modo, *D. apurensis* apresenta simultaneamente mecanismos de adaptação fisiológicas, morfológicas e interações microbianas que proporcionam o desenvolvimento dessa espécie em canga. Este conhecimento é importante para propor e aprimorar estratégias de estabelecimento dessa planta em área de recuperação de Carajás.

## 6 CONCLUSÕES

Por meio desse estudo foi possível identificar diferenças na microbiota associada a rizosfera de *D. apurensis* estabelecida em ecossistemas de canga e em áreas em recuperação. Em canga, esse efeito foi maior comparado com área de recuperação, e também foi mais acentuado para a comunidade de fungos do que de bactérias. Identificaram-se grupos de microrganismos com potencial para promotores de crescimento de plantas que são essenciais na adaptação e sobrevivência da espécie *D. apurensis* para os dois ambientes estudados. Estes microrganismos ajudam a melhorar a adsorção de nutrientes e água, proteger contra patógenos e promover o crescimento das plantas. Essa pesquisa contribui para o conhecimento e utilização de microrganismos benéficos em projetos de recuperação de áreas mineradas, beneficiando não apenas a espécie em estudo, mas também melhorando a qualidade do solo e a resiliência da comunidade vegetal nos ecossistemas.

## REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, Kessy et al. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. **New Phytologist**, v. 186, n. 2, p. 281-285, 2010.
- ÁLVAREZ, Sandra Pérez et al. *Pseudomonas fluorescens* Migula, control biológico o patógeno. **Revista de Protección Vegetal**, v. 30, n. 3, p. 225, 2016.
- ANDRÉ, Januário Cacilda; ALVAREZ, Fidel Luis; RIVERO, Jose Francisco Lastra. Caracterização dos impactos ambientais e sociais na exploração de rochas e minerais industriais no desenvolvimento local no município de Sumbe (Angola)/Characterization of environmental and social impacts.. **Cadernos CIMEAC**, v. 9, n. 1, p. 210-237, 2019.
- ANDREOLA, Faustino, and S. A. P. Fernandes. "A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas." *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônômico. p. 21-37, 2007.
- ARIAS, M. Enriqueta et al. Soil health: A new challenge for microbiologists and chemists. **International Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 13-21, 2005.
- ARTICO, M. **Recuperação de áreas degradadas através do uso integrado de lodo de esgoto e rejeito de mineração de basalto como substituto ao solo de cobertura**. 2018. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2018.
- BAKKER, Matthew G. et al. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. **Plant and Soil**, v. 392, n. 1-2, p. 115-126, 2015.
- BHATTACHARYYA, P. N.; GOSWAMI, M. P.; BHATTACHARYYA, L. H. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. **Journal of Phytology**, p. 26-41, 2016.
- BILAL, S. *et al.* Mechanisms of Cr (VI) resistance by endophytic *Sphingomonas* sp. LK11 and its Cr (VI) phytotoxic mitigating effects in soybean (*Glycine max* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 164, p. 648-658, 2018.
- BOLYEN, Evan et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.
- BURNS, Jean H. et al. Soil microbial community variation correlates most strongly with plant species identity, followed by soil chemistry, spatial location and plant genus. **AoB Plants**, v. 7, 2015.
- BRAUN, Burga et al. Polyphasic characterization of the bacterial community in an urban soil profile with in situ and culture-dependent methods. **Applied Soil Ecology**, v. 31, n. 3, p. 267-279, 2006.
- CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CARVALHO, Irineide Teixeira de. **Microbiologia básica**. 2016

CASTRO, Jordana Luísa de et al. Diversity and efficiency of rhizobia communities from iron mining areas using cowpea as a trap plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 41, 2017.

DASTOGEER, Khondoker MG et al. In vitro salt and thermal tolerance of fungal endophytes of *Nicotiana* spp. growing in arid regions of north-western Australia. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 51, n. 11-12, p. 602-616, 2018.

DIGHTON, J. **Fungi in ecosystem processes**. [S.l.]: CRC press, 2016.

DIMITROV, Mauricio Rocha. **Construção de Biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroxicarboxilatos**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DONG, Linlin et al. Soil bacterial and fungal community dynamics in relation to *Panax notoginseng* death rate in a continuous cropping system. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016

FARIA, S. M. et al. Composição florística de leguminosas com potencial para fixação biológica de nitrogênio em áreas de vegetação de canga (savana metalófito) do entorno do complexo minerador de Carajás. **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2011.

FARIA, SM de; CHADA, S. de S. Interação microrganismos e plantas na recuperação de áreas degradadas. **UNESP/Rio Claro**, 2003.

FOWLER, William M. et al. Evaluating restoration potential of transferred topsoil. **Applied Vegetation Science**, v. 18, n. 3, p. 379-390, 2015.

FUENTES-RAMIREZ, Andres et al. Short-term response of soil microorganisms, nutrients and plant recovery in fire-affected *Araucaria araucana* forests. **Applied Soil Ecology**, v. 131, p. 99-106, 2018.

FULTHORPE, Roberta et al. The green roof microbiome: Improving plant survival for ecosystem service delivery. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 5, 2018.

GALVÃO, Antonio Paulo Mendes. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**. Embrapa Florestas, 2000.

GONZÁLEZ, A. H. et al. Bradyrhizobium and Pseudomonas strains obtained from coal-mining areas nodulate and promote the growth of *Calopogonium muconoides* plants used in the reclamation of degraded areas. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 2, p. 523-533, 2019.

GUERRA, Antonio José Teixeira; JORGE, Maria do Carmo Oliveira. **Processos erosivos e recuperação de áreas degradadas**. Oficina de Textos, 2017.

HAICHAR, Feth et al. Root exudates mediated interactions belowground. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 77, p. 69-80, 2014.

HASSAN, Mohammad K.; MCINROY, John A.; KLOEPPER, Joseph W. The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. **Agriculture**, v. 9, n. 7, p. 142, 2019.

HENKES, Gunnar Jakob et al. Interactions of mycorrhiza and protists in the rhizosphere systemically alter microbial community composition, plant shoot-to-root ratio and within-root system nitrogen allocation. **Frontiers in Environmental Science**, v. 6, p. 117, 2018.

JACOBI, Claudia M. et al. Plant communities on ironstone outcrops: a diverse and endangered Brazilian ecosystem. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 7, p. 2185-2200, 2007.

JIANG, Jihang et al. Microbial community analysis of apple rhizosphere around Bohai Gulf. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8918, 2017.

JIN, Wei et al. Effects of endophytic and ectomycorrhizal basidiomycetes on *Quercus virginiana* seedling growth and nutrient absorption. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 38, n. 5, p. 457-470, 2019.

JURBURG, Stephanie D.; SALLES, Joana Falcão. Functional redundancy and ecosystem function-The soil microbiota as a case study. **LO YH et al. Biodiversity in ecosystems-linking structure and function. Rijeka: Intech**, p. 29-49, 2015.

LAVECCHIA, Anna et al. Microbial 16S gene-based composition of a sorghum cropped rhizosphere soil under different fertilization managements. **Biology and fertility of soils**, v. 51, n. 6, p. 661-672, 2015.

LI, Xia et al. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

LI, Yanzhi et al. *Actinotalea ferrariae* sp. nov., isolated from an iron mine, and emended description of the genus *Actinotalea*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3398-3403, 2013.

LI, Zhigang et al. Different responses of rhizosphere and non-rhizosphere soil microbial communities to consecutive *Piper nigrum* L. monoculture. **Scientific reports**, v. 6, p. 35825, 2016.

LIU, Huan et al. Dark septate endophytes colonizing the roots of 'non-mycorrhizal' plants in a mine tailing pond and in a relatively undisturbed environment, Southwest China. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 264-271, 2017.

LLADO, Salvador; LÓPEZ-MONDÉJAR, Rubén; BALDRIAN, Petr. Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 81, n. 2, p. e00063-16, 2017.

- LLORENS-MARÈS, Tomàs et al. Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. **The ISME journal**, v. 9, n. 7, p. 1648, 2015.
- LOHMANN, Lúcia G.; FIRETTI, Fabiana; GOMES, Beatriz M. Flora of the canga of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Bignoniaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1063-1079, 2018.
- LU, Tao et al. Rhizosphere microorganisms can influence the timing of plant flowering. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 231, 2018.
- MENDES, Rodrigo; GARBEVA, Paolina; RAAIJMAKERS, Jos M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013
- MECHI, Andréa; SANCHES, Djalma Luiz. Impactos ambientais da mineração no Estado de São Paulo. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, p. 209-220, 2010.
- MITRE, S. K. et al. Nutrient and water dynamics of Amazonian canga vegetation differ among physiognomies and from those of other neotropical ecosystems. *Plant Ecology*, v. 219, n. 11, p. 1341-1353, 2018.
- MOREIRA, Fatima Maria de Souza et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74, 2010.
- MOREIRA, Fátima Maria; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora Ufla, 2002.
- MOREIRA, FM de S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. UFLa, 2006.
- MOREIRA, Fatima Maria et al. Symbioses of plants with rhizobia and mycorrhizal fungi in heavy metal-contaminated tropical soils. In: **Heavy Metal Contamination of Soils**. Springer, Cham, 2015. p. 215-243.
- MUJAHIDAH, Shofia et al. Identification of Ectomycorrhiza-Associated Fungi and Their Ability in Phosphate Solubilization. **Jurnal Biologi Indonesia**, v. 14, n. 2, 2019.
- NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European journal of soil science**, v. 68, n. 1, p. 12-26, 2017.
- OLIVEIRA SILVA, Aline et al. Plant growth-promoting rhizobacterial communities from an area under the influence of iron mining and from the adjacent phytophysionomies which have high genetic diversity. **Land Degradation & Development**. 2020
- PALHETA, J. S. O. Análise de sequências de DNA metagenômico de solos da Floresta Atlântica paranaense: **implicações ecológicas e biotecnológicas**. 2017
- PASTERNAK, Zohar et al. Spatial and temporal biogeography of soil microbial communities in arid and semiarid regions. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69705, 2013.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiological research**, v. 166, n. 2, p. 99-110, 2011.

RAMOS, Silvio J. et al. Plant growth and nutrient use efficiency of two native Fabaceae species for mineland revegetation in the eastern Amazon. **Journal of Forestry Research**, p. 1-7, 2019.

SÁNCHEZ, Luis Enrique. **Avaliação de impacto ambiental**. Oficina de Textos, 2015

SCHAEFER, Carlos Ernesto et al. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. **Geossistemas Ferruginosos do Brasil**.(Eds FF do Carmo and LHY Kamino) pp, p. 77-102, 2015

SCHAEFER, Carlos Ernesto et al. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. **Geossistemas Ferruginosos do Brasil**.(Eds FF do Carmo and LHY Kamino) pp, p. 77-102, 2015.

SILVA, C. H. et al. Província aurífera Cuiabá-Poconé-estágio atual do conhecimento geológico dos depósitos de ouro. **Coletânea geológica de Mato Grosso. Províncias e distritos auríferos de Mato Grosso**. Ed. UFMT, v. 2, p. 35-51, 2006.

SILVA, Joyce Reis et al. Initial growth of Fabaceae species: Combined effects of topsoil and fertilizer application for mineland revegetation. **Flora**, v. 246, p. 109-117, 2018.

SOUZA, CAROLINE ALMEIDA et al. Serviços ambientais associados à recuperação de áreas degradadas por mineração: potencial para pagamento de serviços ambientais. **Ambiente & Sociedade**, v. 19, n. 2, p. 137-168, 2016

SKIRYCH, Aleksandra et al. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 653, 2014.

TATSCH, Etiane, et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical biochemistry**, 2011, 44.4: 348-350.

TIWARI, Shalini; LATA, Charu. Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: an overview. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 452, 2018.

VANEGAS-LEÓN, Mary Luz et al. Are Trechisporales ectomycorrhizal or non-mycorrhizal root endophytes?. **Mycological Progress**, v. 18, n. 9, p. 1231-1240, 2019.

VIEIRA, Caroline Krug et al. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. **Applied Soil Ecology**, v. 131, p. 55-65, 2018.

VINCENT, Regina de Castro; MEGURO, Marico. Influence of soil properties on the abundance of plant species in ferruginous rocky soils vegetation, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 31, n. 3, p. 377-388, 2008.

WANG, Peng et al. Shifts in microbial communities in soil, rhizosphere and roots of two major crop systems under elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15019, 2017.

ZAIN, Maryam; YASMIN, Sumera; HAFEEZ, Fouzia Yousaf. Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Antagonistic Bacteria from Cotton and Sugarcane Plants for Suppression of Phytopathogenic Fusarium Species. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, 2019.

ZHANG, Jiajie et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End read mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2014.

ZEPEDA, Alejandra Escobar; LEÓN, Arturo Vera Ponce De; FLORES, Alejandro Sanchez. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 348, 2015.