



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Efeito do carvão mineral na microbiota de dois diferentes tipos de solo do Município de
Candiota/RS

Acadêmica: Isis Ferreira Simões

Orientador: Dr.º Flávio Manoel Rodrigues da Silva Júnior

Co-orientadora: MSc. Lisiane Volcão

Monografia apresentada como
requisito da Disciplina de Trabalho
de Graduação II - 15125 - do Curso
de Bacharelado em
Ciências Biológicas.

Rio Grande, outubro de 2016.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a minha família, meu pai, minha mãe e minha irmã. Meus pais foram e são os principais incentivadores para eu estar onde eu estou, porque além de me apoiarem em tudo nunca mediram esforços para tornar possível a minha formação na universidade. Agradeço a minha irmã por ser minha amiga e especial para mim. Amo vocês intensamente! Dedico a vocês essa minha realização.

Ao meu orientador Flávio Rodrigues agradeço pela confiança e pela oportunidade oferecida para que eu pudesse desenvolver meu trabalho, pelo ensinamento e por todo apoio e ajuda nessa grande etapa da minha vida. Te agradeço também pela oportunidade de fazer parte do LEFT.

Á minha co-orientadora, amiga, psicóloga Lisiane Volcão, por toda a paciência, companheirismo e dedicação em todas as etapas do meu trabalho, desde o projeto até a construção final da monografia. Com certeza, sempre serei grata por ter te conhecido. És um grande exemplo para mim e uma pessoa muito especial. Te adoro!

Ao meu namorado Jeferson Mendes, que mais do que namorado é um grande amigo. Sempre serei grata por todo teu apoio emocional, companheirismo, carinho e a tua companhia que fez com que as coisas fossem mais fáceis pra mim. E com certeza, muito obrigada pela tua ajuda nas práticas de campo de baixo da chuva e auxílio no laboratório cedo da manhã. Gosto muito de ti! Obrigada por ser quem és para mim.

Aos meus amigos Henrique, Flávia, Paula, Jenifer, Dienefer e Lucas por escutarem meus desabafos e dramas emocionais e por sempre estarem presentes nos momentos mais felizes da minha vida também. Quem tem amigos tem TUDO!

Ao professor Eduardo Bernardi pela ajuda na identificação dos fungos, análise estatística e por ceder o laboratório para as práticas do meu estudo. Muito obrigada!

Ao professor Paulo Baish pela realização das análises químicas dos solos estudados no meu trabalho.

Á minha colega e amiga Thais Carneiro que mesmo estando também realizando a sua monografia não mediu esforços para me ajudar no laboratório. Obrigada!

Ao pessoal do laboratório de nanobiotecnologia Gustavo, Juliana e professora Cristina Dora pelo empréstimo de equipamento para análise de alguns resultados.

Aos técnicos Josencler da Fisiologia, e Clara da Limnologia que mesmo não tendo nada a ver com o trabalho me ajudaram muito. A técnica do meu laboratório Gianni Goulart por estar à disposição quando eu precisei. Obrigada!

Sumário

Lista de abreviaturas	1
RESUMO	2
SUMMARY	3
Introdução.....	4
Degradação Ambiental.....	5
Mineração de Carvão e Biorremediação de Resíduos	7
Micro-organismos do Solo	8
Justificativa.....	10
Objetivos	10
Objetivo Geral	10
MANUSCRITO	1
RESUMO	2
INTRODUÇÃO	3
MATERIAIS E MÉTODOS	6
Área de Estudo.....	6
Coleta do Material.....	6
Experimento.....	6
Contagem e identificação de bactérias.....	7
Contagem e identificação de fungos.....	8
Atividade Microbiana.....	8
Desidrogenase.....	9
RESULTADOS	9
Caracterização do substrato.....	9
Contagem total de micro-organismos.....	10
Diversidade de micro-organismos.....	10
Atividade enzimática.....	10
DISCUSSÃO	11
CONCLUSÃO	15
REFERÊNCIAS.....	15
TABELAS E FIGURAS.....	20
Tabela 1.....	20
Figura 1.....	20
Figura 2.....	21

Figura 3.....	21
Tabela 2.....	22
Tabela 3.....	22
Tabela 4.....	23
Considerações finais.....	23

Lista de abreviaturas

APC- Ágar para Contagem

BDA- Ágar Batata Dextrose

UFC/g – Unidades formadoras de colônias por grama de solo

PBS- Tampão fosfato salino

g – gramas

mL- mililitros

µl – microlitros

µm- micrómetro

Efeito do carvão mineral na microbiota de dois diferentes tipos de solo do Município de Candiota/RS

RESUMO

O solo é um ambiente muito complexo constituído de água, gases, material mineral e orgânico e seres vivos. Um dos processos que podem levar a grandes perdas de solo é o processo inadequado da deposição de rejeitos através da mineração, sendo a biorremediação um dos métodos para o tratamento de resíduos. A diversidade e a composição de comunidades microbianas podem ser utilizadas como bioindicadores ou mesmo como potenciais ferramentas para uma biorremediação destas áreas contaminadas. Devido a isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a reposta da microbiota de dois tipos de solos, diferentes em sua estrutura física, frente à exposição de carvão provenientes do município de Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil. O estudo foi realizado em dois locais considerados áreas referência no município denominados: Prainha e Aeroporto. Para cada solo foram coletadas amostras em 4 pontos aleatórios, a uma profundidade de 20cm, realizado em julho de 2016. O experimento *ex situ* foi montado a partir da contaminação das amostras com concentrações diferentes de carvão mineral. Controle dos solos da Prainha e do Aeroporto (0%, ou seja, 100g de solo puro), e o carvão diluído nestes solos nas seguintes concentrações: 1%, 3%, 10% e 30%; e 100% (100g de carvão mineral puro). Após 36 horas, foram feitas técnicas para contagem e identificação de microorganismos (fungos e bactérias) e avaliação da atividade microbiana através das enzimas Desidrogenase e Fosfatase alcalina. O solo Prainha a maior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/g) de solo bacteriana foi à concentração de 30% com 6×10^5 UFC/g e o Aeroporto a maior foi em 1% com 5×10^5 UFC/g. A contagem de fungos totais o solo Aeroporto foi 30% com $5,5 \times 10^4$ UFC/g e a Prainha em 1% com $2,6 \times 10^4$ UFC/g. Para a diversidade bacteriana os dois solos se mostraram semelhantes, não havendo ainda uma variação perceptível entre os diferentes tratamentos. Quando comparado as atividades das enzimas Desidrogenase e Fosfatase Alcalina para ambas o solo Aeroporto apresentou uma maior atividade. Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível concluir que o Solo Aeroporto apresentou uma melhor atividade enzimática, devido a isso seria a melhor escolha de solo para uma possível biorremediação.

Palavras chaves: bactérias, bioindicadores, enzimas, fungos, microbiota

Effect of coal on the microbiota of two different types of soil on the city of Candiota/RS

SUMMARY

Soil is a very complex environment consisting of water, gases, mineral and organic materials and living things. One of the processes that can lead to large soil losses is the inadequate process of tailings deposition through mining, with bioremediation being one of the methods for waste treatment. The diversity and composition of microbial communities can be used as bioindicators or even as potential tools for the bioremediation of these contaminated areas. Therefore, the present study had as objective to evaluate the microbial response of two types of soils, different in their physical structure, to the exposure of the coal of the city of Candiota, in Rio Grande do Sul. The study was carried out in two reference points considered in the municipality denominated: Prainha and Aeroporto. For each soil, samples were collected at 4 random points at a depth of 20 cm in July 2016. The *ex situ* experiment was set up from the contamination of samples with different concentrations of mineral coal. Control of Prainha and airport soils (0%, with 100g of pure soil) and diluted coal in these soils in the following concentrations: 1%, 3%, 10% and 30%; And 100% (100 g of pure mineral coal). After 36 hours, techniques were used to count and identify microorganisms (fungi and bacteria) and to evaluate the microbial activity through the enzymes Dehydrogenase and Alkaline Phosphatase. Prainha soil, the largest number of colony forming units (UFC/ g) of bacterial soil, was 30% with 6×10^5 UFC/ g and the largest airport was 1% 5×10^5 UFC/ g. The total fungal count on the Airport floor was 30% with 5.5×10^4 UFC / g and Prainha in 1% with 2.6×10^4 UFC/ g. For the bacterial diversity the two soils were similar, and there was still a remarkable variation between the different treatments. When comparing the activities of the enzymes Dehydrogenase and Alkaline Phosphatase for both soils of the Airport presented greater activity. Considering the results obtained in this work, it was possible to conclude that Solo Airport presented a better enzymatic activity, being the best soil choice for a possible bioremediation.

Key words: bacteria, bioindicators, enzymes, fungi, microbiota

Introdução

O solo caracteriza-se por ser um ambiente muito complexo e heterogêneo, possuindo uma grande biodiversidade (MOREIRA & SIQUEIRA 2006, MANHAES & FRANCELINO 2012), varia tanto na composição com relação à sua espessura, quanto em relação à quantidade e organização das partículas de que é composto, por exemplo, argila, silte e areia.

Somado a isso, há outras características referentes à composição do solo, como fertilidade, capacidade em suprir nutrientes, biodisponibilidade de água e nutrientes para o crescimento de plantas e organismos além da porosidade (COELHO *et al.* 2013). A sua porosidade é garantida através da quantidade e arranjo dos poros, o qual está relacionada com a parcela de espaços disponíveis para a ocupação de macro e micro-organismos (MOREIRA & SIQUEIRA 2006).

A formação do solo é devida a combinação de diversos fatores, desde o material de origem, clima, organismos, tipo de relevo até o tempo (LIMA *et al.* 2007, EMBRAPA 2006). O material de origem, os sedimentos e o material de decomposição de rochas transportadas são os instrumentos primários para a gênese do solo (COELHO *et al.* 2013). O clima é outra condição importante, pois em função disso, o solo apresenta propriedades e características diferenciadas devido à quantidade e distribuição das chuvas e sua percolação pelo solo (LIMA *et al.* 2007). Os organismos também são essenciais, pois são grandes fornecedores de matéria orgânica para esse ecossistema (COELHO *et al.* 2013), além disso a vegetação participa da proteção contra a erosão pela ação da fixação das raízes no solo, assim como suas folhas evitam o impacto direto da chuva. O relevo tem a função de condicionar a penetração de água e da insolação no solo, e com isso interferir na intensidade do intemperismo. Por fim, é necessário determinado tempo para atuação dos processos que levam à formação do solo. O tempo que um solo leva para se formar depende do tipo de rocha, do clima e do relevo (LIMA *et al.* 2007). Desta maneira, a partir de um material de origem, ou seja, a rocha, em que plantas e organismos não conseguiriam crescer e se desenvolver sem a ação desses fatores, os solos, se tornam ambientes sustentáveis para esses seres vivos (COELHO *et al.* 2013).

O perfil do solo é dado pela divisão do mesmo em camadas ou horizontes que podem ou não estar presentes em determinados tipos de solo e que variam quanto a cor, espessura, tipo de estrutura, textura, entre outros. Os horizontes estão divididos,

simplificadamente, em horizonte A, horizonte B e horizonte C. O horizonte A é a camada mais fértil, é rica em matéria orgânica e seres vivos (COELHO *et al.* 2013), segundo Lima *et al.* (2007), esse horizonte é a camada mais superficial do solo e a que mais sofre ou se beneficia com ações antrópicas e climáticas. O horizonte B, localizado abaixo do A, é mais espesso, podendo apresentar dezenas de metros e menos matéria orgânica do que o horizonte superior. O horizonte C, abaixo do horizonte B, está mais próximo da rocha que deu origem e por isso apresenta fragmentos da rocha em sua composição (COELHO *et al.* 2013).

O solo é um ecossistema muito importante, pois apresenta diversas funções sustentáveis como, por exemplo, para o crescimento das plantas, onde auxilia no suporte mecânico e serve de fonte de água e de nutrientes para as raízes (MOTTA & BARCELLOS 2007). É em função das características do solo que são determinados os tipos de vegetação existentes em determinada área e o destino da água na superfície da terra. A utilização da água, sua perda, contaminação e purificação são todas afetadas pelo solo. Além disso, o solo tem um papel importante na reciclagem de nutrientes, corpos de animais mortos e restos de plantas mortas. Porque, é através do solo que esses materiais são assimilados, reincorporados e convertidos em matéria orgânica ou húmus do solo (reciclagem), para que novas plantas e animais possam utiliza-los como fonte de energia (COELHO *et al.* 2013).

Degradação Ambiental

A degradação ambiental de acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA ocorre quando há uma modificação do ambiente que resulta em perda das características físicas, químicas e biológicas antes presentes no ambiente não degradado. Ou seja, quando há a perda da vegetação nativa e da fauna, quando a camada fértil do solo for perdida, e/ou quando a qualidade do sistema hídrico for alterada. (IBAMA 1990). Neste tipo de degradação, onde ocorre a perda da capacidade de adaptação devido às alterações das características do ecossistema, a recuperação pode não ocorrer ou ser extremamente lenta, requerendo então, a ação antrópica para se reestabelecer (SOUZA 2004).

É importante salientar que a degradação é resultante principalmente de ações antrópicas, como o desmatamento, que ocorre quando há a retirada da cobertura vegetal (RODRIGUES *et al.* 2007). A degradação do solo e a erosão ocorrem quando ocorre a

remoção de horizontes superficiais do solo (FAVARETTO & DIECKOW 2007), como por exemplo, em regiões que foram exploradas para a extração mineral. Estas áreas podem apresentar deterioração do solo onde podem ocorrer problemas como: aumento da densidade do solo, compactação, redução da taxa de infiltração, deficiência de oxigênio, aumento da resistência à penetração de raízes, diminuição da capacidade de armazenamento de água e do teor de matéria orgânica (MOREIRA 2004).

Um dos processos que podem levar a grandes perdas de solo é o processo inadequado da deposição de rejeitos, como os de carvão, que podem levar à contaminação das águas superficiais e do lençol freático e a alterações na atmosfera próxima as minas pela geração de poeira, e com isso podem surgir diversos problemas ambientais (SANTOS 2006). Todo o processo desde a extração, transporte e conversão de combustíveis fósseis são colocadas entre as maiores fontes de agressão ambiental (GOMES *et. al* 1998).

O carvão mineral, de origem fóssil, se forma a partir da decomposição da matéria orgânica, como por exemplo, restos de plantas durante milhões de anos sob determinadas condições de temperatura e pressão. Em sua composição há oxigênio, nitrogênio, átomos de carbono, enxofre, junto com outros elementos rochosos (como arenito, siltito, folhelhos e diamictitos) e minerais, como a pirita (ATLAS DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL 2008).

A atividade de mineração é muito importante economicamente (STUMPF 2011), pois ela tem papel na geração de empregos diretos e indiretos, na demanda por bens e serviços na região e também aumento da arrecadação tributária (ATLAS DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL 2008). No entanto, quando há a extração de mineral do solo ocorrem diversas modificações como, por exemplo, a perda da biodiversidade, interferência dos recursos hídricos, alteração da paisagem devido à escavação de grandes volumes de solo, e conseqüentemente a diminuição da fertilidade do solo. Nesse processo, a camada fértil do solo é removida o que causa um grande impacto nas populações microbianas deste local (MENDES 2004, NASCIMENTO 2015). Segundo Silva *et al* (2012), as modificações físicas no solo ocorrem porque envolve a retirada da vegetação pré-existente, dos horizontes superficiais e subsuperficiais, o que evidencia que esse tipo de processo provoca degradação ambiental.

A mineração de carvão pode ser feita a partir de lavra a céu aberto, onde a cobertura de solo que recobre as camadas de carvão é removida para a possível extração desse mineral (KOPPE & COSTA 2002). Esse processo causa a formação de cavas e

pilhas de solo, fazendo com que haja a inversão de camadas do solo e das rochas, onde há a mistura das mesmas deixando a composição estratigráfica das posições dos horizontes de maneira diferente do solo natural/original (KOPPE & COSTA 2008; STUMPF *et al.* 2014), impactando diferentes níveis biológicos. Desta maneira, caso a lavra não seja planejada de forma adequada, e não se tenha um plano definido de recuperação desse ambiente desde o início, haverá um grande impacto ambiental (KOPPE & COSTA 2002).

Mineração de Carvão e Biorremediação de Resíduos

No Rio Grande do Sul, a cidade de Candiota é considerada a região com os maiores depósitos de carvão do país, na qual utiliza o processo de minas a céu aberto onde são removidos os horizontes do solo (horizontes A, B, ou C) e camadas geológicas para a posterior extração do carvão mineral (STUMPF *et al.*, 2014). Esse processo resulta em um alto nível de compactação do novo perfil que é caracterizado pela presença de agregados de maior tamanho na camada subsuperficial, densidade alta, baixa porosidade total e uma relação desproporcional entre macro e microporos (NASCIMENTO 2015), na qual pode causar distúrbios nas comunidades biológicas daquele local.

A recuperação de áreas utilizadas pela mineração, deve tentar retornar o sítio degradado a uma forma de utilização de acordo com um plano preestabelecido para o uso do solo. Para isso, deve ser obtida uma condição estável do solo em conformidade com os valores ambientais, estéticos e sociais dos ambientes próximos (IBAMA 1990). As principais medidas adotadas referem-se à recuperação do solo e destinação de resíduos sólidos (ATLAS DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL 2008).

Um dos métodos para o tratamento de resíduos é a remediação de áreas contaminadas (CORRÊA *et al.* 2005), que pode ser obtida através da técnica de biorremediação que é um processo biotecnológico no qual se utiliza o metabolismo de micro-organismos para a eliminação rápida de compostos tóxicos em ambientes degradados. O principal objetivo é reduzir as concentrações do poluente a níveis aceitáveis, os transformando em compostos de baixa toxicidade (YAKUBU 2007; BENTO *et al.* 2003). O uso de microrganismos do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação natural) e a adição de

agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio são consideradas estratégias que auxiliam na biorremediação (BENTO *et al.* 2003).

A biorremediação é um processo biotecnológico no qual utiliza o metabolismo de micro-organismos para a eliminação rápida de compostos tóxicos em ambientes degradados a fim de reduzir as concentrações do poluente a níveis aceitáveis, os transformando em compostos de baixa toxicidade (YAKUBU 2007; BENTO *et al.* 2003). A biorremediação *ex situ*, ocorre quando há a necessidade de remoção do solo ou efluente do local contaminado para que os mesmos sejam tratados em outro local. Essa medida se torna necessária se houver a possibilidade de contaminação do ambiente próximo do solo ou das pessoas que ali habitam. (BOOPATHY 2000). Ou *in situ*, quando não há a remoção de material contaminado, ou seja, o tratamento é realizado no ambiente onde ocorreu a contaminação. Desta maneira, se evitam custos e impactos ambientais associados com o movimento de solos e águas de um local contaminado para outros locais destinados ao tratamento (MARIANO, 2006).

Micro-organismos do Solo

O solo é composto por diversos seres vivos, como os micro-organismos e animais invertebrados que apresentam uma grande variedade de metabolismos, tamanho e funções (MANHAES & FRANCELINO 2012). A biota do solo pode ser classificada em micro-organismos, meso e macrofauna (MOREIRA & SIQUEIRA 2006). Os micro-organismos estão amplamente distribuídos no solo ocupando vários nichos ecológicos, dentre eles há uma grande presença de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e diversos outros (COELHO *et al.* 2013).

A biomassa microbiana do solo é a porção viva da matéria orgânica (KASHUCK 2009), composta por bactérias e fungos, os quais representam cerca de 90% da atividade microbiana do solo (ANDREOLA & FERNANDES 2007). Porém, a biomassa pode ser afetada de acordo com a disponibilidade e tipo de substrato orgânico e fatores abióticos, como temperatura, umidade e aeração, mineralogia do solo. Além disso, a presença de micro-organismos antagonistas, parasitas e predadores e metais pesados ao solo também podem causar diminuição na biomassa (FRANCHINI *et al.* 2007).

A diversidade e a composição de comunidades microbianas podem ser utilizadas como bioindicadores do reestabelecimento de interações biológicas na comunidade,

bem como da restauração da função de ecossistemas degradados (HOLT & MILLER 2011). Isto acontece porque os micro-organismos possuem alta capacidade de contribuir na redução da degradação ambiental, através de seus efeitos benéficos na conservação do solo e da vegetação, além da redução do uso de agroquímicos como fertilizantes e pesticidas. Os solos que possuem baixa atividade biológica são os que sofrem maiores perdas por erosão (SIQUEIRA *et al.* 1994). É importante salientar ainda, que a distribuição e especificidade da microbiota do solo estão também associadas com a composição de nutrientes presentes no substrato e com a presença de compostos inibitórios (PIMENTA *et al.* 2009).

As principais atividades dos micro-organismos do solo são: decomposição da matéria orgânica, realizada principalmente pela ação enzimática de fungos, bactérias e actinobactérias (CORREIA & OLIVEIRA 2000), ciclagem de nutrientes e energia, fixação do nitrogênio atmosférico, produção de compostos complexos que causam a agregação do solo, decomposição de xenobióticos (MOREIRA & SIQUEIRA 2006) e produção de substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento (ANDREOLA & FERNANDES 2007). Além disso, os fungos, por exemplo, formam associações simbióticas com as raízes das plantas, a rizosfera, atuando no controle biológico de patógenos, influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação e agregação do solo (LEITE & ARAÚJO 2007).

As bactérias, organismos pertencentes ao Reino Monera (PFENNING 2013), são seres procariotos, unicelulares, definidos como células isoladas ou em associações simples, porém podem formar colônias (MANHAES & FRANCELINO 2012). As bactérias podem ser identificadas a partir da caracterização morfológica que pode ser feita através da composição da parede celular que difere em Gram-positivas e Gram negativas. Nas Gram-positivas há uma camada grossa de peptidoglicano que confere rigidez à parede celular, enquanto que as Gram-negativas há uma camada de peptidoglicano de espessura fina que fica situada cima do espaço periplasmático entre a membrana externa (MOREIRA & SIQUEIRA 2006). Outra forma de classificação é quanto à forma como cocos, bacilos ou espirilos, e arranjo isoladas, como formações de correntes e entre outros (MANHAES & FRANCELINO 2012).

Os fungos são organismos que pertencem ao Reino Fungi, são eucariotos, heterotróficos e produtores de exoenzimas e enzimas que são liberadas no substrato, onde tem como função a digestão de nutrientes, assimilando-os posteriormente em forma de compostos mais simples. Além disso, possuem a parede celular composta por

quitina e tem a formação de esporos como principal estrutura reprodutiva (PEFNING 2013). Esses micro-organismos representam 70 a 80% da biomassa microbiana do solo, sendo os fungos filamentosos mais encontrados no solo os pertencentes aos gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* (MOREIRA & SIQUEIRA 2006). Os fungos do solo tem a capacidade de interagir com as plantas através de associações patogênicas ou associações benéficas com as raízes das plantas superiores, formando as micorrizas. (KLEIN & PASCHKE 2004). Esses micro-organismos possuem estruturas conhecidas como hifas, responsáveis pela aquisição de energia, somado a isto, produzem esporos, que são levados pelo ar e correntes de água, os quais tem como função dispersão e reprodução celular (PEFNING 2013). A classificação e identificação dos fungos são feita a partir das características morfológicas das hifas, corpos de frutificação, esporos e seus ciclos de vida (MOREIRA & SIQUEIRA 2006).

É devido à sua grande abundância, atividade biológica e metabólica e rápida resposta às mudanças no ambiente, que os micro-organismos se tornam promissores para uso na avaliação da qualidade do solo e bons indicadores da qualidade do mesmo, podendo ser utilizados em estudos de degradação ambiental (MANHAES & FRANCELINO 2012).

Justificativa

Sabendo da importância dos micro-organismos como bioindicadores de qualidade ambiental do solo, a utilização de técnicas que avaliem a biodiversidade e a atividade microbiana são métodos sensíveis para detecção de alterações no mesmo. Desta maneira, se tornam úteis para avaliação de um cenário de degradação ambiental por carvão mineral, além de poder indicar o melhor tipo de técnica para uma possível biorremediação.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a resposta da microbiota de dois tipos de solos, frente à exposição de diferentes concentrações de carvão mineral provenientes do município de Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil.

Objetivos Específicos

- Quantificação e identificação bacteriana das amostras de solo coletadas de cada área pesquisada exposta a diferentes concentrações de carvão mineral;
- Quantificação e identificação dos fungos presentes nas amostras expostas a diferentes concentrações de carvão mineral;
- Determinação da atividade microbiana presente no solo através de testes enzimáticos das amostras analisadas;
- Análise comparativa das repostas apresentadas pelos diferentes solos estudados provenientes de Candiota –RS.
- Identificar dentre as amostras de solo analisadas qual possui melhor desempenho microbiana para um processo de biorremediação.

MANUSCRITO
REVISTA – PEDOSPHERE

Efeito do carvão mineral na microbiota de dois diferentes tipos de solo do Município de
Candiota/RS

Simões, S. F.¹; Volcão, L.M.²; da Silva Jr., F.M.R.³

Filiação

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Estudos Farmacológicos e Toxicológicos

² Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Estudos Farmacológicos e Toxicológicos

³ Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Estudos Farmacológicos e Toxicológicos

Autor correspondente: Isis Ferreira Simões; is.-simoes@hotmail.com ,feminino, 20/08/1994, Graduação, Universidade Federal do Rio Grande, Brasil.

Efeito do carvão mineral na microbiota de dois diferentes tipos de solo do Município de
Candiota/RS

RESUMO

O solo é um ecossistema muito heterogêneo constituído de água, gases, material mineral e orgânico e seres vivos. As grandes perdas de solo são causadas, principalmente, pelo processo de mineração pela alta quantidade de rejeitos. A biorremediação é um dos métodos eficazes para o tratamento de resíduos. A diversidade e a composição dos micro-organismos podem ser utilizadas como bioindicadores de qualidade ambiental. Devido a isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a reposta da microbiota de dois tipos de solos, frente à exposição de carvão provenientes do município de Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil. O estudo foi realizado em dois locais Prainha e Aeroporto. Para cada solo foram coletadas amostras em 4 pontos aleatórios, a uma profundidade de 20cm, realizado em julho de 2016. O experimento *ex situ* foi montado a partir da contaminação das amostras com concentrações diferentes de carvão mineral. Controle dos solos da Prainha e do Aeroporto (0%, ou seja, 100g de solo puro), e o carvão diluído nestes solos nas seguintes concentrações: 1%, 3%, 10% e 30%; e 100%(100g de carvão mineral puro). Após 36 horas, foram feitas técnicas para contagem e identificação de microorganismos (fungos e bactérias) e avaliação da atividade microbiana através das enzimas Desidrogenase e Fosfatase alcalina. O solo Prainha a maior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/g) de solo bacteriana foi à concentração de 30% com 6×10^5 UFC/g e o Aeroporto a maior foi em 1 % 5×10^5 UFC/g. A contagem de fungos totais o solo Aeroporto foi 30% com $5,5 \times 10^4$ UFC/g e a Prainha em 1% com $2,6 \times 10^4$ UFC/g. Para a diversidade bacteriana os dois solos se mostraram semelhantes, não havendo ainda uma variação perceptível entre os diferentes tratamentos. Quando comparado as atividades das enzimas Desidrogenase e Fosfatase Alcalina para ambas o solo Aeroporto apresentou uma maior atividade. Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível concluir que o Solo Aeroporto apresentou uma melhor atividade enzimática, devido a isso seria a melhor escolha de solo para uma possível biorremediação.

Palavras chaves: micro-organismos, bioindicadores, desidrogenase, fosfatase alcalin

1 **INTRODUÇÃO**

2 O solo é um ambiente que possui alta complexidade e heterogeneidade, o qual
3 caracteriza-se por ser muito diverso em relação aos organismos que o habitam (Moreira
4 e Siqueira, 2002; Manhaes e Francelino, 2012). Possui ampla variedade de composição
5 com relação à sua espessura e em relação à quantidade e organização das partículas de
6 que é composto. Além disso, há outras características referentes à composição do solo,
7 como fertilidade, capacidade em suprir nutrientes, biodisponibilidade de água e
8 nutrientes para o crescimento de plantas e organismos, além da porosidade (Coelho *et*
9 *al.*, 2013).

10 A combinação de diversos fatores desde o material de origem do solo, clima,
11 organismos presentes, tipo de relevo e até o tempo, são responsáveis pela sua formação
12 (Lima *et al.*, 2007; Embrapa, 2006). Desta forma, a partir de um material de origem, ou
13 seja, a rocha, em que plantas e organismos não conseguiriam crescer e se desenvolver
14 sem a ação desses fatores, os solos, se torna ambiente sustentável para esses seres vivos
15 (Coelho *et al.* 2013).

16 O solo é dividido em camadas ou horizontes, podendo ou não estar presentes em
17 determinados tipos de solo e que variam quanto á cor, espessura, tipo de estrutura,
18 textura, entre outros fatores. Os horizontes estão divididos, simplificadamente, em
19 horizonte A, horizonte B e horizonte C. O horizonte A é a camada mais fértil, é rica em
20 matéria orgânica e seres vivos (Coelho *et al.*, 2013), e a principal para o entendimento
21 da qualidade ambiental.

22 A degradação do solo e a erosão ocorrem quando há a remoção de horizontes
23 superficiais do solo (Favaretto e Dieckow, 2007), como por exemplo, em regiões que
24 foram exploradas para a extração mineral. A degradação ambiental de acordo com o
25 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA,

26 ocorre quando há uma modificação do ambiente que resulta em perdas das
27 características físicas, químicas e biológicas antes presentes no ambiente não degradado
28 (Ibama, 1990). É importante salientar que a degradação é resultante principalmente de
29 ações antrópicas (Rodrigues *et al.*, 2007). Um dos processos que podem levar a grandes
30 perdas de solo é o processo inadequado da deposição de rejeitos, como os de carvão
31 mineral, os quais podem levar à contaminação de águas superficiais e do lençol freático,
32 além de alterações na atmosfera próxima as minas pela geração de poeira, e com isso o
33 surgimento de diversos problemas ambientais (Santos, 2006).

34 Economicamente a atividade de mineração é muito importante (Stumpf, 2011),
35 pois auxilia a geração de empregos diretos e indiretos, a demanda por bens e serviços na
36 região e também o aumento da arrecadação tributária (Atlas de energia elétrica do
37 Brasil, 2008). No entanto, quando há a extração de mineral do solo ocorrem diversas
38 modificações como, por exemplo, a perda da biodiversidade, pois a camada fértil do
39 solo é removida causando um grande impacto nas populações microbianas deste local
40 (Mendes, 2004; Nascimento, 2015). A cidade de Candiota, localizada no estado do Rio
41 Grande do Sul é considerada a região com os maiores depósitos de carvão do país, na
42 qual utiliza o processo de minas a céu aberto onde são removidos os horizontes do solo
43 (horizontes A, B ou C) e camadas geológicas para a posterior extração do carvão
44 mineral (Stumpf *et al.*, 2013). Fazendo com que esse processo cause distúrbios nas
45 comunidades biológicas daquele local.

46 A recuperação de áreas utilizadas pela mineração deve tentar retornar o sítio
47 degradado a uma forma de utilização de acordo com um plano preestabelecido para o
48 uso do solo (Ibama, 1990). As principais medidas adotadas referem-se à recuperação do
49 solo e destinação de resíduos sólidos (Atlas de energia elétrica do Brasil, 2008).

50 A biorremediação é um processo biotecnológico no qual utiliza o metabolismo
51 de micro-organismos para a eliminação rápida de compostos tóxicos em ambientes
52 degradados a fim de reduzir as concentrações do poluente a níveis aceitáveis, o
53 transformado em compostos de baixa toxicidade (Yakubu, 2007; Bento *et al.*, 2003). A
54 biorremediação *ex situ*, ocorre quando há a necessidade de remoção do solo ou efluente
55 do local contaminado para que os mesmos sejam tratados em outro local. Essa medida
56 se torna necessária se houver a possibilidade de contaminação do ambiente próximo do
57 solo ou das pessoas que ali habitam. (Boopathy, 2000). Ou *in situ*, quando não há a
58 remoção de material contaminado, ou seja, o tratamento é realizado no ambiente onde
59 ocorreu a contaminação. Desta maneira, se evitam custos e impactos ambientais
60 associados com o movimento de solos e águas de um local contaminado para outros
61 locais destinados ao tratamento (Mariano, 2006).

62 A diversidade e a composição de comunidades microbianas podem ser utilizadas
63 como bioindicadores do reestabelecimento de interações biológicas na comunidade,
64 bem como da restauração da função de ecossistemas degradados (Holt & Miller, 2011).
65 Estes estão amplamente distribuídos no solo ocupando vários nichos ecológicos, dentre
66 eles há uma grande presença de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e diversos
67 outros (Coelho *et al.*, 2013). É devido à sua grande abundância, atividade biológica e
68 metabólica e por responderem muito rápido às mudanças no ambiente, que os micro-
69 organismos se tornam promissores para uso na avaliação da qualidade do solo e bons
70 indicadores da qualidade do mesmo, podendo serem utilizados em estudos de
71 degradação ambiental (Manhaes e Francelino, 2012). Devido a isso, objetivo desse
72 trabalho foi avaliar a reposta da microbiota de dois tipos de solos, distintos em sua
73 estrutura física, frente à exposição de diferentes concentrações de carvão mineral
74 proveniente do município de Candiota, Rio Grande do Sul, Brasil.

75 **MATERIAIS E MÉTODOS**

76 **Área de Estudo.** O estudo foi realizado em dois locais considerados áreas referência no
77 município de Candiota, RS – Brasil, sendo eles o ponto conhecido como Prainha e o
78 outro ponto o Aeroporto, contendo solos de composição e estruturas distintas.

79 **Coleta do Material.** As amostras de solo foram coletadas em 11 de julho de 2016. Duas
80 áreas de amostragem foram selecionadas, e a coleta realizada em 4 pontos aleatórios, a
81 uma profundidade de até 20 centímetros com auxílio de um trado e uma pá. As amostras
82 de solo foram identificadas de acordo com o local de coleta sendo elas: “Prainha” e
83 “Aeroporto” e após, foram levadas ao Laboratório de Ensaios Farmacológicos e
84 Toxicológicos do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio
85 Grande – FURG. No laboratório, cascalhos, pedras e materiais de plantas foram
86 removidos. As quatro subamostras, provenientes de pontos aleatórios, foram
87 homogeneizadas a fim de formar uma única amostra composta de cada uma das áreas.
88 Ao final da coleta, cerca de 500 g a 1 kg de superfície do solo foi recolhido, colocados
89 em um recipiente de plástico previamente esterilizado e protegido contra a
90 luz, e mantido a temperatura ambiente (36°C) durante o transporte até o momento do
91 preparo do experimento.

92 **Experimento.** Para a montagem do experimento foi utilizado os dois tipos de solo
93 coletado, além de uma amostra de carvão mineral concedida pela Companhia Rio
94 Grandense de Mineração – CRM do município de Candiota. A realização do
95 experimento foi feita a partir da mistura do solo com carvão que foi previamente
96 triturado com o auxílio de um cadinho e pistilo. A partir disso, o teste foi dividido em 4
97 tratamentos para cada uma das duas amostras de solo e mais os controles de cada solo e
98 o controle do carvão puro. Os tratamentos foram distribuídos da seguinte forma:
99 Controle dos solos da Prainha e do Aeroporto 0% (100g de solo sem adição de carvão

100 mineral em pó); 1% (99g de solo + 1g de carvão em pó); 3% (97g + 3g de carvão
101 mineral em pó); 10% (90g de solo + 10g de carvão mineral em pó); 30% (70g de solo +
102 30g de carvão mineral em pó); e 100% (100g carvão mineral em pó) sendo então o
103 controle do carvão mineral. As amostras de cada solo (Prainha e Aeroporto) e o carvão
104 triturado foram pesadas com o auxílio de uma balança e os solos foram colocados em
105 recipientes transparentes de plásticos previamente esterilizados de acordo com os seus
106 tratamentos. Após isso, os recipientes ficaram mantidos em temperatura ambiente com
107 luminosidade ambiente perto de uma janela pelo período escolhido de aproximadamente
108 36 horas. Logo após este período foram separadas 50 g de cada amostra em tubos *falcon*
109 para posteriores as análises enzimáticas, esses tubos foram armazenados em um freezer
110 -20°C para que a atividade enzimática não fosse alterada. O restante das amostras,
111 aproximadamente 50 g, foi separado para as análises de contagem e identificação de
112 micro-organismos, essas amostras foram transportadas em caixas de isopor para o
113 laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do
114 Instituto de Biologia-UFPel.

115 **Caracterização dos Substratos.** No Laboratório de Oceanografia Geológica – FURG
116 as amostras foram secas a temperaturas de 40°C e posteriormente desagregadas e
117 maceradas. Os metais foram analisados a partir da extração ácida em forno de micro-
118 ondas (USEPA, 2007) e a dosagem foi realizada através dos métodos tradicionais de
119 espectrofotometria de Absorção Atômica por chama (ar-acetileno) em um aparelho
120 GBC modelo 932 AA.

121 **Contagem e identificação de bactérias.** A contagem de bactérias aeróbias facultativas
122 e estritas foi feita através do método de diluições em placas (Vermelho et al., 2006),
123 onde 25 g de cada amostra foi adicionada à 225 mL de água peptonada (diluente), e a
124 partir desta foram realizadas diluições decimais sucessivas até 10^{-6} , e posteriormente

125 plaqueamento em superfície (com 0,1 mL de cada diluição) em placas de petri contendo
126 o meio Ágar para Contagem (APC), na qual foram incubadas a 37°C por 24h. Posterior
127 esse período verificou-se o crescimento de colônias bacterianas nas placas e a posterior
128 contagem das colônias. As colônias bacterianas usadas na contagem foram submaetidas
129 a coloração de Gram com a finalidade de identificação de forma, arranjo e coloração a
130 partir das características da parede celular.

131 **Contagem e identificação de fungos.** O isolamento de fungos presentes no solo foi
132 obtido a partir de 25 gramas de cada amostra adicionada à 225mL de água peptonada
133 (diluyente), e a partir desta foram realizadas diluições decimais até 10^{-6} , logo 0,1mL
134 destas diluições foram semeadas em duplicadas em meio Ágar Batata Dextrose (BDA)
135 acidificado (pH 5,0) com ácido tartárico 10%, estas foram incubadas a 25°C por um
136 período de 7 dias (Vermelho et al., 2006). Após esse período foi realizada a contagem
137 das colônias de fungos filamentosos presentes em cada tratamento. Para a identificação
138 a nível de gênero das colônias, foi utilizada a técnica de montagem de lâmina rápida
139 com fita adesiva, coradas com lactofenol azul de Amann, e as estruturas visualizadas em
140 microscópio óptico, sendo identificadas através do auxílio de chaves de identificação
141 (Barnett e Hunter, 1972; Ellis, 1971; Funder, 1968; Singh *et al.* 1991).

142 **Atividade Microbiana.** A atividade microbiana foi estabelecida através da
143 determinação da atividade de duas enzimas: fosfatase alcalina e desidrogenase, sendo
144 elas uma enzima extracelular e a outra intracelular respectivamente. Todos os
145 experimentos relacionados à atividade enzimática foram realizados no Laboratório de
146 Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos- FURG.

147 **Fosfatase alcalina.** Para a retirada da enzima do solo foi utilizado 1g de solo
148 adicionado em 5 ml de tampão fostato (pH 7,4) e agitado (Rani et al. 2004). O solo
149 suspenso foi filtrado através de uma gaze, e o produto foi centrifugado por 10 minutos a

150 5000 rpm a fim de obter o sobrenadante. Para determinar a atividade enzimática da
151 fosfatase alcalina foi utilizado o kit de Fostase Alcalina (Labtest[®]), que tem como
152 princípio hidrolisar a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, obtendo a
153 coloração azul em meio alcalino. A cor formada é diretamente proporcional à atividade
154 enzimática que foi medida por espectrofotômetro em um comprimento de onda de 590
155 nm. O produto final da reação se constituiu de uma mistura de cor azul e a cor própria
156 do substrato.

157 **Desidrogenase.** No teste da atividade de desidrogenase, foi utilizado 1g de solo
158 peneirado de cada tratamento colocado em um tubo de ensaio. Posteriormente foi
159 adicionado ao solo 1 mL de 2, 3, 5- trifenil- cloreto de tetrazólio a 3% e agitado
160 emvórtex. Após 96h de incubação a 27°C, foram adicionados 10 mL de etanol em cada
161 tubo e agitou-se no vórtex durante 30 segundos. Os tubos foram incubados novamente,
162 durante 1h, a fim de permitir que o solo em suspensão assentasse. O sobrenadante, cerca
163 de 250 µl, foi cuidadosamente transferido para uma placa de microtitulação de 96
164 poços. A absorbância do líquido foi lida a 485 nm em espectrofotômetro, onde foi
165 analisada a conversão do cloreto de tetrazólio pela desidrogenase em cristais de
166 formazan (Tabatabai, 1982).

167 A análise de dados dos testes enzimáticos foi feita através do Sistema para análise e
168 separação de médias em experimentos agrícolas pelo método de Duncan (Cantari,
169 2001).

170 **RESULTADOS**

171 **Caracterização do substrato.** De acordo com a tabela 1, podemos observar que para as
172 concentrações de metais o solo do Aeroporto se mostrou com maior quantidade em
173 todos metais analisados.

174 **Contagem total de micro-organismos.** No solo Prainha a maior contagem UFC/g de
175 solo bacteriana foi na concentração de 30% com 6×10^5 UFC/g e no Aeroporto a maior
176 foi em 1 % com 5×10^5 UFC/g (figura 1). Porém, em relação à contagem de fungos
177 totais no Aeroporto houve a maior contagem em 30% com $5,5 \times 10^4$ UFC/g e a Prainha
178 na concentração de 1% com a contagem de $2,6 \times 10^4$ UFC/g, observados na figura 2. A
179 contagem de bactérias nos dois solos foi maior do que a contagem de fungos, porque
180 para bactérias houve crescimento até a diluição de 10^5 e para fungos na diluição de 10^4 ,
181 demonstrando que havia mais bactérias presentes no solo do que fungos.

182 **Diversidade de micro-organismos.** Para a diversidade bacteriana os dois solos se
183 mostraram semelhantes, não havendo ainda uma variação perceptível entre os diferentes
184 tratamentos. É possível notar, também na tabela 2, que em todas as concentrações nos
185 dois tipos de solo houve a presença marcante de bactérias gram positivas em maior
186 quantidade que as gram negativas, além de a presença de bactérias esporuladas em
187 praticamente todas as amostras. A maior diversidade de gêneros fúngico para o solo da
188 Prainha foi encontrado nas concentrações 3% e 10% segundo a tabela 3. O solo do
189 Aeroporto teve a maior diversidade fúngica na concentração de 0% de carvão, ou seja,
190 no tratamento onde havia apenas solo sem adição do carvão mineral e na concentração
191 de 10%, de acordo com a tabela 3. Porém, essa maior diversidade fúngica não é tão
192 significativa tendo em vista que foi um ou dois gêneros fúngicos a mais encontrado em
193 cada tratamento.

194 **Atividade enzimática.** A atividade enzimática da fosfatase alcalina, embora no
195 tratamento controle (0%) o solo Prainha tenha apresentado uma melhor atividade dessa
196 enzima, na medida que foram aumentando as concentrações de carvão o solo aeroporto se
197 demonstrou melhor. Obteve-se o valor de 3,0085 μm no tratamento com 10% de carvão
198 no solo Aeroporto sendo maior em relação ao solo Prainha que na mesma concentração

199 de carvão na qual esse valor foi de 0,5668 μm , além de que para a concentração de 30%
200 o solo aeroporto também apresentou melhor atividade enzimática para a fosfatase
201 alcalina com valores de 3,7498 μm , enquanto que a Prainha apresentou valor menor de
202 1,9185 μm . Para a atividade da Desidrogenase o solo Aeroporto se mostrou com maior
203 atividade do que o solo Prainha, tanto na contração de 0% com valores de 0,3724 μm
204 para o solo Aeroporto e 0,2564 μm para o solo Prainha, quanto nas concentrações com
205 adição de carvão como 3% onde apresentou resultados significativos, de acordo com a
206 tabela 4.

207 **DISCUSSÃO.** A contagem de microorganismos dos solos em placas de petri
208 demonstrou apenas uma fração da comunidade real existente nos dois tipos de solo. Isso
209 ocorre porque existem diversos microorganismos que não são cultiváveis, estima-se
210 que, de toda a diversidade de microrganismos do solo apenas 0,1 a 1% destes sejam
211 cultiváveis (He et al., 2007), portanto, não estão inclusas nesse valor de contagem.
212 Segundo Roesch *et al.* (2007), variações como a quantidade de nutrientes em cada
213 ambientes, influencia a diversidade de nichos para suportar as populações microbianas.
214 Um exemplo disso são os distúrbios do solo como a mineração que afetam as
215 comunidades microbianas, pois modificam a quantidade de nutrientes disponível. Isto
216 pode estar relacionado com a contagem de micro-organismos para o solo da Prainha que
217 se demonstrou diferente em comparação com o solo Aeroporto, onde no primeiro a
218 maior contagem fúngica foi obtida no tratamento 1% e a bacteriana no tratamento 30%,
219 ou seja, pela variação de quantidade de nutrientes em cada solo. Provavelmente, isso
220 pode ter ocorrido pelo processo de competição por recurso entre bactérias e fungos. Nas
221 quais alguns micro-organismos possuem o crescimento mais rápido, como, por
222 exemplo, as bactérias que privam a quantidade de nutrientes disponíveis para que outros
223 pudessem utilizar. Devido a isso, na concentração de 30% cresceu mais bactérias do que

224 fungos. Além disso, o solo Prainha é um solo visualmente mais arenoso e com menos
225 matéria orgânica (embora esse dado não tenha sido avaliado), e essas características
226 podem estar relacionadas com as maneiras diferentes que as bactérias e fungos
227 responderam em relação aos tipos de solo avaliados. Tendo em vista que, o solo
228 Aeroporto era um solo visualmente mais argiloso e com maior quantidade de matéria
229 orgânica.

230 Quando há o processo de mineração, compostos ácidos são liberados no solo, esse
231 processo pode levar a proliferação de alguns micro-organismos como os fungos os quais
232 tem seu crescimento favorecido pelo ambiente ácido (De-Quadros, 2013). Este fator ter
233 influência nos resultados obtidos para o crescimento de microorganismos do solo
234 Aeroporto onde o crescimento de colônias bacterianas foi maior em 1% porque foi o
235 tratamento onde possivelmente não modificou muito o pH. Enquanto que para as
236 colônias fúngicas a concentração 30% favoreceu o crescimento devido a possível
237 modificação do pH do solo, porém o pH do solo não foi medido. O solo aeroporto
238 apresentou uma correlação forte e positiva entre a concentração de carvão e o número
239 total de unidades formadoras de colônias fúngicas com $R= 0,85761$ (Figura 3.), o que
240 demonstra que o carvão parece que teve uma influência no crescimento desses micro-
241 organismos.

242 A maior biodiversidade microbiológica do solo é composta principalmente por
243 bactérias, fator esse observado no presente estudo onde a contagem bacteriana total
244 presente nos dois solos foi maior do que a contagem de fungos (Moreira e Siqueira,
245 2006). Pode-se observar que em ambos os solos e concentrações houve a presença
246 predominante de bactérias gram positivas, além de a presença de bactérias esporuladas
247 em praticamente todas as amostras. A diversidade total da maioria das bactérias no solo
248 é principalmente composta por Gram positivas, cerca de 93%, enquanto que as Gram-

249 negativas representam o restante cerca de 7% (Silva *et al.*, 2005). A alta diversidade de
250 Gram Positivas pode estar relacionada com a maior espessura da parede celular que
251 confere maior resistência aos estresses (Moreira e Siqueira, 2006). Nos solos é comum a
252 presença de esporos e endósporos devido à exposição constante a variações ambientais,
253 incluindo a escassez de nutrientes. Também há formação de esporos quando há presença
254 de agentes químicos ou contaminação, pois estes são extremamente resistentes e
255 formados para que a informação genética seja conservada. Além disso, podem
256 permanecer dormentes e viáveis por milhares de anos (De- Quadros, 2013). No presente
257 estudo foi encontrada a presença de esporos nos dois solos e em todos seus respectivos
258 tratamentos os tratamentos.

259 Os fungos filamentosos mais encontrados no solo são os pertencentes ao gênero *Mucor*,
260 *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e
261 *Alternaria* (Moreira e Siqueira; 2006), os gêneros de fungos encontrados nos cultivos
262 dos dois solos se enquadram nesse perfil, exceto pela presença de *Cunninghamella*,
263 *Gliocladium*, *Cladosporium*, *Mycelia sterilia*, *Paecilomyces* e *Gliocladium* que foram
264 identificados nos solos estudados, mas que também são considerados fungos
265 característicos de solo, porém não mencionados por esse autor.

266 A diversidade fúngica para ambos os solos, quando em contato com o carvão
267 (tratamentos 3%, 10% e 30%), se manteve similar com exceção na variação em alguns
268 gêneros. Por exemplo, o gênero *Verticillium* e *Paecilomyces* foi encontrado apenas no
269 solo da Prainha, enquanto que *Cladosporium*, *Cunninghamella* e *Aspergillus* foram
270 encontrados somente nos solos Aeroporto.

271 Alguns gêneros fúngicos estão presentes em quase todas as concentrações, isto pode
272 estar relacionado a fato deste grupo ser capaz de se adaptar facilmente a diferentes

273 fontes de carbono e nitrogênio, fazendo com que consigam permanecer nas diferentes
274 concentrações de carvão (Luna, 2013).

275 Silva-Júnior (2007) realizou um estudo avaliando a tolerância das colônias fúngicas ao
276 nitrato de chumbo e sugeriu que fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Thielavia*, *Penicillium*
277 e *Chaetomium* podem ser considerados tolerantes a presença de metais pesados. Esses
278 resultados corroboram com os resultados obtidos no presente estudo que utilizou o
279 carvão mineral, no qual o solo Praia nas concentrações de 1%, 3%, 10%, 30% houve o
280 crescimento de *Penicillium*. E no solo aeroporto em 3% e 10% houve o crescimento de
281 *Penicillium* e na concentração de 30% o crescimento de *Aspergillus*.

282 A atividade da fosfatase alcalina comparando os dois solos controles, ou seja,
283 concentração de 0% se mostrou maior na Prainha, porém quando as concentrações de
284 carvão se elevaram e atingiram níveis de 10% e 30% os componentes presentes no solo
285 do Aeroporto apresentaram uma melhor atividade dessa enzima. Isso pode ter ocorrido
286 porque alterações nos compostos químicos presentes no solo podem modificar os níveis
287 de atividade da fosfatase (Dick *et al.*, 1994).

288 Foi observado que nas concentrações de 10% e 30% de carvão mineral a atividade
289 enzimática do solo Aeroporto para a fosfatase alcalina foi maior comparado com o solo
290 Prainha. Isto pode estar relacionado com o fato de que solo com baixa quantidade de
291 argila (visualmente o solo Prainha) a adsorção da fosfatase diminui (Notaro, 2012).

292 Quando comparado o controle do solo Aeroporto com o controle do solo Prainha para a
293 atividade enzimática da Desidrogenase, pode-se observar que o primeiro apresentou
294 uma melhor atividade enzimática (tabela 6), que está associada com a atividade
295 metabólica dos micro-organismos (Melo, 2012). Com os dados analisados apenas solos
296 com tratamentos 3% diferem entre si. Esses resultados corroboram estudos que
297 relacionaram o fracionamento físico do solo e observaram que a incidência da atividade

298 da desidrogenase foi maior em solos com diâmetros menores de 50 um, ou seja, em
299 solos mais compactos como do Aeroporto (Moreira e Siqueira, 2006).

300 **CONCLUSÃO.** Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, foi possível concluir que
301 o Solo Aeroporto apresentou uma melhor atividade enzimática. Este teve uma melhor
302 resposta frente a exposição ao carvão, quando analisadas ambas às enzimas, devido a
303 isso seria a melhor escolha de solo para uma possível biorremediação. Já para a
304 biodiversidade dos micro-organismos o solo Aeroporto se manteve similar ao solo
305 Prainha. Então, o solo aeroporto seria a melhor escolha para fornecer inóculos para
306 possível biorremediação.

307 **REFERÊNCIAS**

308 Atlas de energia elétrica do Brasil. 2008. Agência Nacional de Energia Elétrica. 3. ed. –
309 Brasília

310 Barnett, H L e Hunter, B B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota:
311 Burgess Publishing Company. 241 p.

312 Correia, M.E.F, Oliveira, L.C. 2000. Fauna de solo: aspectos gerais e metodológicos.
313 Documento Técnico No. 112. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Brasil

314 Coelho, R M, Fidalgo C E, Santos, G H, Brefin, S M L M, Pérez, V D. 2013. Solos:
315 tipos, suas funções no ambiente, como se formam e sua relação com o crescimento das
316 plantas. Lavras: Ed. UFLA, Cap. 3: 47-41 p.

317 Canteri, M G, Althaus, R A, Virgens, F J S, Giglioti, E A, Godoy, C. V. 2001. SASM -
318 Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos
319 métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. Revista Brasileira de Agrocomputação, V.1,
320 N.2, p.18-24

321 Da-Silva, D C V, Tiago, P V, De-Mattos, J L S, Paiva, L M, Souza-Motta, C M. 2011.
322 Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do

323 Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas
324 hidrolíticas. *Revista Brasil. Bot.*, V.34, n.4, p.607-610

325 De-Quadros, D P. 2013. Diversidade e composição de comunidades microbianas de
326 solos contruídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas. Tese de doutorado.

327 Dick, R P, Sandor, J A, Eash, N S. 1994. Soil enzyme activities after 1500 years of
328 terrace agriculture in the Colca Valley. Peru. *Agric. Ecosystems Environs.*, 50:123-
329 131.

330 Ellis, M B. 1971. *Dematieaceous hyphomycetes*. Kew: Commonwealth Mycological
331 Institute. 608p.

332 Embrapa. 2006. Sistema Brasileiro de classificação de solos. Brasília, CNPS. 26p.

333 Gomes, A P, Ferreira, J A F, De-Albuquerque, L F, Suffert, T. 1998. Carvão fóssil.
334 *Estud. av.* [online].

335 Funder, S. 1968. *Practical mycology: Manual for identification of fungi*. New York:
336 Hafner. 140p.

337 He, Z L, Gentry, T J, Schadt, C W; Wu, L, Liebich, J, Chong, S C, Huang, Z, Wu, W,
338 Gu, B, Jardine, P, Criddle, C, Zhou, J. 2007. GeoChip: a comprehensive microarray for
339 investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *Isme Journal*,
340 Geneva, v.1, p. 67-77.

341 Holt, E A, Miller, R W. 2011. Bioindicators: using organisms to measure environmental
342 impacts. *Nature Education Knowledge*, New York, v. 3, n. 10, p.8.

343 Lima, V C, Lima M R. 2007. *Formação do solo*. Universidade Federal do Paraná.
344 Departamento de Solos e Engenharia Agrícola. Curitiba: Departamento de Solos e
345 Engenharia Agrícola.

346 Favaretto, N, Dieckow, J. 2007. Conservação dos recursos naturais solo e água.
347 Universidade Federal do Paraná. Departamento de Solos e Engenharia Agrícola.
348 Curitiba: Departamento de Solos e Engenharia Agrícola. Cap. 10, p. 121-126

349 Ibama. 1990. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
350 Renováveis. Manual de Recuperação de áreas degradadas pela mineração. Brasília:
351 IBAMA. 96p.

352 Manhaes, C M C, Francelino, F M A. 2012. Biota do solo e suas relações ecológicas
353 com o sistema radicular.

354 Melo, W J, Melo, G M P, Ademir, S F A, Melo, V P. 2012. Avaliação de atividade
355 enzimática no solo. Biotecnologia aplicada á agricultura 2ª edição. Brasília- DF

356 Mendes F, Furtado P. 2004. Potencial de reabilitação do solo de uma área
357 Degradada, através da revegetação e do manejo microbiano. 89f. Tese
358 (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São
359 Paulo. Piracicaba.

360 Moreira, P R. 2004. Manejo do solo e recomposição da vegetação com vistas a
361 recuperação de áreas degradadas pela extração de bauxita, Poços de Caldas, MG. Tese
362 (Doutorado) – Universidade Estadual de São Paulo. Rio Claro.

363 Moreira, F M S, Siqueira, J O. 2006. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras:
364 Editora UFLA.

365 Motta, A C V, Barcellos, M. 2007. Funções do solo no meio ambiente. cap. 9 100p.

366 Nascimento, F M F, Mendonça R M G, Macedo, M I F, Soares P S M. 2002. Impactos
367 ambientais nos recursos hídricos da exploração de carvão em santa Catarina. In:
368 congresso brasileiro de mina a céu aberto, 1.; congresso brasileiro de mina subterrânea,
369 2., Belo Horizonte.

370 Nascimento, J V R A. 2015. Atributos físicos e químicos de áreas degradadas pela
371 mineração de Scheelita na região tropical semiárida. Natal – RN

372 Notaro, K A. 2012. Prospecção de fitopatógenos e caracterização e solos arenosos
373 envolvidos na supressividade ou condutividade da podridão radicular da mandioca,
374 causada por *scytalidium lignicola*. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
375 Dissertação.

376 Pinotti, M Z, Santos, J C P, Klauberg, F O, Michelluti, D J, Castro, D R L. 2011.
377 Isolamento de Fungos de Solo Associados a culturas de Amora, Framboesa e Mirtilo no
378 sul do Brasil. Revista Brasileira de Agroecologia. Rev. Bras. de Agroecologia. 6(1): 67-
379 80 (2011) ISSN: 1980-9735

380 Rani, P, Meena, U K, Karthikeyan, J. 2004. Evaluation of Antioxidant Properties of
381 Berries. Indian Journal of Clinical Biochemistry, Cap. 19: 103-110 p.

382 Roesch, L F, Fulthorpe, R R, Riva, A, Casella, G, Hadwin, A K, Kent, A D. 2007.
383 Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. Isme Journal, Geneva,
384 v. 1, p. 283-290.

385 Rodrigues, G B, Maltoni, K L, Cassiolato, A M R. 2007. Dinâmica da regeneração do
386 subsolo de áreas degradadas dentro do bioma Cerrado. Revista Brasileira de Engenharia
387 Agrícola e Ambiental, v.11, n.1, p.73-80.

388 Santos, D C. 2006. Alterações químicas e biológicas em solo de área de mineração de
389 carvão submetido a diferentes cultivos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.
390 Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos)- 97f.

391 Silva Júnior, F M R, e Pereira, S V. 2007. Ecologia e fisiologia de fungos filamentosos
392 isolados de solo contaminado por metais pesados. Revista Brasileira de Biociências,
393 Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 903-905.

394 Silva, P, Carneiro, A M M, Carloni, M C, Medeiros, M I C, Silva, J O, Reche, S H C,
395 Errera, M C, Neme, S N. 2005. Isolamento, caracterização e resistência a
396 antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de
397 amostras de solo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 64(2): 245-251.

398 Sinch, K, Frisvad, J C, Thrane, U, Mathur, S B. 1991. An illustrated manual on
399 identification of some seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins,
400 Hellerup: Danish Government Institute of Seed Pathology and Department of
401 Biotechnology. 133p.

402 Souza, M N. 2004. Degradação e recuperação ambiental e desenvolvimento sustentável.
403 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

404 Stumpf, L. 2011. Atributos físicos e mecânicos de um solo construído em area de
405 mineração de carvão em Candiota-RS, cultivado com diferentes espécies vegetais.
406 Dissertação - Pelotas.

407 Stumpf, L, Pauletto, A E, Fernandes, F F, Suzuki, S S A E, Silva, S T, Pinto, S F L,
408 Rodrigues, L C. 2013. Perennial grasses for recovery of the aggregation capacity of
409 reconstructed soil in a coal mining area in southern Brazil.

410 Tabatai, M A. 1982. Soil Enzymes, Dehydrogenases.

411 Usepa. 2007. Method 3051A – microwave assisted acid digestion of sediments, soils,
412 and oils. 3051A – 19, Revision 1, 30p.

413 Vermelho, B A, Pereira, F A, Coelho, R R R, Padrón, S T. 2006. Práticas de
414 microbiologia

415

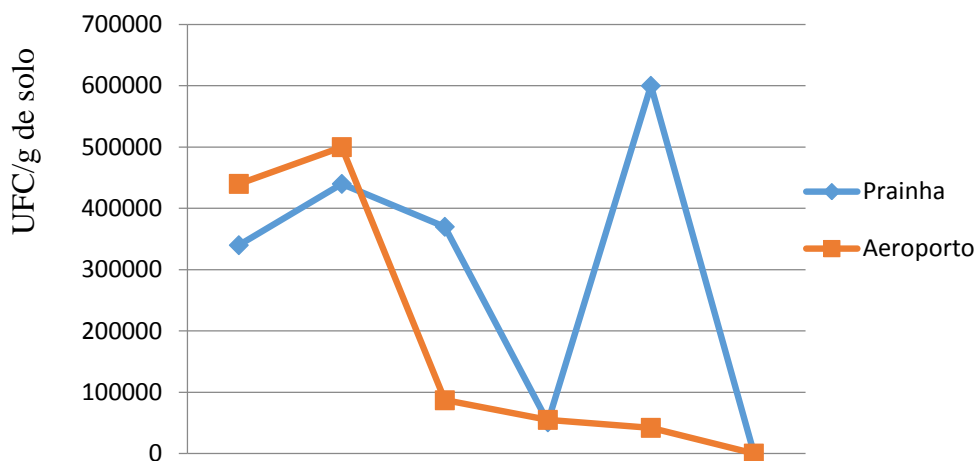
416 **TABELAS E FIGURAS**

417 **Tabela 1.** Caracterização dos dois solos Aeroporto e Prainha analisados a partir da
 418 concentração de metais.

Metal (concentração)	Local	
	Aeroporto	Prainha
Cd (µg/Kg)	18,434	3,312
Cu (mg/Kg)	7,462	0,054
Pb (mg/Kg)	21,465	1,025
Zn (mg/Kg)	30,768	10,101
Mn (mg/Kg)	741,835	71,631
Fe (mg/Kg)	38223,665	5200,986
As (µg/Kg)	6358,313	1507,729

419

420

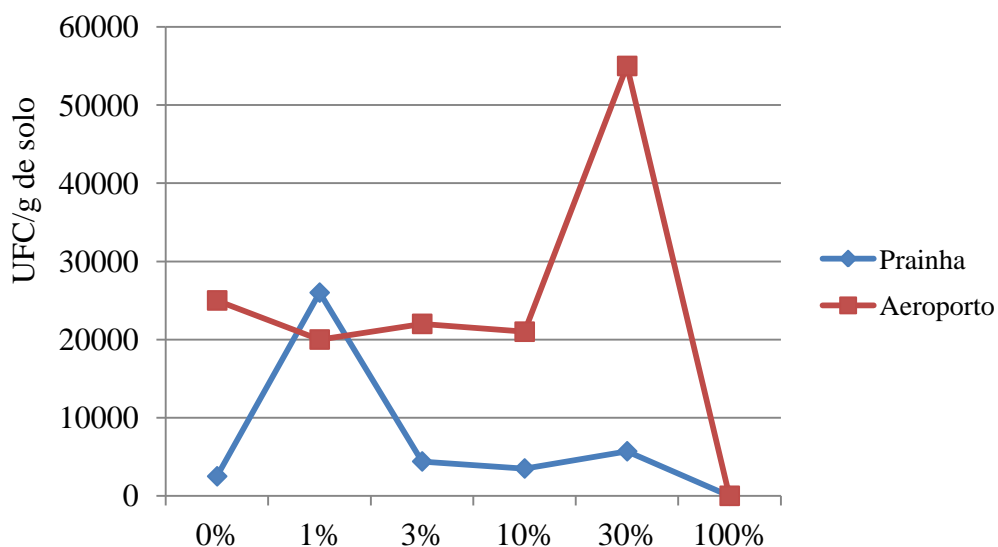


421

422

423 **Figura 1.** Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias facultativas em unidades
 424 formadoras de colônias por gramas de solo (UFC/g de solo) nos solos Praia e Aeroporto
 425 de Candiota/RS expostos a diferentes concentrações de carvão mineral.

426



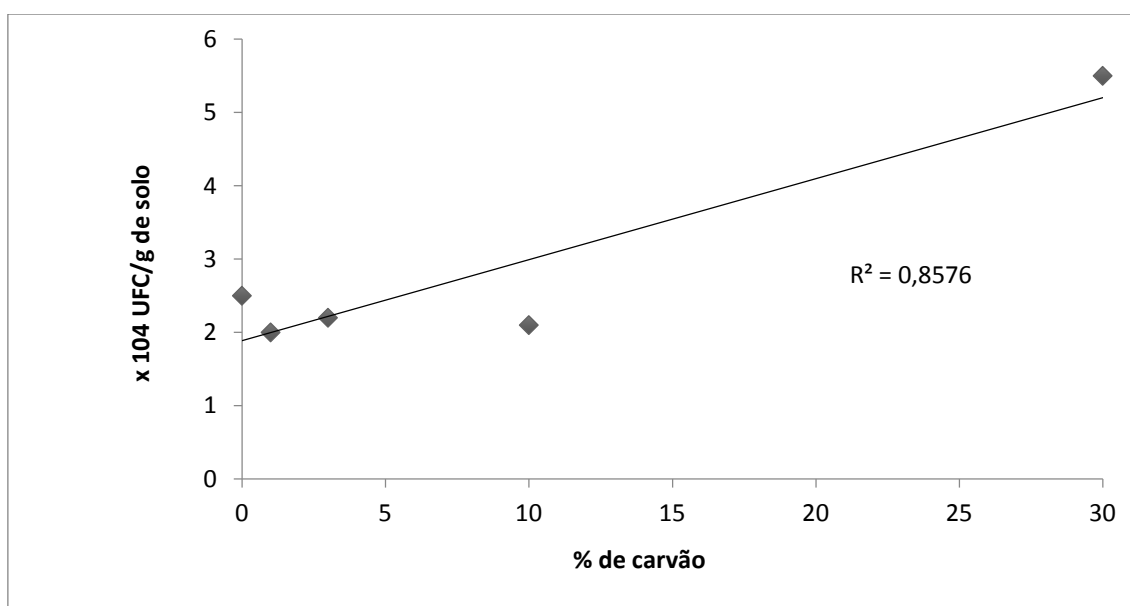
427

428

429 **Figura 2.** Contagem total de fungos por unidades formadoras de colônia por gramas de
 430 solo (UFC/g de solo) nos solos Praia e Aeroporto de Candiota/RS expostos a diferentes
 431 concentrações de carvão mineral.

432

433



434

435

436 **Figura 3.** Correlação entre as diferentes concentrações de carvão mineral e o
 437 crescimento total de colônias fúngicas no solo Aeroporto.

438

439

440 **Tabela 2.** Diversidade bacteriana no solo Praia e Aeroporto, analisada de acordo com a
 441 morfologia, arranjo e característica da coloração de Gram positiva (+) e Gram Negativa
 442 (-) de suas colônias.

Praia 0%	Praia 1%	Praia 3%	Praia 10%	Praia 30%
cocobacilo (-)	Esporos	endósporos (+)	bacilos isolados (-)	esporos
bacilos isolados (+)	endósporos (+)	bacilos isolados (-)	bacilos isolados (+)	bacilos isolados (-)
estreptobacilos (+)	bacilos isolados (-)	bacilos isolados (+)	estreptobacilos (+)	cocos (+)
endósporos (+)	estreptobacilos (+)	estreptobacilos (+)		estreptobacilos (+)
	bacilos isolados (+)	Esporos		endósporos (+)
				bacilos isolados (+)
Aeroporto 0%	Aeroporto 1%	Aeroporto 3%	Aeroporto 10%	Aeroporto 30%
estreptobacilos (+)	estreptobacilos (+)	endósporos (+)	estreptobacilos (+)	estreptobacilos (+)
bacilos isolados (+)	bacilos isolados (-)	Esporos	endósporos (+)	endósporos (+)
endósporos (+)	cocobacilo (-)	bacilos isolados (-)	esporos	esporos
Esporos	endósporos (+)	estreptobacilos (+)	bacilos isolados (-)	bacilos isolados (-)
bacilos isolados (-)			bacilos isolados (+)	bacilos isolados (+)

443

444 **Tabela 3.** Diversidade das colônias fúngicas no solo Praianha e Aeroporto classificadas
 445 em nível de gênero.

Praia 0%	Praia 1%	Praia 3%	Praia 10%	Praia 30%
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Giocladium</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Mycelia sterilia*</i>	<i>Paecilomyces</i>	<i>Mycelia sterilia*</i>	<i>Mycelia sterilia*</i>	<i>Mycelia sterilia*</i>
		<i>Trichoderma</i>	<i>Giocladium</i>	
		<i>Gliocladium</i>	<i>Verticilium</i>	
Aeroporto 0%	Aeroporto 1%	Aeroporto 3%	Aeroporto 10%	Aeroporto 30%
<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Penicilium</i>	<i>Penicilium</i>	<i>Mycelia sterilia</i>
<i>Penicilium</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i>	
<i>Trichoderma</i>			<i>Cunninghamella</i>	

446

447

448

449

450

451

452

453 **Tabela 4.** Concentração em μm (micrómetro) das enzimas Fosfatase Alcalina e
 454 Desidrogenase presentes nos solos Aeroporto e Prainha nos diferentes tratamentos.

Tratamentos - Porcentagem de Carvão	Fosfatase Alcalina (μm)	Desidrogenase (μm)
Aeroporto 0%	0,9592ef	0,3724b
Aeroporto 1%	0,3138ab	0,281def
Aeroporto 3%	2,3109bcd	0,3810b
Aeroporto 10%	3,0085abc	0,3310c
Aeroporto 30%	3,7498 ^a	0,3160cd
Prainha 0%	2,0492cd	0,2564f
Prainha 1%	2,3109bcd	0,2740ef
Prainha 3%	2,1364cd	0,2927ef
Prainha 10%	0,5668f	0,3124cd
Prainha 30%	1,7879de	0,3330c
100% de Carvão	1,9185cde	0,4244 ^a

455

456

457 **Considerações finais**

458 Através da análise dos resultados obtidos no presente estudo e de pesquisas
 459 encontradas na literatura, as quais contribuíram para a execução deste trabalho, a ideia
 460 de que micro-organismos presentes em diferentes solos podem responder de maneiras
 461 distintas diante de uma contaminação por carvão mineral foi comprovada.

462 Esses resultados são promissores para a biorremediação de áreas degradadas por
 463 atividade de extração do carvão mineral a partir de inóculos provenientes de um solo do
 464 mesmo município que faz a extração, ou seja, a cidade de Candiota.

Referências bibliográficas

ATLAS DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL. Atlas de energia elétrica do Brasil / Agência Nacional de Energia Elétrica. 3. ed. – Brasília: Aneel, 2008.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil, *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34 (Supl.1), p. 65-68, 2003.

BOOKER, R.S., PAYLOSTATHIS, S.G. Microbial reductive dechlorination of hexachloro-1, 3- butadiene in a methanogenic enrichment culture. *Water Research* 34: (18) 4437–4445. 2000.

CORREIA, M.E.F. e OLIVEIRA, L.C. Fauna de solo: aspectos gerais e metodológicos. Documento Técnico No. 112. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Brasil. 2000

COELHO, R. M.; FIDALGO, C. E.; SANTOS, G. H.; BREFIN, S. M. L. M.; PÉREZ, V. D. Solos: tipos, suas funções no ambiente, como se formam e sua relação com o crescimento das plantas. Lavras: Ed. UFLA, Cap. 3: 47-41 p. 2013.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de classificação de solos. Brasília, CNPS.. 26p. 2006

FRANCHINI, J. C. et al. M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various soil management and crop rotation systems in Southern Brazil. *Soil Tillage Res.*, v. 92, n. 1/2, p. 18-29, 2007.

GOMES, A.P.; FERREIRA, J.A.F.; DE-ALBUQUERQUE, L. F.; SUFFERT, T. Carvão fóssil. *Estud. av.* [online]. 1998.

HOLT, E.A.; MILLER, R.W. Bioindicators: using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*, New York, v. 3, n. 10, p.8, 2011.

KLEIN, D.A.; PASCHKE, M.W. Filamentous Fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. *Microbial Ecology*, 47: 224–235. 2004

KOPPE, J.C. & COSTA, J.F.C.L. A lavra de carvão e o meio ambiente em Santa Catarina. In: Carvão Brasileiro: tecnologia e meio ambiente (eds. Soares PSM, Santos MDC & Possa MV). CETEM Rio de Janeiro, pp. 25-35. 2008

KOPPE, J.C. & COSTA, J.F.C.L. Mineração. In: TEIXEISRA, E. C. Meio Ambiente e Carvão: Impactos da exploração e utilização. Porto Alegre: FEPAM. cap. 1, p. 15-28. 2002

KASCHUK,G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA; M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. 2009

LIMA, V. C.; LIMA M. R. Formação do solo . Universidade Federal do Paraná. Departamento de Solos e Engenharia Agrícola. Curitiba: Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, 2007

FAVARETTO, N.; DIECKOW, J. Conservação dos recursos naturais solo e água. Universidade Federal do Paraná. Departamento de Solos e Engenharia Agrícola. Curitiba: Departamento de Solos e Engenharia Agrícola. Cap. 10, p. 121-126. 2007.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Manual de Recuperação de áreas degradadas pela mineração. Brasília: IBAMA. 96p. 1990

MANHAES, C.M.C.; FRANCELINO, F.M.A. Biota do solo e suas relações ecológicas com o sistema radicular. 2012

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 147 f. 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MENDES F., Paulo Furtado. Potencial de reabilitação do solo de uma área

degradada, através da revegetação e do manejo microbiano. 89f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2004

MOREIRA, P. R. Manejo do solo e recomposição da vegetação com vistas a recuperação de áreas degradadas pela extração de bauxita, Poços de Caldas, MG. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de São Paulo. Rio Claro, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Editora UFLA. 2006

MOTTA, A. C. V.; BARCELLOS, M. Funções do solo no meio ambiente. cap. 9 100p. 2007

NASCIMENTO, F.M.F. *et al.* 2002. Impactos ambientais nos recursos hídricos da exploração de carvão em Santa Catarina. In: congresso brasileiro de mina a céu aberto, 1.; congresso brasileiro de mina subterrânea, 2., Belo Horizonte, 2002

NASCIMENTO, J. V. R. A.; Atributos físicos e químicos de áreas degradadas pela mineração de Scheelita na região tropical semiárida. Natal – RN. 2015

PIMENTA, R.S. *et al.* Yeast communities in two Atlantic rain Forest fragments in Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.40, n.5, p.90-35, Feb. 2009.

PFENNING, H. L.; Fungos do solo. Lavras: Ed. UFLA, Cap. 14: 273-283. 2013.

RODRIGUES, G.B.; MALTONI, K.L.; CASSIOLATO, A.M.R. Dinâmica da regeneração do subsolo de áreas degradadas dentro do bioma Cerrado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.11, n.1, p.73-80, 2007.

SANTOS, D. C. Alterações químicas e biológicas em solo de área de mineração de carvão submetido a diferentes cultivos. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. 2006.

SIQUEIRA, O.J.; MOREIRA, S.M.F.; GRISI, M.B.; ARAUJO, S.R..Microorganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva Ambiental. Brasília, DF. 11p. 1994.

SILVA, F. C.; ARAÚJO, S. L. J.; SILVA R. M. E.; PEREIRA, G. M.; FREITAS M. S. M.; JÚNIOR, S. J. O.; MARTINS, A. M. Fungos micorrizicos arbusculares e proteína do solo relacionada com à glomalina em área degradada por extração de argila e revegetada com eucalipto e acácia. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 22, n. 4, p. 749-761, out.-dez., 2012.

SOUZA, M. N. Degradação e recuperação ambiental e desenvolvimento sustentável. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

STUMPF, L. Atributos físicos e mecânicos de um solo construído em área de mineração de carvão em Candiota-RS, cultivado com diferentes espécies vegetais. Dissertação - Pelotas, 2011

STUMPF, L.; PAULETTO, A. E.; FERNANDES, F. F.; SUZUKI, S. S. A. E.; SILVA, S. T. PINTO, S. F. L.; RODRIGUES, L. C. Perennial grasses for recovery of the aggregation capacity of reconstructed soil in a coal mining area in southern Brazil. 2013.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, Nigeria, v. 6, n. 24, p. 2735-2739, Dec. 2007.