

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE HUMANIDADES, CIÊNCIAS E EDUCAÇÃO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

ROGER BITENCOURT VARELA

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO DE ÁREAS EM
REABILITAÇÃO PELA ATIVIDADE CARBONÍFERA NO MUNICÍPIO DE TREVISÓ,
SANTA CATARINA**

**CRICIÚMA
2012**

ROGER BITENCOURT VARELA

**CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO DE ÁREAS EM
REABILITAÇÃO PELA ATIVIDADE CARBONÍFERA NO MUNICÍPIO DE TREVISÓ,
SANTA CATARINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas no curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Prof. Msc. Claudio Ricken
Co-orientador: Msc. Jader Lima Pereira

**CRICIÚMA
2012**

ROGER BITENCOURT VARELA

CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO DE ÁREAS EM REABILITAÇÃO PELA ATIVIDADE CARBONÍFERA NO MUNICÍPIO DE TREVISÓ, SANTA CATARINA

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com Linha de pesquisa em Microbiologia Ambiental.

Criciúma, 03 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Claudio Ricken – Mestre em Biologia Animal – (UNESC) - Orientador

Prof^a. Nadja Zim Alexandre – Mestre em Geografia – (UNESC)

Prof^a. Raquel Piletti – Mestre em Engenharia Química – (UNESC)

Dedico esse trabalho à minha família, meus amigos e colegas de trabalho, especialmente aos meus pais, pelo apoio, conselhos e ensinamentos sem os quais não seria possível a realização deste e nenhum outro trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Msc. Claudio Ricken, que muito mais que uma das referências que vou levar para minha vida profissional, um exemplo de parceria e amizade. Muito obrigado pelas orientações, muitas vezes fora de hora, e principalmente pela confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador Msc. Jader Lima Pereira, por atender prontamente aos incansáveis questionamentos e fornecer toda base para a realização desse trabalho.

Aos amigos Fernanda Francielli Nascimento, Victor Hugo Cordova e Samuel Elias pela ajuda nos campos e coletas. Seria quase impossível fazer esse trabalho sozinho. Muito obrigado pela ajuda.

Aos amigos da turma, Ritiele, Julianas e Karine, pela parceria durante todo o curso, pelas ajudas, não só no TCC, mas em todas as outras disciplinas, pelas conversas, troca de experiências e objetivos. Vocês tornaram esses quatro anos muito mais fáceis e agradáveis. Tenho certeza que todos serão grandes profissionais no futuro.

A todo pessoal do laboratório, especialmente a Samira, Amandinha e Camila que me incentivaram a fazer pesquisa. Muito obrigado, o apoio de vocês foi imprescindível na minha escolha.

Aos meus irmãos Richard e Renan pelo apoio e ajuda sempre quando necessários.

E, finalmente, aos meus pais Claudionor e Fátima, que são minha fonte de inspiração e energia. Tudo que fizer durante toda minha vida profissional será dedicado a eles, pois sem a base que tive e sem os ensinamentos que formaram meu caráter não seria possível alcançar todas as coisas que alcancei até hoje. Palavras são poucas para descrever o quão sou agradecido a vocês. Muito obrigado!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

O solo é considerado um crítico componente da biosfera, funcionando não somente como base para a produção de alimentos e fibra, mas também na manutenção da qualidade do ambiente local, regional e global. A mineração de carvão a céu aberto foi uma das principais formas de degradação ambiental na região sul de Santa Catarina, conhecida como região carbonífera. A utilização de medidas da atividade de micro-organismos para o monitoramento da qualidade do solo tem sido estudada pelo fato dos micro-organismos e as propriedades físico-químicas do solo estarem intimamente interligados. O presente estudo objetivou trazer novas abordagens para o monitoramento da qualidade dos solos por meio da utilização de parâmetros de fácil manipulação. Em uma área que sofreu degradação pela atividade carbonífera no município de Treviso, SC, foram coletadas em duas épocas do ano, amostras de quatro estações amostrais com diferentes características. Para a caracterização da comunidade microbiana, foram realizadas análises para quantificação de bolores e leveduras e bactérias heterotróficas, dois testes para quantificação da biomassa do solo, e análise dos parâmetros físico-químicos do solo de cada estação amostral. Os métodos de quantificação de biomassa microbiana não se mostraram eficientes para os solos estudados. Os parâmetros físico-químicos e UFC de bolores e leveduras mostraram uma semelhança entre o solo do remanescente florestal e reabilitação de quatro anos. Os solos com vegetação espontânea e reabilitação de dois anos apresentaram um padrão semelhante entre si. Os micro-organismos heterotróficos apresentaram um padrão de distribuição entre as duas amostragens, mostrando que são menos variáveis e podem apresentar resultados mais confiáveis sobre a qualidade do solo no presente estudo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa de Localização do campo Morozini no município de Treviso – SC. .	18
Figura 2- Localização das Estações amostrais no Campo Morozini, município de Treviso, SC.....	19
Figura 3- Interior do remanescente florestal localizado no Campo Morozini, município de Treviso, SC.....	20
Figura 4- Fragmento de vegetação espontânea sobre pilha se estéreis no Campo Morozini, município de Treviso, SC.....	21
Figura 5- Área em processo de reabilitação há 4 anos localizada no Campo Morozini, município de Treviso, SC.....	22
Figura 6- Área em processo de reabilitação há 2 anos localizada no Campo Morozini, município de Treviso, SC.....	23
Figura 7- Amostras de solo sendo coletada e acondicionada em saco plástico.....	24
Figura 8- Subamostra de solo sendo pesada em balança de precisão.....	26
Figura 9- Dessecador contendo as subamostras de solo, clorofórmio e água destilada.....	26
Figura 10- Amostras de solo e substancia extratora na mesa agitadora.....	29
Figura 11- Solução de amostras de solo na centrífuga.....	30
Figura 12- Soluções das amostras centrifugadas sendo filtradas em filtro de papel.	30
Figura 13- Solução extratora pipetadas nos tubos de ensaio.....	31
Figura 14- Solução da amostra no espectrofotômetro.....	32
Figura 15- Pesagem das amostras de solo para análises e Unidades formadoras de colônias.....	33
Figura 16- Solução da amostra de solo sendo homogeneizada.....	34
Figura 17- Preparação das diferentes diluições da amostra.....	35
Figura 18- Tubo de ensaio com diluição da amostra sendo homogeneizado.....	35
Figura 19- Espalhamento do inóculo nas placas.....	37
Figura 20- Contagem de unidades formadoras de colônias de bolores e leveduras em contador de colônia.....	37
Figura 21- Ágar sendo vertido nas placas de Petri inoculadas com solução do solo.....	38
Figura 22- Porcentagem de biomassa microbiana no solo das diferentes estações amostrais localizadas no campo Morozini, município de Treviso, SC.....	43
Figura 23- Valores obtidos em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo) para populações de bolores e leveduras em solos do campo Morozini no município de Treviso, SC.....	45
Figura 24- Mapa-gráfico de pluviosidade do estado de Santa Catarina nos meses de abril e agosto.....	46
Figura 25- Valores obtidos em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo) para populações de heterotróficos em solos do campo Morozini no município de Treviso, SC.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atributos físicos e químicos do solo do Campo Morozini, município de Treviso - SC.	40
---------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	16
2 MATERIAS E MÉTODOS	17
2.1 ÁREA DE ESTUDO	17
2.1.1 Estação Amostral 01 - Remanescente florestal	19
2.1.2 Estação Amostral 02 - Fragmento com vegetação espontânea	20
2.1.3 Estação Amostral 03 - Área recuperada mais antiga	21
2.1.4 Estação Amostral 04 – Área recuperada mais recente	22
2.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	23
2.3 QUANTIFICAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E INCUBAÇÃO	24
2.3.1 Preparo e fumigação das amostras para análise da biomassa microbiana	25
2.3.2 Incubação das amostras	27
2.3.3 Análise e quantificação da concentração de Carbono	27
2.4 QUANTIFICAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E EXTRAÇÃO	27
2.4.1 Preparo e fumigação das amostras para análise da biomassa microbiana	28
2.4.2 Extração de Carbono	28
2.4.3 Análise da concentração de carbono	31
2.4.4 Quantificação da biomassa microbiana através da concentração de carbono	32
2.5. CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA.....	33
2.5.1 Contagem de bolores e leveduras	33
2.5.2 Contagem de bactérias heterotróficas	38
2.5 ATRIBUTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DOS SOLOS	39
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1 ATRIBUTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO	40

3.2 BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E INCUBAÇÃO	42
3.2 BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E EXTRAÇÃO.....	43
3.3 UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS	44
3.3.1 Bolores e Leveduras	44
3.3.2 Heterotróficos	48
4 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

O solo é considerado um crítico componente da biosfera, funcionando não somente como base para a produção de alimentos e fibra, mas também na manutenção da qualidade do ambiente local, regional e global (GLANZ, 1995).

Em florestas tropicais, como a Mata Atlântica, a importância do solo se dá principalmente pelo sequestro de carbono, manutenção da estrutura física, capacidade de retenção de água e provisão de nutrientes para plantas. O solo da mata atlântica possui a maior biodiversidade de micro-organismos quando comparado aos solos que ocorrem em latitudes maiores, podendo conter cerca de 1000 espécies de invertebrados e um grande número de micro-organismos (MOREIRA; HUISING; BIGNELL, 2010).

A qualidade do solo pode ser definida como a capacidade contínua de aceitar, estocar e reciclar água, nutrientes e energia, bem como reter, dispersar e transformar materiais químicos e biológicos, funcionando como um tampão ou filtro ambiental. Quaisquer fatores que alterem essas características poderá causar impacto aos solos (JAHNEL et al., 2007 apud FONTANA, 2010).

A lei Nº 14.675 (SANTA CATARINA, 2009) descreve impacto ambiental como:

Qualquer alteração das propriedades físico-químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam a saúde, a segurança e o bem estar da população, as atividades sociais e econômicas, a biota, as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente.

Dessa forma pode-se entender que o solo pode ser alterado de diversas formas pelas atividades antrópicas realizadas sobre o mesmo. Segundo Melloni (2007) cada atividade gera uma alteração diferente, como o cultivo, mineração e resíduos industriais, e para avaliar a qualidade do solo nos diversos sistemas podem ser utilizados atributos físicos, químicos e biológicos.

O município de Criciúma e municípios vizinhos, inseridos na Região Carbonífera no sul do estado de Santa Catarina, obtiveram o seu desenvolvimento econômico, social e cultural, em parte, mediante a exploração do carvão mineral. Na produção teórica sobre o carvão na região sul do Brasil tem-se dado ênfase aos

agravos que essa atividade fez à natureza, ao meio ambiente e ao questionável progresso trazido por esta atividade (PHILOMENA, 2005).

A mineração é considerada uma das atividades humanas que mais contribui para a alteração da superfície terrestre, provocando expressivos impactos sobre a água, o ar, o solo, o subsolo e a paisagem como um todo. A degradação é um processo inerente à atividade de mineração e sua intensidade depende do volume explotado, do tipo de mineração e dos rejeitos produzidos (GRIFFITH, 1980).

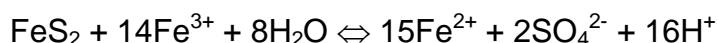
A mineração de carvão a céu aberto foi uma das principais formas de degradação ambiental na região sul de Santa Catarina, conhecida como região carbonífera (LUNARDI-NETO *et al.*, 2008).

De acordo com Koppe e Costa (2008) a mineração de carvão dá origem a áreas de solos impactados, como resultado do processo de extração denominado de lavra a céu aberto em faixas (*strip mining*).

Nesse processo, as camadas superficiais do solo e de outras formações sedimentares que recobrem as camadas de carvão são removidas propiciando a descobertura da camada de carvão, que é posteriormente lavrada. Os estéreis de mineração são depositados em pilhas de grande volume ao lado das cavas de mineração (KOPPE; COSTA, 2008).

Quando o processo de reabilitação de áreas mineradas não acontece ou é inadequado, um processo previsível nos solos construídos e nas demais áreas afetadas pela mineração de carvão é a sulfurização. Como consequência, o processo de sulfurização pode ser ativado nos solos construídos em razão da oxidação de sulfetos, principalmente a pirita, presentes nos estéreis de mineração. Quando exposta ao oxigênio e água, a pirita é oxidada sendo transformada em ácido sulfúrico condicionando alterações químicas e mineralógicas. Esse processo é denominado drenagem ácida (INDA *et al.*, 2010).

Segundo IPAT (2007) uma das principais reações geradoras de drenagem ácida em solos impactados pela mineração de carvão é a oxidação de sulfetos por Fe^{3+} com produção de acidez e redução do ferro, descrita por Singer e Stumm (1970 apud IPAT, 2007) mostrada a seguir.



Além do pH baixo, áreas de mineração podem conter níveis elevados de metais pesados (GAIVIZZO, 2002; Klein, 2006; IPAT, 2007; QUIÑONES *et al.* 2008). De acordo com Costa; Zocche; Souza (2007), Amaral e Krebs (2010) os

principais metais pesados encontrados em áreas de mineração de carvão são Cr, Zn, Fe, Co, Mn, Ni, Pb e Cu.

Para reduzir esses problemas na recomposição do solo, as camadas e horizontes devem ser separados durante as escavações para, posteriormente, serem colocados conforme a ordem original em que se apresentavam, atenuando os efeitos indesejáveis oriundos de sua retirada (LUNARDI-NETO, 2008).

A qualidade do solo está relacionada à atividade microbiana, ou seja, as reações biológicas e bioquímicas catalisadas pelos micro-organismos. Essas reações são responsáveis pela decomposição de resíduos de plantas, animais, urbanos e industriais, pela ciclagem biogeoquímica, incluindo a fixação de N^2 , pela formação de agregados do solo e pela taxa de decomposição de materiais orgânicos (ELSAS, 1997 apud FORTES-NETO, FERNANDES, JAHNEL, 2007).

De acordo com Tortora (2005) os micro-organismos existentes no solo utilizam o oxigênio, luz e nutrientes presentes neste. Seus nutrientes são obtidos por meio dos ciclos biogeoquímicos, dos quais os micro-organismos são peças importantes. Dentre os ciclos, podemos citar o ciclo do carbono, onde os micro-organismos transformam moléculas orgânicas em moléculas inorgânicas; ciclo do nitrogênio, onde atuam nos processos de amonificação, nitrificação, desnitrificação e fixação do nitrogênio; ciclo do enxofre, onde as bactérias convertem o enxofre reduzido em H_2S e em sulfatos completamente oxidados (SO_4^{2-}); e do ciclo do fósforo, onde ocorrem modificações de fosfato orgânico para inorgânico.

A utilização de medidas das atividades dos micro-organismos relacionadas aos ciclos biogeoquímicos para o monitoramento da qualidade do solo vem sendo pesquisada pelo fato desses organismos e as propriedades físico-químicas do solo estarem intimamente ligados uns aos outros, além de que são responsáveis por inúmeros processos biológicos e bioquímicos, sendo, dessa forma, sensíveis a qualquer tipo de alteração que ocorre no solo, seja ela natural ou antrópica (FORTES-NETO; FERNANDES; JAHNEL, 2007).

Os bioindicadores têm sido amplamente utilizados no monitoramento de áreas degradadas, dentre eles a atividade biológica do solo, como a quantificação da biomassa microbiana, atividade metabólica e caracterização dos micro-organismos vem ganhando destaque como novas técnicas (ZILLI, 2003; DERKS, 2007; MELLONI, 2007).

Dentre os métodos para avaliar a atividade biológica do solo, a respirometria é uma técnica relativamente nova, mas que já tem mostrado resultados satisfatórios. A técnica consiste em avaliar o consumo de oxigênio ou produção de dióxido de carbono por unidade de volume e de tempo (BERNARDES; SOARES, 2005).

Outra técnica utilizada para quantificação de biomassa microbiana do solo é denominada incubação e extração, desenvolvida por Vance, Brookes e Jenkinson (1987). Essa metodologia segue os mesmos princípios do método de fumigação e incubação, porém o carbono é estimado pela extração direta pelo K_2SO_4 após a fumigação pelo clorofórmio (HUNGRIA; ARAUJO, 1994).

A contagem de unidades formadoras de colônias também é uma técnica amplamente utilizada em diversos tipos de estudos sobre microbiota do solo. Essa técnica tem como intuito estimar a densidade populacional dos micro-organismos no solo (SOUTO *et al.*, 2008; ANDRADE, 2009; RIBAS, 2008). Esse método revela o número de micro-organismos capazes de se multiplicar e formar colônias, presentes no solo através do cultivo sob condições de incubação e nutrição adequadas (ANTONINI, 2004).

Segundo Pfenning e Abreu (2010) os fungos exercem várias funções importantes no solo, como o processo de decomposição que leva à mineralização e reciclagem de nutrientes de planta. Podem também interagir com bactérias, actinomorfos e pequenos invertebrados, aumentando suas funções no solo.

Dentro dos fungos encontrados no solo podemos citar os bolores e leveduras, que se diferem dos outros tipos de fungo por se apresentarem, predominantemente sob forma unicelular. No solo, a grande maioria dos bolores e leveduras nutre-se da matéria orgânica, podendo atuar como detritívoros (DIAS; SCHWAN, 2010).

As bactérias fazem parte do grupo microbiano que contribui tanto na degradação e remineralização do material orgânico presente no solo quanto no sustento da biomassa do universo. Dentro desse grupo, as bactérias heterotróficas são capazes de transformar em energia detritos orgânicos e uma variedade de substratos de carbono incluindo aminoácidos, lipídios, glicolipídios e carboidratos (RECHE; PITTOL; FIUZA, 2010).

Os solos construídos após o processo de mineração de carvão têm suas propriedades físicas, químicas e biológicas alteradas, apresentando fatores como pH

baixo e alta concentração de metais pesados que podem vir acarretar na redução da população de micro-organismos no solo (LUNARDI-NETO, 2008).

O carbono da biomassa microbiana é um indicador biológico sensível para identificar alterações no solo em função de diferentes tipos de uso da terra (MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2002). Para Wardle e Hungria (1994) a atividade das diferentes populações da biomassa microbiana pode ser influenciada por fatores relacionados aos teores de nutrientes, efeitos simbióticos das plantas, características físico-químicas do solo, presença de metais ou pesticidas, ação do fogo, microclima e estado trófico da matéria orgânica presente no solo.

A contagem de unidades formadoras de colônias se apresenta também como uma técnica extremamente relevante nos estudos de microbiologia do solo, uma vez que permite a caracterização da biomassa microbiana assim como avaliar a interferência de parâmetros físico-químicos e biológicos através da distribuição das diferentes populações microbianas e suas especificidades (HUNGRIA e ARAUJO, 1994).

Tendo em vista os danos causados pela mineração de carvão a céu aberto na região carbonífera sul catarinense, a necessidade de implantação de projetos de reabilitação e monitoramento dessas áreas e a crescente utilização de bioindicadores para avaliação do processo de restauração de áreas degradadas, o presente estudo se faz importante por trazer novas abordagens para o monitoramento utilizando parâmetros de fácil manipulação a fim de contribuir para um melhor acompanhamento dos processos de reabilitação de áreas degradadas pela atividade carbonífera.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a comunidade de micro-organismo em solos de diferentes estádios de recuperação em uma área degradada por mineração de carvão no município de Treviso, SC.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar colônias de fungos e bactérias em cada estação amostral.
- Comparar a quantidade de colônias de fungos e bactérias nas diferentes estações amostrais nas diferentes épocas do ano.
- Correlacionar os valores das populações de fungos e bactérias com a qualidade do solo das diferentes estações amostrais.
- Testar metodologias para a quantificação da biomassa de micro-organismos em solos de áreas degradadas pela atividade carbonífera

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O local onde foram realizadas as coletas de amostras do solo está localizado no município de Treviso, Santa Catarina. O acesso principal a área é realizado pela rodovia SC-447 que liga Siderópolis a Treviso. A área estudada corresponde a cerca de 220 ha que sofreram influência da mineração a céu aberto iniciada em 1982 e finalizado em 1989 pela Carbonífera Próspera S.A., com uso da *dragline* Marion. Dessa área aproximadamente 9 ha foram desapropriados pela Prefeitura Municipal de Treviso (IPAT, 2007) como mostra a figura 1.

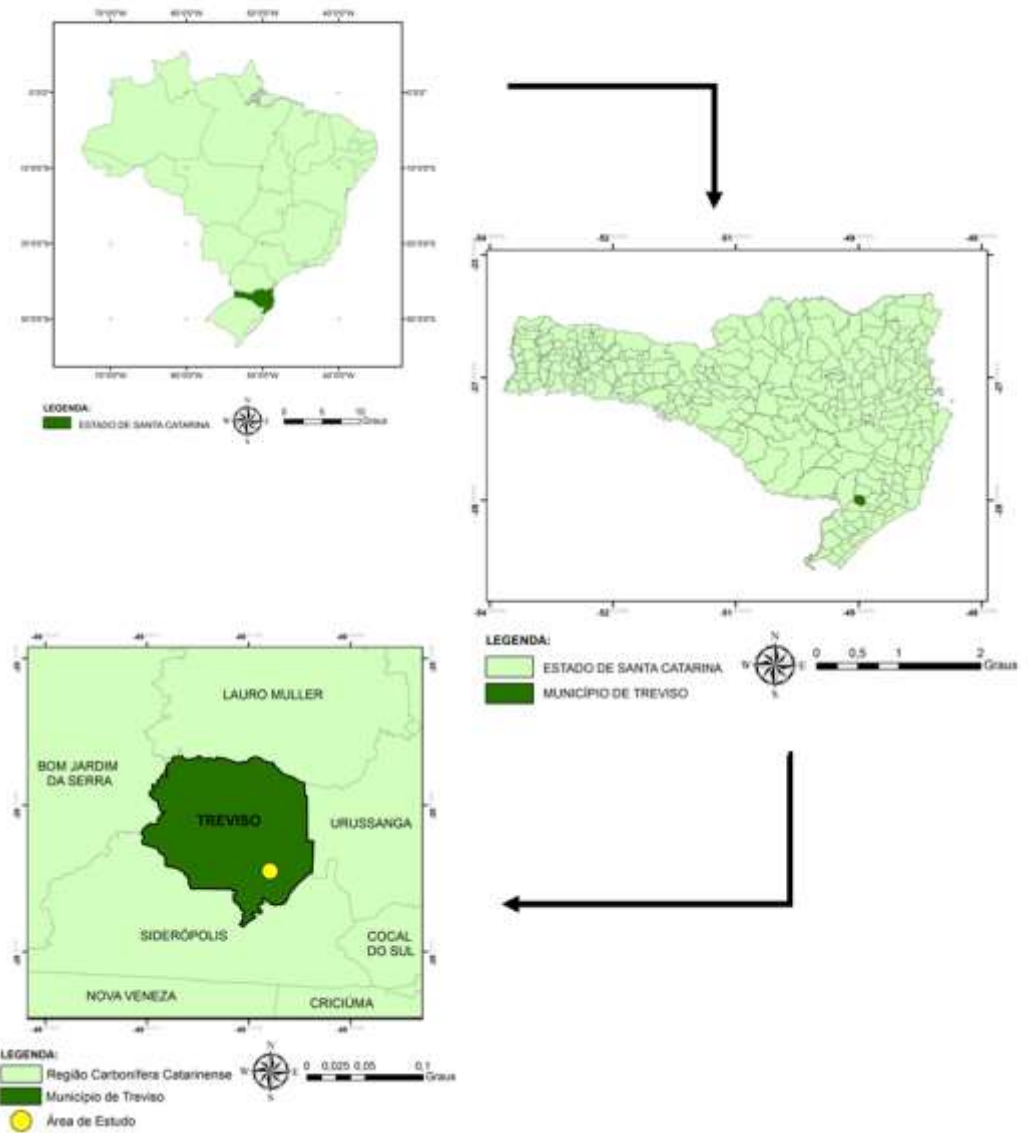
A área se encontra em uma zona de clima subtropical constantemente úmido, onde as temperaturas variam entre a máxima de 25,9 e a mínima de 12,0°C. A Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica) está presente na área na forma de Floresta Montana, marcada intensamente pela influência oceânica com alto índice de umidade e baixa amplitude térmica (EPAGRI, 2001).

Geomorfologicamente, o local de estudo está inserido na Unidade Depressão da Zona Carbonífera catarinense, apresentando relevo colinoso com espesso manto de intemperismo, e ocorrência de processos de solifluxão. Pertencendo a formação geológica da Serra Geral, possui rochas vulcânicas desde composição básica até rochas com alto teor de sílica, e baixo teor de ferro e magnésio. Possui solo do tipo cambissolo, que são constituídos por material mineral, apresentando horizonte A com espessura inferior a 40 cm seguido de horizonte B incipiente (EPAGRI, 2001).

As amostragens de solo foram realizadas em quatro ambientes: Estação amostral 01) um remanescente florestal sem interferência direta da mineração; Estação amostral 02) fragmento com vegetação espontânea sobre estéreis da mineração; Estação Amostral 03) uma área em processo de reabilitação com 4 anos de cobertura vegetal; e Estação amostral 04) uma área em processo de reabilitação com 2 anos de cobertura vegetal (Figura 2).

Figura 1- Mapa de Localização do campo Morozini no município de Treviso – SC.

MAPA DE LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO



Fonte: Modificado de IBGE (2012)

Figura 2- Localização das Estações amostrais no Campo Morozini, município de Treviso, SC.



Fonte: Modificado de Google Earth (2012)

2.1.1 Estação Amostral 01 - Remanescente florestal

A estação amostral 01 é um remanescente de Floresta Ombrófila Densa Submontana, em estágio avançado de regeneração natural, que embora esteja localizada na periferia da área minerada, não sofreu interferência direta em decorrência da mineração de carvão realizada em seu entorno (IPAT, 2009) (Figura 3).

Entre as espécies que compõem o remanescente pode-se citar *Magnolia ovata* Spreng. (magnólia), *Aspidosperma olivaceum* Müll.Arg. (peróba-vermelha), *Ficus insípida* Willd. (figueira-branca), *Matayba elaeagnoides* Radlk. (camboatá), *Cupania vernalis* Cambess. (camboatá-vermelho), *Geonoma gamiova* Barb.Rodr. (rabo-de-peixe), *Syagrus romanzoffiana* Cham. (gerivá), *Cabralea canjerana* Vell. Mart. (cangerana), *Cedrela fissilis* Vell. (cedro-rosa), *Casaria silvestres* Sw. (chá-de-bugre), *Nectandra oppositifolia* Ness. (canela-ferrugem), *Xylopia brasiliensis* Spreng. (cortiça), *Boehmeria caudata* Sw. (assa-peixe), *Inga sessilis* (Vell.) Mart. (ingá-ferradura), *Euterpe edulis* Mart. (palmitreiro) entre outras (IPAT, 2009).

Segundo IPAT (2009), dentre as espécies acima citadas algumas merecem destaque especial por constituírem espécies típicas de mata primária de floresta ombrofila densa submontana, refletindo na importância desse fragmento como um remanescente de mata atlântica.

Figura 3- Interior do remanescente florestal localizado no Campo Morozini, município de Treviso, SC.



Fonte: Acervo do autor

2.1.2 Estação Amostrai 02 - Fragmento com vegetação espontânea

A estação amostral 02 constitui uma área as margens de uma lagoa originada de uma cava de mineração, área esta que sofreu intervenções durante o processo de mineração de carvão a céu aberto, de modo que a vegetação hoje existente no local é constituída predominantemente por espécies pioneiras e secundárias iniciais, fruto da regeneração espontânea (IPAT, 2009) (Figura 4).

Dentre as espécies observadas para esse fragmento, pode-se destacar *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze (maricá), *Myrsine coriacea* (Sw.) R.Br. ex Roem. & Schult. (capororoca), *Clethra scabra* Pers. (carne-de-vaca), *Kaunia rufescens* (Lund ex DC.) R.M. King & H. Rob. (mangerona-brava), *Cedrela fissilis* Vell. (cedro-rosa), *Vermonanthura discolor* (Spreng.) H.Rob. (vassourão-branco),

Lamanonia ternata Vell. (guaraperê), *Piptocarpha tomentosa* Baker (canela-podre), *Trema micrantha* (L.) Blume (grandiúva), *Tibuchina sellowiana* Cogn. (quaresmeira), *Miconia cabucu* Hoehne. (pixiricão) , *Miconia ligustroides* (DC.) Naudin (pixirica), *Hieronyma alchorneoides* Allemão (licurana), *Baccharis dracunculifolia* DC. (vassoura), *Weinmannia paulliniifolia* Pohl ex Ser. (gramimunha) entre outras (IPAT 2009).

Figura 4- Fragmento de vegetação espontânea sobre pilha se estéreis no Campo Morozini, município de Treviso, SC.



Fonte: Acervo do autor.

2.1.3 Estação Amostral 03 - Área recuperada mais antiga

A estação amostral 03 é umas das áreas onde as intervenções visando a reabilitação ambiental foram implantadas ha mais tempo. Nesta estação a implantação de cobertura vegetal, ocorreu a aproximadamente quatro anos (IPAT, 2009) (Figura 5).

O processo de reabilitação dessa área se deu através da remodelagem topográfica, incorporação de calcário aos estéreis remodelados, recobrimento do substrato com argila, aplicação de cama de aviário, turfa de raspagem estabilizada e fertilizante e por ultimo a introdução das espécies herbáceas como *Paspalum*

notatum Flüggé (grama-forquilha), *Arachis pintoii* Krapov. & W.C.Greg (amendoim-forrageiro) e espécies arbóreas como *Mimosa scabrella* Benth (bracatinga) e *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-vermelha) por meio de semeadura a lanço (IPAT, 2009).

Figura 5- Área em processo de reabilitação há 4 anos localizada no Campo Morozini, município de Treviso, SC.



Fonte: Acervo do autor.

2.1.4 Estação Amostral 04 – Área recuperada mais recente

A estação amostral 04 é umas das áreas mais recentes considerando o processo implantação de cobertura vegetal, sendo esta implantada há aproximadamente dois anos (IPAT, 2009) (Figura 6).

Assim como na estação amostral 03, o processo de reabilitação dessa área se deu através da remodelagem topográfica, incorporação de calcário aos estéreis remodelados, recobrimento do substrato com argila, aplicação de cama de aviário, turfa de raspagem estabilizada e fertilizante e por último a introdução das espécies herbáceas como *Paspalum notatum* Flüggé (grama-forquilha), *Arachis pintoii* Krapov. & W.C.Greg (amendoim-forrageiro). Porém, nessa área não foram

implantadas espécies arbóreas, para evitar que as raízes penetrassem a uma maior profundidade, formando caminhos para a infiltração da água e a difusão de oxigênio no solo, uma vez que nesse local os estéreis de mineração apresentam maior concentração de pirita (IPAT, 2009).

Figura 6- Área em processo de reabilitação há 2 anos localizada no Campo Morozini, município de Treviso, SC.



Fonte: Acervo do autor

2.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas em duas épocas do ano, no primeiro semestre, dia 28 de abril e no segundo semestre, dia três de agosto de 2012, a fim de avaliar a oscilação da atividade metabólica de micro-organismos nas duas estações do ano.

A coleta de amostras em cada estação amostral foi realizada de acordo com a norma da NBR 14.283, de 1999, onde consta que o solo utilizado deverá ser retirado a uma profundidade de 0 - 15 centímetros (por se encontrar, nesta profundidade, grande parte da população microbiana aeróbia). Em cada local foram coletadas quinze subamostras com a superfície isenta de folhas e outros detritos,

sendo que, as subamostras foram coletadas com, no mínimo, 2 metros de distância entre uma e outra, variando essa distância de acordo com a extensão da estação amostral com a finalidade de abranger uma área representativa em cada estação. As subamostras de cada local estação amostral foram misturadas, para obtenção de uma amostra composta por local, e embaladas em sacos plásticos com vedação tomando cuidado para deixar ar dentro dos sacos plásticos para manter as células e micro-organismos viáveis. (Figura 7)

Figura 7- Amostras de solo sendo coletada e acondicionada em saco plástico.



Fonte: Acervo do autor

Em laboratório as amostras foram peneiradas com peneira de 2 mm, quarteadas e refrigeradas a 4 °C até o momento da realização das análises.

2.3 QUANTIFICAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E INCUBAÇÃO

Um teste prévio, com o intuito de calibrar a metodologia de determinação da biomassa microbiana foi realizado através do método de fumigação e incubação

proposto por Jenkinson e Powlson (1976) com as modificações propostas por Hungria e Araújo (1994).

Esse método baseia-se na hipótese que se um solo for esterilizado, e em seguida incubado com uma pequena parte de micro-organismos, segue-se um grande fluxo de respiração proveniente da decomposição dos micro-organismos que estavam presentes no solo originalmente e que foram mortos pela fumigação. Assume-se que esse fluxo é diretamente proporcional a quantidade de micro-organismos presente no solo antes da fumigação, sendo assim, é possível estimar a biomassa presente na amostra antes da esterilização (HUNGRIA; ARAUJO, 1994).

2.3.1 Preparo e fumigação das amostras para análise da biomassa microbiana

O preparo das amostras foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Jenkinson e Powlson (1976). Os testes foram realizados em triplicata, e para a realização dos testes as amostras foram novamente peneiradas (4 mm) e retiradas seis subamostras de 14 g de solo de cada estação amostral com o auxílio de uma balança de precisão eletrônica da marca Marte[®] modelo AL500. (Figura 8)

Para a esterilização das amostras, as mesmas foram colocadas em béqueres abertos dentro de um dessecador juntamente com um béquer contendo 175 mL de clorofórmio e um béquer contendo 175 mL água destilada para manter a umidade. Criou-se então um vácuo no dessecador, com o auxílio de uma bomba de vácuo, para a evaporação do clorofórmio e as amostras ficaram expostas ao gás durante 48 horas para a esterilização completa da microbiota do solo. (Figura 9)

Após a fumigação o substrato fumigado foi reinoculado com uma pequena subamostra de solo, com uma relação de peso de 1:9 (inóculo : solo fumigado) totalizando 1,5 g, para que os micro-organismos do inóculo pudessem decompor os outros micro-organismos mortos na fumigação. Simultaneamente uma amostra do mesmo solo, porém não fumigada, foi preparada para corrigir a respiração que ocorre no solo independentemente do fluxo de fumigação.

Figura 8- Subamostra de solo sendo pesada em balança de precisão.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 9- Dessecador contendo as subamostras de solo, clorofórmio e água destilada.



Fonte: Acervo do autor.

2.3.2 Incubação das amostras

Todas as amostras foram, então, incubadas em recipientes de vidro diferentes com tampa vedada, hermeticamente fechados, junto de um frasco de plástico contendo 5 mL uma solução básica (KOH a 1 M) para capturar o CO₂ proveniente da respiração dos micro-organismos. Foram utilizados dois períodos de incubação diferentes a fim de avaliar qual apresentaria melhores resultados. Em um primeiro teste as amostras permaneceram incubadas durante um período de sete dias, enquanto no segundo teste as amostras permaneceram incubadas durante quinze dias. Em ambos os testes as amostras permaneceram em uma estufa incubadora DBO da marca Quimis[®] modelo Q315M, a uma temperatura constante de 22°C (JENKINSON; POWLSON, 1976).

2.3.3 Análise e quantificação da concentração de Carbono

O C do CO₂ capturado pela base foi determinado ao final do período de incubação, por titulação a dois pontos (pH = 8,3 e pH = 3,7) com HCl 0,05 M. Em seguida, o carbono da biomassa microbiana foi calculado de acordo com a seguinte

$$\text{relação: } B = \frac{F - NF}{kC}$$

Onde: F e NF representa o C total liberado das amostras fumigadas e não fumigadas respectivamente. Kc é uma constante, representando a proporção de carbono da biomassa microbiana morta que é convertida em CO₂ durante o período de incubação. O valor da constante utilizado foi de 0,50, valor este descrito pelos autores da metodologia.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DO CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E EXTRAÇÃO

O carbono da biomassa microbiana foi determinado por meio do método de fumigação e extração proposto por Vance; Brookes; Jenkinson (1987) com as modificações propostas por Hungria e Araújo (1994) e De-Polli e Guerra (1997). Esse método foi desenvolvido através de modificações do método de fumigação e incubação, desenvolvido por Jenkinon e Powlson (1976).

A hipótese deste método é de que se um solo for esterilizado por exposição ao clorofórmio, o carbono presente nos microrganismos que estavam originalmente presentes nos componentes celulares é liberado através da lise celular. Esse carbono é então determinado por extração química. A diferença da quantidade de carbono entre amostras fumigadas e não fumigadas revela a biomassa microbiana da amostra (HUNGRIA; ARAUJO, 1994).

2.4.1 Preparo e fumigação das amostras para análise da biomassa microbiana

A preparação das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vance; Brookes; Jenkinson (1987). Os testes foram realizados em duplicata, e para a realização dos testes as amostras foram novamente peneiradas (4 mm) e retiradas quatro subamostras de 20 g de solo de cada estação amostral.

Neste método as amostras são esterilizadas através do uso de clorofórmio. Duas subamostras de 20 g de cada estação amostral foram esterilizadas.

Para a esterilização, as amostras foram colocadas em recipientes abertos dentro de um dessecador junto com um béquer contendo 175 mL de clorofórmio e um béquer contendo 175 mL água destilada para manter a umidade. Foi criado um vácuo no dessecador, através de uma bomba de vácuo, para a evaporação do clorofórmio e as amostras ficam expostas ao gás durante 48 horas para a esterilização completa da microfauna do solo.

Simultaneamente a essas subamostras, foram preparadas duas subamostras não fumigadas das respectivas estações amostrais. Essas amostras foram apenas peneiradas e pesadas e utilizadas como controle de carbono não proveniente de microrganismos presente no solo.

2.4.2 Extração de Carbono

A extração de carbono das amostras foi realizada segundo a metodologia descrita por De-Polli e Guerra (1997).

As subamostras fumigadas e não fumigadas foram depositadas em Erlenmeyers de 125 mL e submetidas a extração com 50 mL de K_2SO_4 (0,5 M) por 30 minutos em agitação contínua em uma mesa agitadora da marca TECNAL®

modelo TE-1401 (Figura 10). Juntamente com as subamostras, foi preparada uma solução controle contendo apenas 50 mL de K_2SO_4 . Após a extração as amostras foram deixadas em repouso para a decantação por um período de aproximadamente 30 minutos, posteriormente a esse período as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 3600 RPM (Figura 11) e posteriormente filtradas em filtro de papel quantitativo de 125 mm faixa branca para a retirada do sobrenadante (Figura 12).

Figura 10- Amostras de solo e substancia extratora na mesa agitadora.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 11- Solução de amostras de solo na centrífuga.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 12- Soluções das amostras centrifugadas sendo filtradas em filtro de papel.



Fonte: Acervo do autor.

2.4.3 Análise da concentração de carbono

A análise da concentração de carbono absorvível nas subamostras foi realizada pelo método de determinação da demanda química de oxigênio (DQO) descrita por Zuccari; Granes; Leopoldo (2005).

Uma alíquota de 3 mL da solução foi pipetada em um tubo de ensaio de 10 ml, em seguida, misturada com 2 mL da solução digestora, composta por dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) para oxidar o carbono. Nesse processo, o carbono, suscetível a oxidação, é oxidado pelo dicromato de potássio em meio ácido sulfúrico. Após esse processo foi adicionado sulfato de prata (Ag_2SO_4), solução catalítica, para acelerar o processo de oxidação do carbono (Figura 1).

Figura 13- Solução extratora pipetadas nos tubos de ensaio.



Fonte: Acervo do autor.

A quantidade de material oxidável é proporcional à quantidade de dicromato consumida na reação, onde o Cr^{+6} se reduz a Cr^{+3} que é colorido na região visível do espectro (coloração verde). A coloração da amostra foi medida, com auxílio de um espectrofotômetro da marca Hach® modelo DR-2800, a 600 nm,

e a quantidade de carbono presente a amostra foi estimada a partir de uma curva de regressão linear previamente calibrada (Figura 14).

Figura 14- Solução da amostra no espectrofotômetro.



Fonte: Acervo do autor.

2.4.4 Quantificação da biomassa microbiana através da concentração de carbono

O carbono da biomassa microbiana foi calculado de acordo com a seguinte relação:

$$B = \frac{F - NF}{Kec}$$

Essa equação foi descrita por Vance; Brookes; Jenkinson (1987) onde o F representa o carbono total presente nas amostras fumigadas e NF representa o carbono total presente nas amostras não fumigadas. Kec é uma constante, representando a proporção de carbono da biomassa microbiana morta que é convertida em CO₂ durante o período de incubação, o valor utilizado para esta constante foi de 0,379 como descrito pelo autor da metodologia.

2.5. CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

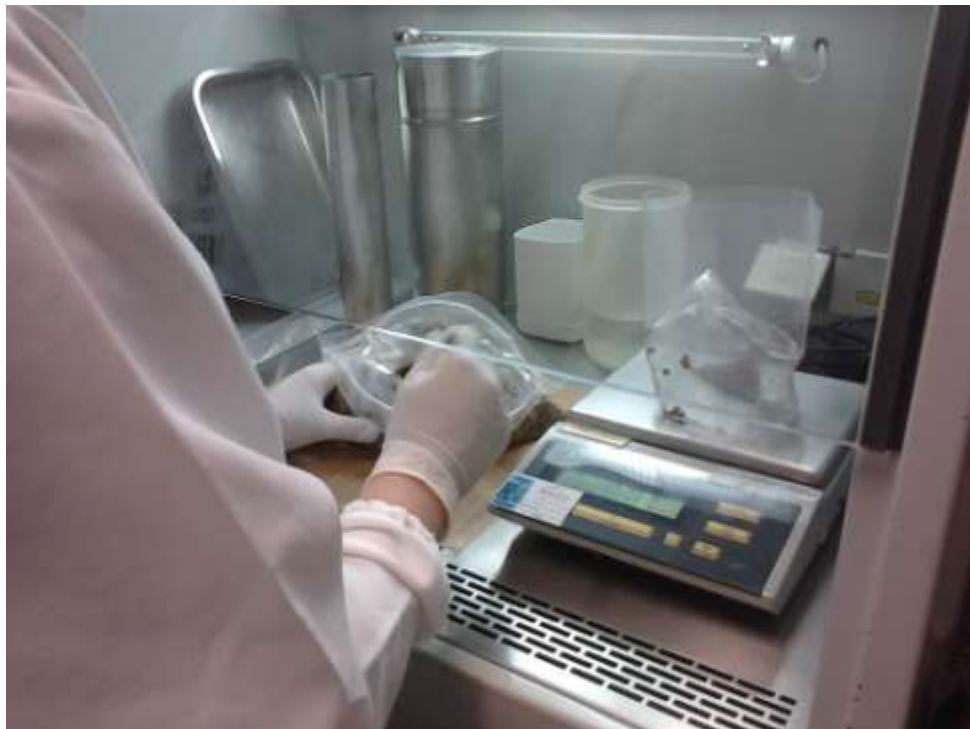
Para análise de unidade formadora de colônias de bolores e leveduras ou microrganismos heterotróficos, foi utilizada a metodologia previamente descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Pesca, e todas as análises foram realizadas em duplicata (BRASIL, 2003).

Nesse método, uma solução da amostra é acondicionada em um meio de cultura, no final do período de incubação os microrganismos acumulam-se em colônias. As colônias são formadas a partir de uma única célula microbiana, sendo assim, o número de colônias formadas no meio de cultura revela a população microbiana viável presente no inóculo (ALVES, 2006).

2.5.1 Contagem de bolores e leveduras

Primeiramente foi pesada uma amostra de 25 g do solo anteriormente peneirado, com auxílio de uma balança de precisão da marca Marte[®] modelo AS2000C (Figura 15).

Figura 15- Pesagem das amostras de solo para análises e Unidades formadoras de colônias.



Fonte: Acervo do autor.

Em capela de fluxo laminar, a amostra de solo foi então diluída em 225 mL de água diluente, em um saco plástico e homogeneizada em um homogeneizador da marca IUL[®] modelo *Silver panoramic* (Figura 16), essa solução foi considerada a diluição 10^{-1} . A partir dessa solução foram realizadas mais duas diluições, a fim de realizar os testes utilizando 3 diluições diferentes.

Para preparar a diluição 10^{-2} foi retirado 1 mL da amostra 10^{-1} , com auxílio de uma pipeta (Figura 17), depositado em um tubo de ensaio contendo 9 mL de água diluente, e homogeneizada em agitador mecânico de tubos de ensaio da marca Quimis[®] modelo Q220 (figura 18).

Figura 16- Solução da amostra de solo sendo homogeneizada.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 17- Preparação das diferentes diluições da amostra.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 18- Tubo de ensaio com diluição da amostra sendo homogeneizado.



Fonte: Acervo do autor.

Para o preparo da diluição 10^{-3} , 1 ml da diluição 10^{-2} foi depositado em um tubo de ensaio contendo 9 mL de água diluente, e posteriormente homogeneizada.

No final desse processo, obteve-se 3 diluições diferentes da amostra, sendo elas, 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

O meio de cultura utilizado no experimento foi Agar Batata Glicose. O Agar foi inicialmente fundido e após, resfriado em banho-maria a uma temperatura de $\pm 47^{\circ}\text{C}$. O meio foi acidificado até atingir pH 3,5 por meio da solução de ácido tartárico 10%.

As placas de Petri foram vertidas com cerca de 15 a 20 mL do meio e deixado solidificar em superfície plana. Em seguida foram identificadas com o número das amostras, o tipo de análise e a diluição. Em uma câmara de fluxo laminar, as placas contendo o meio foram secas e inoculadas com 0,1 mL de inóculo, sendo que cada placa foi inoculada com inóculo de uma diluição diferente, que foi depositado entre o centro e a borda da placa e espalhado com o auxílio de uma Alça de Drigalsky, até a absorção da amostra pela cultura (Figura 19).

Após a inoculação, as placas foram incubadas, sem inverter, em estufa a 25°C durante 7 dias. A contagem de colônias se deu após o período de incubação, com o auxílio de um contador de colônias da marca Phoenix[®] modelo CP 600 plus, na placa da diluição que apresentou melhor visibilidade, intervalo entre 15 e 150 UFC (Figura 20).

Figura 19- Espalhamento do inóculo nas placas.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 20- Contagem de unidades formadoras de colônias de bolores e leveduras em contador de colônia.



Fonte: Acervo do autor.

2.5.2 Contagem de bactérias heterotróficas

Para análise de heterotróficos, assim como a contagem de bolores e leveduras, pesou-se 25 g de solo, da amostra previamente peneirada. Essa amostra foi então diluída em 225 mL de água diluente e homogeneizada para obtenção da diluição 10^{-1} . A partir dessa diluição, foram realizadas as diluições 10^{-2} e 10^{-3} e 10^{-4} , da mesma forma realizada com as amostras para análise de bolores e leveduras.

Com auxílio de uma pipeta, foi depositado um inóculo de 1 mL da diluição da amostra entre o centro e a borda de uma placa de Petri previamente anotada de acordo com o número de identificação das amostras, o procedimento foi repetido para cada diluição da amostra. Após esse procedimento, foi vertido nas placas já inoculadas, cerca de 15 a 20 mL de Plate Count Agar (Agar padrão para contagem), previamente fundido e mantido a $\pm 47^{\circ}\text{C}$ em banho-maria (Figura 21).

O inóculo e o meio de cultura foram misturados, movimentando suavemente as placas sobre uma superfície plana, em movimentos na forma de oito cerca de seis vezes. Após a mistura, o meio foi deixado solidificar-se em uma superfície plana.

Figura 21- Ágar sendo vertido nas placas de Petri inoculadas com solução do solo.



Fonte: Acervo do autor.

As placas foram invertidas após a solidificação, acondicionadas em um suporte para placas de Petri e incubadas em uma estufa a temperatura de 36°C durante 48 horas. Posteriormente ao período de incubação, a contagem de colônias foi realizada com o auxílio de um contador de colônias, na placa da diluição que apresentou melhor visibilidade, intervalo de 30 a 300 UFC.

2.5 ATRIBUTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DOS SOLOS

Foram compilados os resultados de análise de solos, onde foram avaliados: pH, Fósforo, Potássio, Matéria Orgânica, Alumínio, Cálcio, Magnésio, Sódio, H + Al, Soma Bases-S, CTC, Saturação Bases-V. As análises seguiram os critérios estabelecidos por Tedesco *et al.* (1995). Esses dados foram obtidos através do Diagnostico ambiental e dos estudos de monitoramento da área realizada pelo IPAT. Esses trabalhos estão disponíveis no site da ACP do carvão: <<https://www.jfsc.jus.br/acpdocarvao/>>

2.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Não foram realizados testes estatísticos para comparar os resultados, os gráficos de tendências foram gerados através do *software* Microsoft Office Excel 2007.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATRIBUTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DO SOLO

Os dados referentes às análises da área está disposta na tabela 1.

As análises de solo das áreas em reabilitação foram realizadas no ano de 2012. Já as análises dos solos de remanescente e vegetação espontânea foram realizadas em 2007, já que não são realizados monitoramentos nessas áreas pois não foram implantados nenhum processo de reabilitação nas mesmas.

Tabela 1- Atributos físicos e químicos do solo do Campo Morozini, município de Treviso - SC.

	Vegetação			
	Remanescente	Espontânea	Reab. 4 anos	Reab. 2 anos
pH	4,5	3,8	4,7	4,7
Fósforo (ppm)	0,3	4,9	0,4	0,2
Potássio (cmolc/L)	71	85	71,03	71,98
Mat. Orgânica (%)	2,0	2,0	0,8	0,4
Alumínio (cmolc/L)	6,2	9,4	5,4	6,7
Cálcio (cmolc/L)	2,0	1,0	0,80	0,35
Magnésio (cmolc/L)	1,0	0,7	1,1	0,56
Sódio (ppm)	12	15	18,21	24,93
H+AL (comlc/L)	13,80	25,97	8,3	9,66
Soma de bases (cmolc/L)	3,24	1,99	2,18	1,21
CTC (cmolc/L)	17,04	27,95	10,48	10,87
Satur. Bases – V (cmolc/L)	18,99	7,10	20,79	11,11

Fonte: Modificado de IPAT(2007) ; IPAT (2012)

A área de vegetação espontânea, apresentou os horizontes do solo mais devastados e invertidos, enquanto a área de remanescente, se apresenta mais conservada, com seus horizontes pouco afetados. As áreas de reabilitação de 4 e 2 anos apresentam o solo remodelado e coberto com camada de argila (IPAT, 2007).

Quanto aos valores de pH podemos observar que todas as áreas apresentavam valores muito baixos, sendo o valor mais baixo é encontrado na área de vegetação espontânea (3,8), a área de remanescente florestal apresenta o

segundo menor valor (4,5). Os dois maiores valores de pH são das áreas de reabilitação de 4 e 2 anos (4,7 para ambas).

De acordo com IPAT (2007) pH baixo nos solos pode diminuir o teor de oxigênio, matéria orgânica e retenção de água, menor atividade microbológica e aumento de íons tóxicos.

Os teores de fósforo, potássio e matéria orgânica são de extrema importância no solo, pois esses elementos juntamente com o nitrogênio, que pode ser calculado através da matéria orgânica (cerca de 5% da matéria orgânica é formada por nitrogênio) são considerados macronutrientes importantes para o crescimento de plantas e micro-organismos (PEET, 1992).

Foi verificado que a área de vegetação espontânea apresentava maiores níveis que o remanescente florestal desses macronutrientes. A área de reabilitação de 4 anos se apresentava mais semelhante ao remanescente e a área de reabilitação de 2 anos mais semelhante a vegetação espontânea. Porém o nível de matéria orgânica nessas duas áreas foi consideravelmente mais elevado.

Segundo Tedesco *et al.* (1995), a capacidade de troca de cátions (CTC) refere-se ao total de cargas negativas no solo que retêm cátions de forma reversiva. A CTC indica a reserva disponível no solo e a inativação de componentes tóxicos entre outras. Se a maior parte da CTC estiver ligada com cátions essenciais, este pode ser considerado um solo rico em nutrientes, ao contrário, se estiver ligado a cátions tóxicos caracterizam um solo pobre.

De acordo com os esses dados, a vegetação espontânea apresenta um nível maior de CTC (27,95 cmolc/L) seguido pelo remanescente florestal (17,4 cmolc/L) e as áreas de reabilitação, que apresentam os menores níveis (cerca de 10 cmolc/L)

A soma dos cátions básicos K^+ , Na^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , é denominada Soma de Bases e à sua porcentagem de equivalência dentro da capacidade total de troca chama-se Saturação. A partir da saturação é possível conhecer a ocupação da CTC pelos cátions básicos e avaliar a fertilidade de disponibilidade de nutrientes no solo (IPAT, 2007).

Nessas análises é possível notar que existe uma relação entre a soma de bases e o nível de acidez potencial ($H + Al$) indicando que essa não disponibiliza as bases como fatores nutricionais no fragmento de vegetação espontânea, Já no remanescente florestal e área de reabilitação de 4 anos o nível de saturação de

base foi dentro dos valores estabelecidos para as necessidades nutricionais do solo (IPAT, 2007).

Nos estudos de monitoramento das áreas em reabilitação (IPAT, 2012), realizados depois da implantação dos mesmos, foram analisados os estados de conservação das áreas reabilitadas. Nesses estudos foi possível observar que a área em reabilitação há 2 anos apresenta a camada de material argiloso avermelhado-esbranquiçado com 46 cm de espessura, porém, em alguns locais, encontrou-se fragmentos de estéreis expostos. A área de reabilitação de 4 anos apresenta camada de argila de 55 cm sem aparecimento de estéreis.

A partir desses dados é possível notar uma similaridade entre os solos do remanescente e a área de reabilitação de 4 anos, assim como uma similaridade entre o solo da área de vegetação espontânea e a área onde hoje se encontra a reabilitação de 2 anos.

Apesar de possuir muitas de suas características alteradas, a área de vegetação espontânea possui níveis de fósforo, potássio e nitrogênio mais elevados que o solo do remanescente. Porém, a saturação de Bases nessa área é menor devido a maior acidez.

Com base na situação atual, é possível observar que a área em reabilitação há 2 anos, embora mais recente, encontrasse em pior estado que a área de reabilitação de 4 anos.

3.2 BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E INCUBAÇÃO

Os resultados dos testes prévios com essa metodologia não se mostraram satisfatórios, uma vez que o solo fumigado e não fumigado não apresentou nenhuma diferença na quantidade de carbono nos dois períodos de incubação, sendo assim, foram incapazes de estimar a biomassa microbiana do solo.

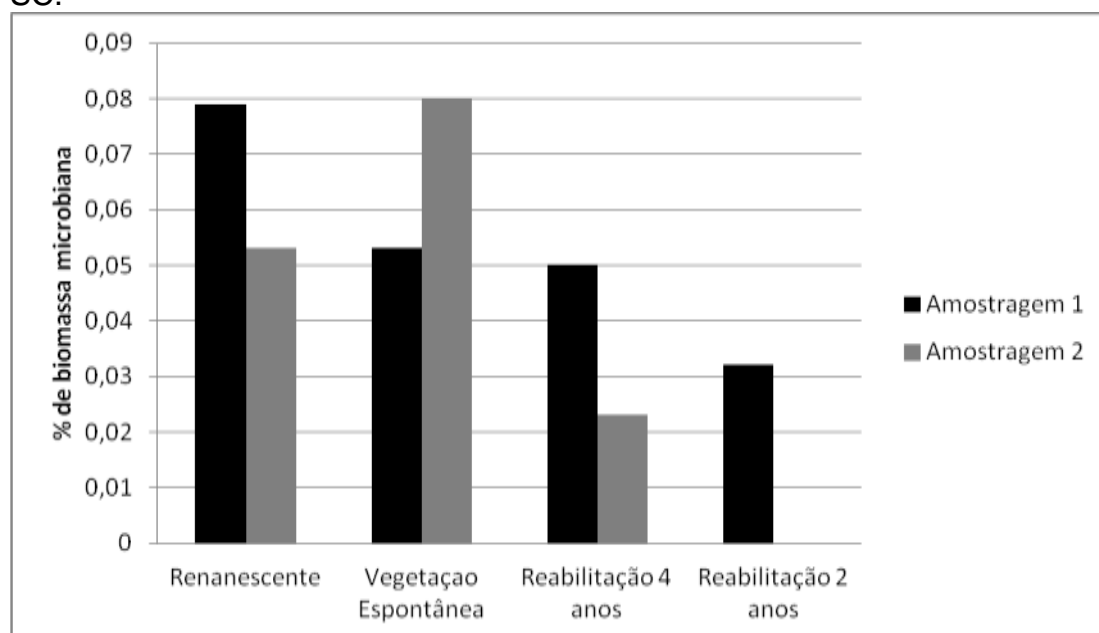
Segundo Hungria e Araújo (1994) esse método para determinação da biomassa microbiana não funciona em solos com teores elevados de matéria orgânica e/ou com baixo pH. Como os testes prévios foram realizados com solo de uma área que sofreu com a extração de carvão, o baixo pH do solo pode ter influenciado nos resultados dessa análise.

Alguns autores propuseram que, em alguns casos, um período maior de incubação, 10 a 20 dias, corrigiria esse erro (ROSS, 1990). Porém, nossos resultados não mostraram diferença entre os dois períodos de incubação testados.

3.2 BIOMASSA MICROBIANA ATRAVÉS DO MÉTODO DE FUMIGAÇÃO E EXTRAÇÃO

Os dados referentes às análises da biomassa microbiana pelo método de fumigação e extração estão expressos da Figura 22.

Figura 22- Porcentagem de biomassa microbiana no solo das diferentes estações amostrais localizadas no campo Morozini, município de Treviso, SC.



Fonte: Do autor.

Os níveis de carbono provenientes da biomassa microbiana encontrada por meio desse método foram muito baixos e não apresentaram uma diferença significativa entre pontos de amostragem e períodos de coleta. Além de não seguir um padrão entre as diferentes estações amostrais, esses dados não corroboram com os dados encontrados com os demais métodos de caracterização de biomassa realizados no presente estudo.

Esse fato pode estar ligado ao método utilizado para a extração. Vance; Brookes e Jenkinson (1987) havia sugerido um tempo maior de extração, 2 horas.

Ao contrário do tempo sugerido por De-Polli e Guerra (1997) utilizado no presente estudo.

Hungria e Araujo (1994) argumentaram também que a constante K_{ec} utilizada na equação do método de fumigação e extração para quantificação de biomassa é mais variável que a constante K_c utilizada no método de fumigação e incubação, fazendo com que os dados obtidos pelo método de fumigação e extração sejam mais variáveis. Sendo assim, solos com quantidade muito baixa de biomassa microbiana podem sofrer um desvio que afeta consideravelmente os seus resultados.

3.3 UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

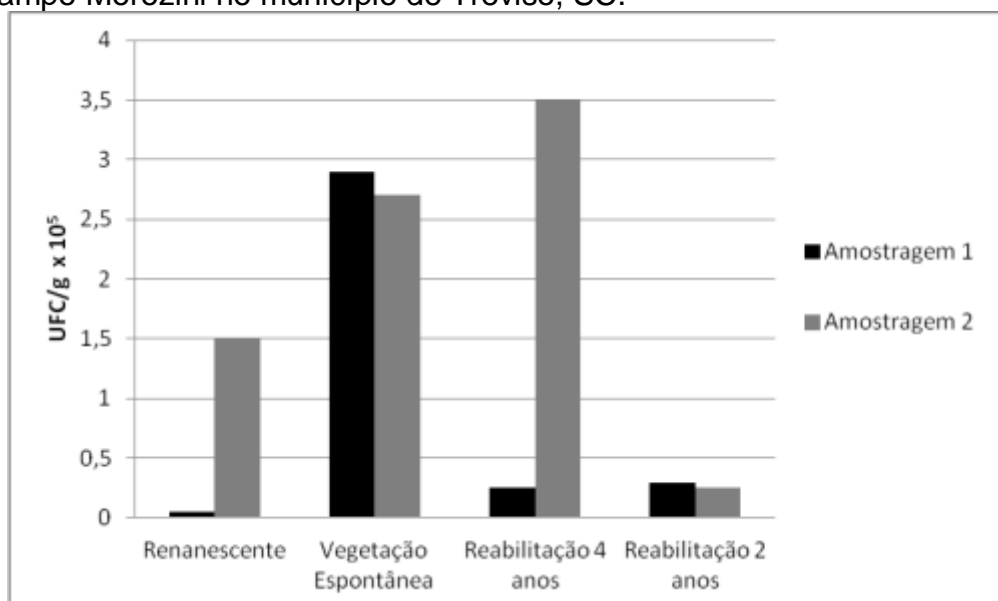
3.3.1 Bolores e Leveduras

Não foi possível observar um padrão na dinâmica da população de bolores e leveduras nas diferentes estações amostrais e períodos de coleta.

Na amostragem 1 o fragmento de vegetação espontânea apresentou o maior número de unidades formadoras de colônia ($2,9 \times 10^5$ UFC/g), seguido pelas áreas em processo de reabilitação de 2 anos ($0,25 \times 10^5$ UFC/g) e 4 anos ($0,29 \times 10^5$ UFC/g), respectivamente, que apresentam uma diferença pouco significativa entre si, e a menor quantidade de unidades formadoras de colônia foi encontrada no remanescente florestal ($0,044 \times 10^5$ UFC/g).

O fragmento de remanescente ($1,5 \times 10^5$ UFC/g) e a área em reabilitação de 4 anos ($3,5 \times 10^5$ UFC/g) apresentaram um aumento aparentemente significativo na segunda coleta em relação a primeira, enquanto o fragmento de vegetação espontânea ($2,7 \times 10^5$ UFC/g) e a área de reabilitação de 2 anos ($0,25 \times 10^5$ UFC/g) apresentaram uma diminuição na quantidade de unidades formadoras de colônia na segunda coleta quando comparada com a primeira (Figura 23).

Figura 23- Valores obtidos em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo) para populações de bolores e leveduras em solos do campo Morozini no município de Treviso, SC.



Fonte: Do autor.

A elevada variância dos resultados obtidos sobre a população de bolores e leveduras é uma característica das amostragens em áreas de florestas da Mata Atlântica. Pequenas alterações que ocorrem nesses ambientes podem resultar em alterações no comportamento desses microrganismos do solo (OSAKI, 2008). Como a área de estudo é bastante impactada e já passou por vários processos antrópicos, diversos fatores podem estar influenciando a distribuição desse microrganismos.

O nível mais alto de bolores e leveduras encontrados nas áreas de reabilitação em relação remanescente pode estar ligado ao processo de correção das características físicas, químicas e microbiológicas implantado nessas áreas. Após a modelagem com argila, foi realizada a incorporação de nitrogênio com cama de aviário, turfa e fertilizantes (IPAT, 2009).

Segundo IPAT (2009) apesar da matéria orgânica da turfa ser degradada rapidamente, ela auxilia na manutenção e no melhoramento das características microbiológicas do solo. Além da turfa, o espalhamento de fertilizantes após a aplicação da turfa garante a presença de macronutrientes, a cama de aviário mantém os níveis de nitrogênio, fósforo e potássio criando assim um ambiente propício para o crescimento dessas comunidades.

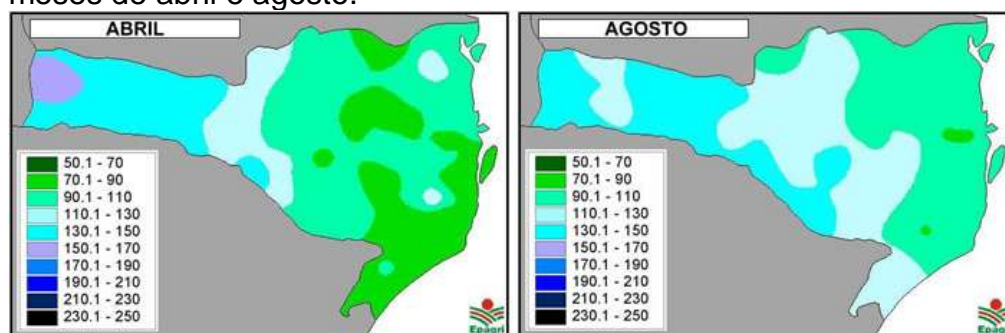
O baixo nível de unidades formadoras de colônias de bolores e leveduras na área de remanescente florestal e o elevado número na área de vegetação espontânea pode estar ligado aos níveis de pH, fósforo, potássio e nitrogênio nessas áreas.

Apesar da área de vegetação espontânea possuir um pH muito baixo, fator que limita o crescimento de muitos micro-organismos, os fungos, de maneira geral possuem capacidade de apresentar maior crescimento em pH mais ácido, por serem mais resistentes e não encontrarem competição nesses locais (GHIZELINI, 2005). Sendo assim, o pH não seria um fator limitante do crescimento dos fungos na área de vegetação espontânea, podendo favorecer o crescimento diminuindo a competição.

Esse pode ser um dos fatores que proporcionam um ambiente mais adequado para o crescimento de bolores e leveduras na área de vegetação espontânea.

Segundo dados climatológicos da EPAGRI-CIRAM (2012), obtidos através de monitoramento realizado desde o ano de 1960 a 2004, o período que corresponde a primeira coleta, 7 de maio, apresenta um menor índice pluviométrico, que varia entre 70,1 e 90mm, enquanto o período da segunda coleta, 3 de agosto, apresenta um maior índice, que varia entre 110,1 e 150mm. (Figura 24)

Figura 24- Mapa-gráfico de pluviosidade do estado de Santa Catarina nos meses de abril e agosto.



Fonte: Modificado de EPAGRI-CIRAM (2012)

Dados obtidos da estação meteorológica do Campo Morozini, o período da primeira amostragem, 16 a 23 de abril, teve uma precipitação acumulada de 3,4 mm enquanto o período da segunda amostragem, 30 de julho a 3 de agosto, apresentou um aumento, apresentando precipitação de 5,7 mm.

Os dados da estação meteorológica do Campo Morozini também apresentaram diferenças na temperatura, na primeira amostragem a temperatura estava em torno de 21,0 °C enquanto na segunda amostragem a temperatura estava em torno de 30,0 °C.

Segundo Dias e Schwan (2010) a umidade e a temperatura são fatores que influenciam diretamente nas populações de leveduras. Altas temperaturas aliadas à disponibilidade de água favorecem o crescimento dessas populações.

Como mostram os dados de monitoramento da área, no período da segunda coleta, houve um aumento da pluviosidade e temperatura, o que pode ter tornado os solos do remanescente florestal e a área em reabilitação há 4 anos mais propício para o crescimento das colônias de bolores e leveduras, o que leva a crer que essas áreas possuem as características normais do solo mais preservadas.

Ao contrário das duas áreas citadas anteriormente, o remanescente florestal e a área de reabilitação de 2 anos apresentaram uma diminuição nas populações no período chuvoso.

Alguns estudos têm mostrado que metais pesados afetam diretamente as comunidades de fungos dos solos. Dentre os diversos tipos de metais pesados, o Zn, Pb e Cu foram os que se mostraram mais danosos para a microbiota de fungos. (SANTOS et al, 2007; DIAS-JUNIOR, 1998)

Segundo Quiñones (2004), a drenagem ácida pode aumentar os níveis de metais pesados no solo devido ao intemperismo causado pela água da chuva, nos estéreis de mineração expostos.

A diminuição da quantidade de unidades formadoras de colônias de bolores e leveduras observada no fragmento de vegetação espontânea e reabilitação de 2 anos no período chuvoso pode estar ligado ao aumento da concentração de metais pesados no solo, uma vez que os microrganismos estão diretamente expostos aos rejeitos de mineração na vegetação espontânea, ou pela exposição de estéreis visto nos estudos de monitoramento da área de reabilitação de 2 anos, diferentemente das demais áreas que apresentam o solo mais conservado.

Apesar das hipóteses apresentadas no presente estudo possuírem fundamentos já bastante descritos na literatura, ainda se faz necessário mais estudos que correlacionem as populações de bolores e leveduras com as variáveis

ambientais indicadas para o monitoramento de áreas em reabilitação, como forma de avaliar a influência que eles exercem um sobre o outro.

3.3.2 Heterotróficos

Ao contrário dos dados obtidos nas análises de bolores e leveduras, a distribuição das populações de bactérias heterotróficas seguiram um padrão nas diferentes estações amostrais e períodos de coleta.

Na primeira coleta, o fragmento de vegetação espontânea apresentou o menor número de unidades formadoras de colônia (5×10^5 UFC/g), sendo seguido pelo remanescente florestal (11×10^5 UFC/g). As duas áreas em processo de reabilitação foram as áreas que apresentaram o maior número de unidades formadoras de colônias de bactérias heterotróficas, sendo que, dentre elas, a área com o tempo de reabilitação mais antigo apresentou um número menor (26×10^5 /g) que a área mais recente (51×10^5 UFC/g), assim como ocorrido com as populações de bolores e leveduras.

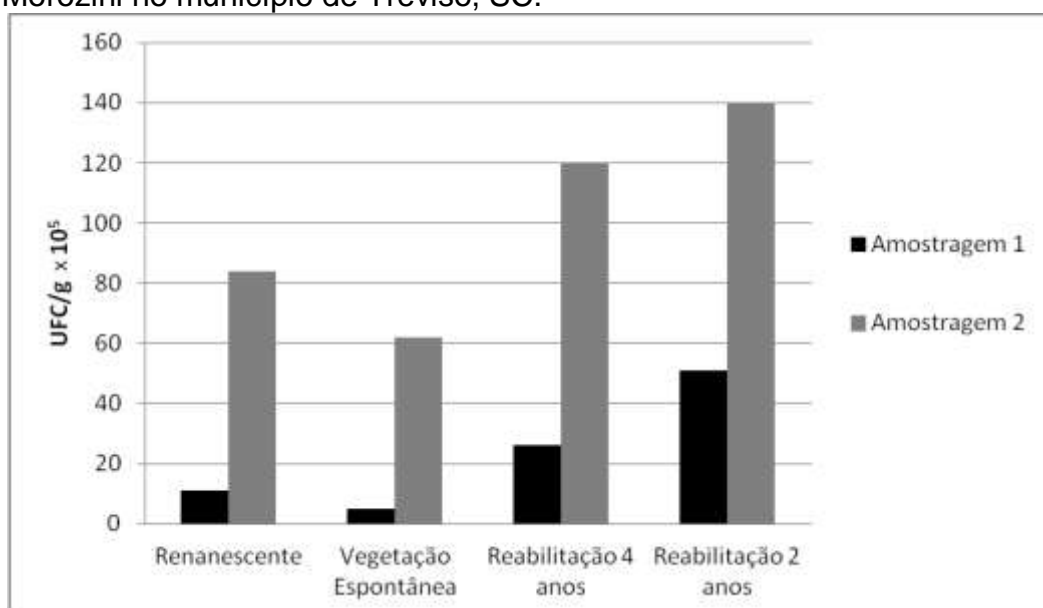
Na segunda coleta, todas as estações amostrais apresentaram um aumento na quantidade de unidades formadoras de colônias, seguindo o mesmo padrão da primeira coleta, onde a área de reabilitação mais recente e a mais antiga apresentaram os maiores valores (140×10^5 UFC/g e 120×10^5 UFC/g respectivamente), seguidos pelo remanescente florestal (84×10^5 UFC/g) e por fim o fragmento de vegetação espontânea (62×10^5 UFC/g) (Figura 25).

A distribuição das bactérias heterotróficas no remanescente e na reabilitação de 4 anos apresentam-se, de certa forma, semelhante a distribuição das populações de bolores e leveduras para essas mesmas áreas.

Diferentemente dos bolores e leveduras, nas análises de heterotróficos, o remanescente apresentou maior número de colônias quando comparado ao fragmento de vegetação espontânea.

Segundo Dionísio (1996) o crescimento das bactérias heterotróficas se dá em maior quantidade em ambientes que o pH se localiza entre 6,5 e 7,5. Ao contrário do que acontece nas populações de bolores e leveduras.

Figura 25- Valores obtidos em UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama de solo) para populações de heterotróficos em solos do campo Morozini no município de Treviso, SC.



Fonte: Do autor

Como a área de vegetação espontânea se apresenta disposta sobre uma pilha de estéril e apresenta um menor valor de pH, a população de bactérias heterotróficas pode estar diminuída devido a esses fatores, uma vez que são mais sensíveis que a população de fungos e não resistem a valores de pH muito baixos.

Da mesma forma que os bolores e leveduras, a maior quantidade de unidades formadoras de colônias de heterotróficos nas áreas de reabilitação pode estar ligada ao processo de correção das características físicas, químicas e microbiológicas implantado nessas áreas. Após a modelagem com argila, foi realizada a incorporação de nitrogênio com cama de aviário, turfa e fertilizantes (IPAT, 2009).

No período de chuva foi possível observar um aumento de unidades formadoras de colônias de bactérias heterotróficas em todas as estações amostrais. OSAKI (2008) mostrou que as bactérias do solo têm um aumento de sua população nos períodos de maior temperatura e pluviosidade.

Esses fatores, registrados no período da segunda amostragem, podem ter aumentado o número de unidades formadoras de colônias de bactérias heterotróficas no solo. Porém esses dados não corroboram totalmente com os dados encontrados nas populações de bolores e leveduras, que apresentaram uma

diminuição no período chuvoso nas áreas de vegetação espontânea e reabilitação de 2 anos.

Um parâmetro que deve ser analisado em um futuro estudo, é a presença de micro-organismos esporulantes. Segundo Costa *et al.* (2010) esses organismos são extremamente resistentes, podendo sobreviver em condições ambientais adversas através de estruturas denominadas endósporos. Dessa forma, a quantidade de endósporos em uma determinada área pode ser utilizada como parâmetro para medir a agressividade do ambiente, podendo ser utilizada para medir qualidade de água ou solo (FIGUEIREDO-FILHO, 2011).

4 CONCLUSÃO

Por meio da avaliação dos parâmetros físico-químicos do solo, foi possível observar que os solos do remanescente florestal e da área em reabilitação há 4 anos apresentam-se mais semelhantes entre si apresentando um ambiente mais propício para as populações microbianas. Enquanto os solos de vegetação espontânea e da área em reabilitação há 2 anos apresentam um padrão semelhante entre si.

O método de quantificação de biomassa microbiana por meio da fumigação e incubação não se mostrou eficiente para os solos estudados. Quanto ao método de fumigação e extração, no presente estudo não apresentou resultados satisfatórios, porém, ressalta-se a necessidade de mais estudos para a adequação dessa metodologia nas áreas de mineração.

Por meio da observação dos resultados foi possível de caracterização microbiológica do solo do presente estudo, foi possível observar que as áreas do remanescente e em reabilitação há 4 anos apresentaram os mesmos padrões, assim como a área de vegetação espontânea seguiu os mesmos padrões que a área de reabilitação de 2 anos se tratando de bolores e leveduras. O que leva a crer, por meio desses resultados que a área de reabilitação de 4 anos se apresenta em melhor estado. Porém, as amostragens de bolores e leveduras não mostraram seguir um padrão, por isso, se fazem necessários estudos relacionando a comunidade de bolores e leveduras com os aspectos das teorias apresentadas neste trabalho.

Ao contrário dos bolores e leveduras, os heterotróficos apresentaram um padrão de distribuição entre as duas amostragens, mostrando que são menos variáveis e podem apresentar resultados mais confiáveis sobre a qualidade do solo no presente estudo.

Embora as análises de bolores e leveduras e as análises de micro-organismos heterotróficos tenham apresentado algumas diferenças em seus resultados, as duas análises se mostraram bastantes satisfatórias, porém mais estudos são necessários para descrever melhor a dinâmica e os fatores que influenciam as populações de micro-organismos, para utilizá-las como ferramenta de monitoramento de áreas degradadas pela atividade carbonífera.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.M. **Método fundamentado em processamento digital de imagens para contagem automática de unidades formadoras de colônias**. 2006, 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Computação) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2006.
- AMARAL, J. E.; Krebs, A. S. J. Drenagem ácida da mineração de carvão e sua inter-relação com metais pesados e recarga de aquíferos na bacia carbonífera do estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS, 17. 2010, São Luís. **Anais Eletrônicos...** São Luís: Acqua Consultoria, 2010. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/media/evento_PAP002685.pdf> Acessado em: 27/10/2012.
- ANDRADE, B.G.N. **Biorremediação de solos contaminados por óleo diesel com o uso da microbiota nativa**. 2009. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro. 2009
- ANTONINI, S.R.C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Araras: Centro de Ciências Agrárias, 2004. 33 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14283: Resíduos em solos – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro: 1999. p. 08.
- BERNARDAES, R. S. ; SOARES, S. R. A. **Fundamentos da Respirometria no controle de poluição da água e do solo**. Brasília: Editora Universidade de Brasília/Finatec, 2005. 164p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 62 - Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Brasília, 2003.
- COSTA, S.; ZOCHE, J.J.; SOUZA, P.Z. Absorção de metais pesados (Zn e Pb) por *Axonopus obtusifolius* (Raddi) em áreas degradadas pela mineração de carvão, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 795-797, 2007.
- COSTA, E. L. N; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L.; FIUZA, L. M. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 6, n. 38 p. 4-13, 2010. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio38/bio_38.pdf> Acessado em: 28/10/2012.
- DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. **Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: Método da fumigação-extração**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 10 p. 1997.

DERKS, Y. M. **Uso da respirometria para avaliar a influência de fatores operacionais e ambientais sobre a cinética de nitrificação**. 2007. 87 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 386p. il. 2010.

DIAS-JUNIOR, H. E.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; SILVA, R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 631-640, 1998.

DIONÍSIO, J. A. Atividades microbianas em diferentes sistemas de cultivo de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex Maiden). 1996. 90 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

EPAGRI. **Dados e informações biofísicas da unidade de planejamento regional litoral sul catarinense-UPR 8**. Boletim técnico. 77p. Epagri/Ciram. Florianópolis, 2001.

EPAGRI-CIRAM. **Monitoramento dos fenômenos climáticos e seus impactos – Climatologia de chuvas**. Florianópolis, 2012. Disponível em: <<http://ciram.epagri.sc.gov.br/portal/website/index.jsp?url=jsp/monitoramento/climatChuvas.jsp&tipo=monitoramento>> Acessado em: 03/10/2012.

FIGUEIREDO-FILHO, Y. A. **Contaminação dos solos e das águas subterrâneas por sepultamento de carcaças de animais no solo**. 2011. 190 f. Dissertação (Mestrado em Geografia Física) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FONTANA, N. N. **Avaliação de três diferentes meios de cultura para a quantificação de microrganismos do solo em sistema de plantio direto e convencional**. 2010. 42 f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) - União Dinâmica de Faculdades Catarata, Foz do Iguaçu, 2010.

FORTES-NETO, P.; FERNANDES, S.A.P.; JAHNEL, M.C. Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo e do ambiente. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas, SP: Instituto Agrônomo Campinas, 2007. p. 259-274.

GAIVIZZO, L. H. B.; VIDOR, C.; TEDESCO, M. J.; BISSANI, C. A. Potencial poluidor de rejeitos carboníferos. II- Efeitos da recuperação com camadas de solo sobre as plantas e a população microbiana. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p. 955-961, 2002.

GHIZELINI, A, M. **Sucessão de fungos em acículas de *Pinus Taeda* em decomposição**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GLANZ, J. T. **Saving our soil: solutions for sustaining Earth's vital resource**. Colorado: Johnson Books, 1995. 182 p.

GOOGLE. Programa Google Earth, 2012.

GRIFFITH, J. J. **Recuperação Conservacionista da Superfície de Áreas Mineradas: uma revisão de literatura**. Boletim Técnico, Viçosa-MG: Sociedade de Investigações Florestais, UFV, 106 p, 1980.

HUNGRIA, M; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542 p.

INDA, A. V.; QUINÕES, O. R. G.; GIASSON, E.; DICK, D. P.; NASCIMENTO, P. C. Atributos químicos relacionados ao processo de sulfurização em solos construídos após a mineração. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.5, p.1060-1067, mai. 2010.

IPAT/UNESC. **Diagnóstico Ambiental Campo Morozini**. Relatório Técnico. 144 p. Criciúma, 2007.

IPAT/UNESC. **Projeto de reabilitação ambiental de áreas degradadas do campo Morozini (Treviso, SC)**. Relatório Técnico. 157 p. Criciúma, 2009.

IPAT/UNESC. **Monitoramento do campo Morozini**. Relatório Técnico. 21 p. Criciúma, 2012.

JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil – I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology and Biochemistry**, v.8, n.3, p. 167-177, ago. 1976.

KLEIN, A. S. **Áreas degradadas pela mineração de carvão no sul de Santa Catarina: vegetação versus substrato**. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2006.

KOPPE, J. C.; COSTA, J. F. C. L. A lavra de carvão e o meio ambiente em Santa Catarina. In: SOARES, P. S. M.; SANTOS, M. D. C.; POSSA, M. V. **Carvão brasileiro: tecnologia e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. p. 25-38. il.

LUNARDI-NETO, A.; ALBUQUERQUE, J. A.; ALMEIDA, J. A.; MEDEIROS, J. C.; ALBERTON, A. Atributos físicos do solo em área de mineração de carvão influenciados pela correção da acidez, adubação orgânica e revegetação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 4 p.1379-1388, 2008.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. **Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos de cerrado e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste/MT**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2002. 24 p.

MELLONI, R. Quantificação microbiana da qualidade do solo. In: INSTITUTO AGRONÔMICO CAMPINAS. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Silveira Freitas, 2007. p.193-218.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais**: Amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010. 386p. il.

OSAKI, F. **Distribuição espacial de microrganismos e fertilidade em solos de dois ecossistemas florestais**: Lloresta ombrófila e povoamento florestal com *Pinus taeda* L. em Tijucas-PR. 2008. 281f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PEET, R. K. Community and ecosystem Function. In: CLENN-LEWIN, D. C.; PEET, R. K.; VEBLEN, T. T. **Plant succession - theory and prediction**. London: Chapman & Hall, 1992. p. 103-140.

PFENNING, L. H.; ABREU, L. M. Fungos do solo como saprófitos e patógenos de plantas. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais**: Amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010. 386p. il.

PHILOMENA, G. L. B. **Cultura do Carvão em Criciúma-SC**: a história que não se conta. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2005.

QUINONES, O. R. G. **Caracterização de solos construídos após a mineração de carvão na mina Boa Vista, município de Minas do Leão, RS**. 2004. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidad Nacional de Asunción, Asunción, 2004.

QUINONES, O. R. G.; JUNIOR, A. V. I.; GIASSON, E.; BISSANI, C. A.; DICK, D. P. Característica de solos construídos após a mineração de carvão relacionadas ao processo de construção e à composição do material utilizado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 6, p.1564-1571, 2008.

RECHE, M. H. L. R.; PITTOL, M.; FIUZA, L. M. Bactérias e bioindicadores de qualidade de águas de ecossistemas orizícolas da região sul do Brasil. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 2, p. 452-463, 2010.

RIBAS, T. B. C.; FORTES-NETO, P. Disposição no solo de efluentes de esgoto tratado visando a redução de coliformes termotolerantes. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 3, n. 3, p. 81-94, 2008.

ROSS, D. J. Measurement of microbial biomass C and N in grassland soils of fumigation-incubation procedures: influence of inoculum size and the control. **Soil Biology Biochemistry**, Lower Hutt, v.22, p.289-294, 1990.

SANTA CATARINA (estado). Lei nº 14.283, de 13 de abril de 2009. Disponível em: <http://www.sc.gov.br/downloads/Lei_14675.pdf> Acessado em: 19/09/2011.

SANTOS, L. C.; ANTONIOLLI, Z. I.; LEAL, L.T.; LUPATINI, M. População de bactérias e fungos no solo contaminado com cobre nas minas do Camaquã, RS, Brasil. **Ciência e Natura**. Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 105-114, 2007.

SOUTO, P. T.; SOUTO, J. S.; MIRANDA, J. R. P.; SANTOS, R. V.; ALVES, A. R. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.32, n.32, p. 151-160, 2008.

TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Boletim técnico, Porto Alegre, n.5, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology Biochemistry**, Columbia, v.19, p. 703-707, 1987.

WARDLE, D. A.; HUNGRIA, M. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Micro-organismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 195-216.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciências e Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZUCCARI, M. L.; GRANER, C. A. F.; LEOPOLDO, P. R. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO). **Revista Energia na Agricultura**. Botucatu, v.20, n.4, p. 69-82, 2005.