

Emanuela Pille da Silva

**ATRIBUTOS DO SOLO E COMUNIDADES
MICROBIANAS ASSOCIADAS À BRACATINGA (*Mimosa
scabrella* Benth.) EM ÁREAS DE MINERAÇÃO DE CARVÃO EM
RECUPERAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto
Fonseca Sousa Soares
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Dutra
de Armas

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Emanuela Pille da
ATRIBUTOS DO SOLO E COMUNIDADES MICROBIANAS ASSOCIADAS À
BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Benth.) EM ÁREAS DE MINERAÇÃO
DE CARVÃO EM RECUPERAÇÃO / Emanuela Pille da Silva ;
orientador, Cláudio R. F. S. Soares ; coorientador, Rafael
Dutra de Armas. - Florianópolis, SC, 2016.
101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. revegetação. 3.
monitoramento. 4. microrganismos. I. Soares, Cláudio R. F.
S.. II. Armas, Rafael Dutra de. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. IV. Título.

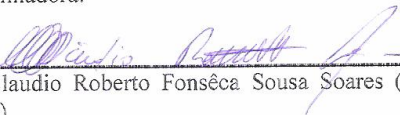
Atributos do solo e comunidades microbianas associadas à bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) em áreas de mineração de carvão em recuperação

por


Emanuela Pille da Silva

Dissertação julgada e aprovada em 26/02/2016, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.


Banca Examinadora:




Prof. Dr. Claudio Roberto Fonsêca Sousa Soares (Presidente - CCB/UFSC)



Dr.ª Edilane Rocha Nicoleite (Externo - SATC/SC)



Prof.ª Dr.ª Patricia Dorn de Quadros (Externo - UFRGS/RS)



Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2016

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luis e Terezinha, pela compreensão da minha ausência e incentivo a seguir na carreira acadêmica.

Às minhas irmãs, Andréa, Juliana e Paula, pela colaboração no dia a dia.

Ao meu noivo Matheus, pelo apoio e incentivo na execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal Santa Catarina pela oportunidade de realização do curso de Pós-Graduação.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Berna, pelo auxílio e prestatividade.

Ao Mauro da SATC pela ajuda na definição das áreas e acompanhamento à campo.

Ao Paulo Avelar, pelo auxílio nas análises.

Aos professores Márcio e Admir, pelo aprendizado nestes anos de convívio.

Aos Professores Cláudio e Rafael pela orientação, amizade e motivação.

A Kelly Justin, pelas trocas de informações e pela amizade.

Aos meus companheiros de laboratório, principalmente, a Anabel e ao Douglas pelo convívio diário, pelas risadas e por sempre estarem prontos para ajudar no que fosse preciso.

À Diana, pela troca de idéias nestes momentos finais.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos o meu sincero muito obrigada!

A importância dos infinitamente pequenos é
infinitamente grande (Louis Pasteur).

RESUMO

A exploração do carvão mineral em SC, em épocas de forte demanda pelo combustível, acarretou em mudanças no ambiente especialmente nas características químicas, físicas e biológicas do solo, fazendo da revegetação uma alternativa para a recuperação destas áreas. Dentre as espécies implantadas no processo de revegetação encontra-se a bracatinga, espécie arbórea com alta rusticidade e adaptabilidade à ambientes adversos. Entretanto, o monitoramento do processo de recuperação dessas áreas é fundamental e, dentre os parâmetros que influenciam no avanço desse processo estão os microbiológicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os atributos do solo e a estrutura de comunidades microbianas associadas à bracatinga e suas relações com o estágio de recuperação de áreas degradadas pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina. Na projeção das copas de bracatinga, amostras de solo foram coletadas em Áreas de Preservação Permanente com diferentes tempos de revegetação (2, 4, 6 e 12 anos), e em uma área controle (preservada) com ocorrência natural da bracatinga. Foram avaliados atributos químicos do solo, como pH, macronutrientes (N, P e K), carbono orgânico total (COT) e elementos-traço, assim como, os teores foliares de N e elementos-traço nas folhas de bracatinga. Os atributos microbiológicos avaliados foram carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM), respiração basal (RBM), quociente metabólico (qCO_2), unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos e bactérias e a estrutura de comunidades de fungos e bactérias edáficos e endofíticos da bracatinga por PCR-DGGE. Os atributos químicos do solo apresentaram pouca relação com o tempo de recuperação das áreas impactadas. Já os atributos microbiológicos NBM, CBM, RBM e qCO_2 , responderam rapidamente ao tempo de revegetação das áreas, mostrando potencial de serem utilizados no monitoramento do processo de recuperação. A estrutura da comunidade fúngica endofítica, apresentou relação com o tempo de recuperação, sendo necessário o emprego de técnicas mais sensíveis afim de identificar e inferir funcionalidades para o crescimento vegetal. Este aspecto é determinante no processo de recuperação de áreas degradadas, pois quanto maior for a redundância funcional estabelecida em um ambiente, maior será sua resiliência, fornecendo assim, condições para a recuperação das áreas degradadas pela mineração de carvão.

Palavras-chave: revegetação; monitoramento; microrganismos.

ABSTRACT

The exploitation of coal in Santa Catarina State (SC), Brazil, during periods of intense demand for the fuel, resulted in drastically environmental changes in soil features (chemical, physical and biological), and revegetation is an important alternative for recovery of these areas. Among the species implanted in the revegetation process is the *bracatinga*, tree species with high hardiness and adaptability to adverse environments. However, in addition to performing the revegetation, it is critical to maintain a constant monitoring of the recovery process, especially the microbiota. Thus, the present study aimed to evaluate the soil attributes and microbial community structure associated with *bracatinga* and their connection with the time recovery of degraded areas by coal mining in SC. Soil samples, from under the canopy of trees were collected in permanent protection area with different times of revegetation (2, 4, 6 and 12 years), and also in a control area, with natural occurrence of *bracatinga*. The soil composition of macronutrients (N, P and K), total organic carbon (TOC) and trace elements were determined, as well as its pH. Also, foliar N and trace elements of *bracatinga* leaves were quantified. The microbiological attributes obtained were microbial biomass carbon and nitrogen (C_{mic} and N_{mic}), basal respiration (BR), metabolic quotient ($q\text{CO}_2$), colony forming units (CFU) of fungi and bacteria, community structure of edaphic and endophytic fungi and bacteria of *bracatinga* by PCR-DGGE. The soil chemical attributes showed poor relationship with the time of recovery of impacted areas. Microbiological attributes C_{mic}, N_{mic}, BR and $q\text{CO}_2$ responded quickly to the revegetation of time the areas, which reveals a propensity for recovery monitoring parameter. The structure of endophytic fungal community were related to the time of recovery, what implies in the use of more sensitive techniques, in order to identify and infer functionalities of this group. This is a determining factor in the recovery process, because with higher level of functional redundancy established in an environment, it will guide to a higher resilience which provides conditions for the recovery of degraded areas by coal mining.

Keywords: revegetation; monitoring; microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de carvão mineral e seus usos.....	21
Figura 2: Principais bacias carboníferas brasileiras	23
Figura 3: Jazida Sul-Catarinense.	25
Figura 4: (A) Localização das áreas de coleta no estado de Santa Catarina. (B) Visualização local das áreas de coleta na região carbonífera Catarinense. ...	43
Figura 5: Áreas degradadas pela mineração de carvão em distintos estágios de recuperação. (A) 2 anos (B) 4 anos (C) 6 anos (D) 12 anos de recuperação (E) área de ocorrência natural da bracatinga.	47
Figura 6: Análise de Componentes Principais dos atributos químicos e microbiológicos dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.	59
Figura 7: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de bactérias dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.....	60
Figura 8: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de fungos dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard eo método de agrupamento UPGMA.....	62
Figura 9: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de bactérias do tecido foliar de bracatinga em áreas de mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard eo método de agrupamento UPGMA..	64
Figura 10: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de fungos do tecido foliar de bracatinga em áreas de mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard eo método de agrupamento UPGMA..	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Localização e características das áreas em distintos estágios de recuperação na região carbonífera de Criciúma.	44
Tabela 2 - Análise química de solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação e valores de prevenção preconizados pela CETESB	56
Tabela 3 - Teores foliares de N e elementos-traço na Bracatinga implantadas em áreas de mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação e faixa de valores de elementos-traço considerados fitotóxicos segundo Kabata-Pendias (2011).	57
Tabela 4 - Atributos microbiológicos de solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.....	58
Tabela 5 - Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (<i>Pairwise</i>) baseado nos perfis de amplicons da região 16S rRNA de bactérias presentes nos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação..	61
Tabela 6 - Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (<i>Pairwise</i>) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.	63
Tabela 7 - Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (<i>Pairwise</i>) baseado nos perfis de amplicons da região 16S rRNA de bactérias do tecido foliar de bracatinga em áreas degradadas pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.....	65
Tabela 8 - Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (<i>Pairwise</i>) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos do tecido foliar de bracatinga em áreas degradadas pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação..	67
Tabela 9 - Número de amplicons obtidos a partir da análise da DGGE para comunidade de fungos e bactérias do solo e endofíticas do tecido foliar de bracatinga em áreas degradadas pela mineração de carvão em recuperação.	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISAO DE LITERATURA	21
2.1. CARVAO MINERAL: RESERVAS ENERGÉTICAS E IMPORTANCIA NACIONAL	21
2.2. BACIA CARBONÍFERA CATARINENSE	24
2.2.1. Características da jazida	24
2.2.2. História da exploração econômica do carvão catarinense.	25
2.3. PASSIVOS AMBIENTAIS: CAUSAS E CONSEQUENCIAS	27
2.4. ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE (APP): LEGISLAÇÃO NAS ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERÇÃO	29
2.5. REVEGTAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DAS ÁREAS DEGRADADAS	31
2.6. LEGUMINOSAS ARBÓREAS NA RECUPERAÇÃO AMBIENTAL: BRACATINGA UMA ESPÉCIE EM POTENCIAL.....	33
2.7. INDICADORES AMBIENTAIS EMPREGADOS NA REGIAO CARBONÍFERA DE CRICIÚMA-SC	35
2.8. INTERAÇÕES PLANTA-MICRORGANISMOS	35
2.8.1. Microrganismos edáficos	35
2.8.2. Microrganismos endofíticos	37
2.9. FERRAMENTAS MOLECULARES NO ESTUDO DE MICRORGANISMOS EM ÁREAS DEGRADADAS	38
3. HIPÓTESE	41
4. OBJETIVOS	41
4.1. OBJETIVO GERAL	41
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5. MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1. LOCAIS DE COLETA	43
5.2. HISTÓRICO DAS ÁREAS	43
5.3. COLETA DE FOLHAS DE BRACATINGA	48
5.4. AMOSTRAS DE SOLO	48
5.5. ATRIBUTOS QUÍMICOS	49
5.5.1. Análise química do solo e do tecido foliar de bracatinga ..	49
5.6. ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS	49
5.6.1. Contagem de bactérias e fungos do solo	49
5.6.2. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana	50
5.6.3. Determinação da respiração basal microbiana	50
5.7. ANÁLISES MOLECULARES	51

5.7.1. Extração de DNA de microrganismos edáficos e endofíticos	51
5.7.2. Análise da estrutura de comunidades de microrganismos edáficos e endofíticos	51
5.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
6. RESULTADOS	55
6.1. ANÁLISES QUÍMICAS	55
6.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	57
6.3. ANALISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	58
6.4. ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS EDÁFICAS E ENDOFÍTICAS	59
6.4.1. Solo	59
6.4.2. Endofíticos	63
6.4.3. Número de amplicons	67
7. DISCUSSAO	69
7.1. ATRIBUTOS QUÍMICOS	69
7.2. ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS	72
7.3. ANÁLISES MOLECULARES	76
8. CONCLUSOES	79
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	81
REFERENCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

As reservas carboníferas catarinenses foram intensamente exploradas em épocas de grande demanda pelo combustível, em detrimento da crise do petróleo. Entretanto, as atividades de lavra para extração do carvão foram desenvolvidas sem o planejamento adequado e nem observando os padrões de recuperação necessários e indispensáveis para manter a qualidade do meio ambiente. Neste contexto, a grande quantidade de rejeitos e estéreis gerados resultou na contaminação da água e do solo na região carbonífera de Santa Catarina, alterando a capacidade de uso do solo.

Atualmente, medidas legislativas mais rígidas estão sendo adotadas a fim de obrigar os responsáveis pela geração destes passivos ambientais à recuperarem as áreas degradadas, assim como, regulamentar a atividade atualmente em execução. A recuperação de tais áreas tem sido realizada utilizando-se o processo de revegetação. Esta consiste na implantação de uma cobertura vegetal, visando não somente a recuperação paisagística, mas também o controle de processos erosivos e das propriedades do solo, fornecendo subsídios para o aumento da resiliência destes locais.

Entretanto, para o sucesso deste processo, é necessária a utilização de espécies que consigam sobreviver em tais locais, adaptando-se aos solos degradados. Para as áreas de preservação permanente (APP) é preconizado pela legislação o uso de espécies arbóreas. Entre as espécies utilizadas nos projetos de recuperação encontra-se a bracatinga. Esta é uma espécie pioneira, de rápido crescimento e amplamente empregada em programas de revegetação de ambientes degradados. Apesar da bracatinga possuir interações com microrganismos bem estudadas, como aquelas desenvolvidas com os diazotróficos simbiotes, pouco se conhece sobre os demais microrganismos a ela associados.

É reconhecida a importância dos microrganismos no ecossistema, entretanto, pouco tem sido estudado sobre estes em áreas degradadas pela mineração de carvão. Os microrganismos possuem distintas estratégias e habitats para crescimento, sendo capazes de viver em íntimo contato com espécies vegetais como em simbiose ou em associação, ou até mesmo em vida livre. A microbiota realiza inúmeros processos envolvidos no equilíbrio das propriedades físicas e químicas do solo e também beneficia o crescimento das espécies vegetais tanto

direta quanto indiretamente, garantindo a sustentabilidade dos ecossistemas.

Numerosas metodologias empregando microrganismos edáficos vêm sendo propostas para avaliação dos microrganismos em ambientes degradados, de modo a fornecer informações rápidas sobre o grau de recuperação das áreas impactadas. Entretanto, em áreas degradadas pouco se sabe sobre a comunidade microbiana relacionada com as plantas, denominada comunidade endofítica.

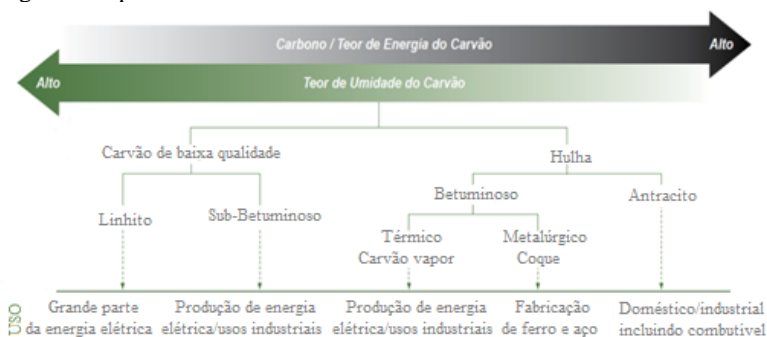
Deste modo, a presente proposta de trabalho teve como objetivo avaliar metodologias clássicas de monitoramento de atributos microbiológicos, bem como, avaliar as comunidades microbianas edáficas e endofítica associada à bracatinga utilizando-se técnicas moleculares, em áreas de mineração de carvão em recuperação. O intuito do presente trabalho foi selecionar parâmetros microbiológicos que possibilitassem o monitoramento do processo de recuperação, para serem avaliados conjuntamente com os atualmente adotados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CARVÃO MINERAL: RESERVA ENERGÉTICA E IMPORTÂNCIA NACIONAL

O carvão mineral é um combustível fóssil sólido formado a partir da matéria orgânica de vegetais depositados em bacias sedimentares. Estes materiais vegetais submetidos à ação de pressão e temperatura em ambiente sem contato com o ar, devido ao soterramento e aos movimentos da crosta terrestre ao longo do tempo geológico, se solidificaram e enriqueceram em carbono, em um processo denominado carbonificação (BORBA, 2001). O carvão é formado, além de carbono, por oxigênio, nitrogênio, enxofre e traços de outros elementos, podendo ainda estar associado a outros elementos rochosos (arenito, siltito, folhelhos e diamictitos) e minerais, como a pirita (ANEEL, 2008). Quanto mais intensas a pressão e a temperatura a que a camada de material vegetal for submetida, e quanto mais tempo durar o processo, maior será o grau de carbonificação, conferindo ao carvão maior poder calorífico, bem como qualidade para a indústria. Os diversos estágios de carbonificação permitem a classificação do carvão em “*rank*” qualitativos, sendo que do menor para o maior *rank*, estão: turfa, linhito, carvão sub-betuminoso, carvão betuminoso e antracito (Figura 1). O estágio mínimo para a utilização industrial do carvão é o linhito (BORBA, 2001; GOMES; CRUZ; BORGES, 2003).

Figura 1: Tipos de carvão mineral e seus usos.



Fonte: Modificado WCI (2015).

Outro índice qualitativo do carvão é o *grade*, que mede as relações matéria orgânica/matéria inorgânica numa camada de carvão, bem como, as características da matéria inorgânica presente. Neste caso a matéria inorgânica é representada, fundamentalmente, pelos teores de cinzas e de enxofre. Deste modo, um baixo *grade* significa que o carvão possui um alto percentual de cinzas misturado à matéria carbonosa, diminuindo assim sua qualidade (BORBA, 2001; GOMES; CRUZ; BORGES, 2003).

No Brasil, as principais reservas de carvão mineral são as do tipo sub-betuminoso e betuminoso. Elas ocorrem em coberturas plataformais do flanco leste da Bacia do Paraná, onde as camadas de carvão de idade Permiana pertencem à Formação Rio Bonito do Grupo Guatá (Supergrupo Tubarão), no sul-sudeste brasileiro (Figura 2) (BORBA, 2001; GOMES; CRUZ; BORGES, 2003). Em São Paulo há depósitos sem qualquer relevância econômica e, portanto, pode-se dizer que as jazidas nacionais encontram-se inseridas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BORBA, 2001; GOMES; CRUZ; BORGES, 2003).

Devido às características de formação da Bacia do Paraná, as camadas carboníferas formadas tendem a ser irregulares e de pequena espessura, com *rank* e *grade* de pobres a medianos (BORBA, 2001; GOMES; CRUZ; BORGES, 2003).

Considerando as reservas totais de carvão mineral no território nacional (reservas medidas, inferidas e indicadas), no estado do Rio Grande do Sul estão localizadas cerca de 90,64% das reservas, correspondendo a 21,4 bilhões de toneladas (t) e no estado de Santa Catarina encontram-se 9,32% das reservas, o equivalente a 2,2 bilhões de t. Já o restante das reservas (0,04%), encontram-se distribuídas nos estados do Paraná, São Paulo e Maranhão (94,7 milhões de t), totalizando em território nacional 23,6 bilhões de t (DNPM, 2010).

Figura 2: Principais bacias carboníferas brasileiras.



Fonte: GOMES; CRUZ; BORGES (2003).

Mundialmente, na composição da matriz energética global, o carvão fornece 30,1% das necessidades de energia primária, ficando apenas atrás do petróleo (BP, 2014). Entretanto, quando se considera a produção de eletricidade do mundo, esta matriz energética é a de maior participação, cerca de 40% (WEC, 2013; OECD & IEA, 2015).

No cenário nacional, considerando a equivalência energética, o carvão mineral representa 63,65% dos recursos e reservas das fontes não renováveis (petróleo, gás natural e energia nuclear) (EPE, 2015). A utilização do carvão mineral (vapor e metalúrgico) no Brasil encontra-se associada ao processamento em coquerias (49,66%), geração de energia elétrica (26,78%) e consumo final energético para fins industriais (23,56%) (EPE, 2015).

Apesar desta matriz energética apresentar baixa contribuição na oferta interna bruta de energia primária (5,64% em t.e.p.), o cenário futuro é de aumento da demanda, associada principalmente ao setor elétrico, do qual representa apenas 3,2% (carvão mineral e derivados) (ARAÚJO, 2014; EPE, 2015). Este fato deve-se a uma possível escassez de energia elétrica gerada por recursos hídricos (pela falta de água nos reservatórios), garantindo a eficiência energética nos estados do Sul do País. Seu consumo pelo setor industrial, associado à produção de aço, também deve ser levado em consideração (ARAÚJO, 2014).

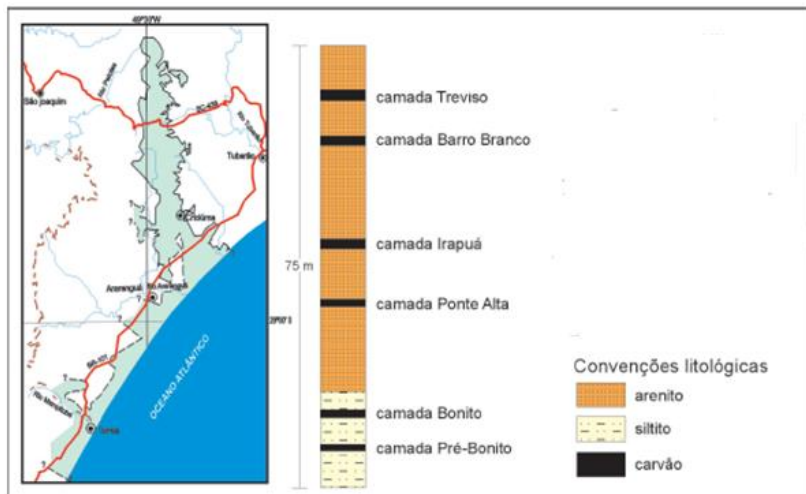
2.2. BACIA CARBONÍFERA CATARINENSE

2.2.1. Características da jazida

A bacia carbonífera catarinense, em extensão, ultrapassa os 85 km de comprimento, possuindo uma largura variável entre 5 e 20 km. Dez camadas de carvão ocorrem neste depósito, mas apenas duas têm importância econômica: Barro Branco e Bonito (Figura 3). A camada Barro Branco possui espessuras médias nas áreas mineradas, em torno de 1,60 m. Já a camada Bonito é mais espessa, porém com grade inferior à Barro Branco. As coberturas vão de camadas aflorantes até mais de 800 m. Os setores lavráveis a céu aberto estão quase esgotados para a camada Barro Branco, por questões econômicas e ambientais (GOMES; CRUZ; BORGES, 2003).

O carvão da Camada Barro Branco é classificado pelo *rank* como Betuminoso. Entretanto, na região da Jazida Sul-Catarinense, muito localmente, existem carvões que podem ser classificados no grau de antracito, com valores de venda mais elevados que os produtos usuais da Jazida (GOMES; CRUZ; BORGES, 2003).

Figura 3: Jazida Sul-Catarinense.



Fonte: Modificado de GOMES; CRUZ; BORGES (2003).

2.2.2. História da exploração econômica do carvão catarinense

Segundo Goularti Filho & Moraes (2009), a expansão do complexo carbonífero catarinense envolvendo marcos importantes pode ser dividida em cinco etapas:

- A primeira de 1884 a 1946 (minas-ferrovia-portos): esta etapa tem como marco inicial a entrada em operação da ferrovia e dos portos de Laguna (exportando carvão) e Imbituba. Estas três unidades, que foram acrescidas de várias companhias carboníferas a partir da Primeira Guerra Mundial, seguiram até 1946 sem grandes alterações. Neste período toda a produção de carvão era destinada ao transporte ferroviário e navegação.
- A segunda de 1946 a 1965 (minas-ferrovia-lavador-porto): nessa fase, foi incorporado o complexo o Lavador de Capivari, que beneficiava o carvão destinado às siderúrgicas. A partir de 1946, o porto de Laguna foi abandonado e o de Imbituba consolidou-se como o único porto carvoeiro do País. A partir de então o carvão catarinense passou a ser também utilizado nas siderúrgicas.
- A terceira de 1965 a 1979 (minas-ferrovia-lavador-termoelétrica-porto): em 1965 entrou em operação a termoelétrica, gerando energia para grande parte do território

catarinense. Com a inserção desta nova unidade no complexo, passou-se a melhor utilizar o carvão catarinense. Além da parte metalúrgica, também era aproveitado o carvão-vapor (energético). Porém, ainda eram desperdiçados 75% da produção.

- A quarta de 1979 a 1990/1994 (minas-ferrovia-lavador-termoelétrica-carboquímica-porto): essa foi a fase em que o complexo estava quase completo, e o carvão era aproveitado na sua totalidade. Em 1979 entrou em operação a Indústria Carboquímica Catarinense (ICC), que aproveitava o rejeito piritoso, com alto teor de enxofre, e o transformava em ácido sulfúrico, que era adicionado ao ácido fosfórico, destinado à indústria de fertilizantes.
- A quinta e última etapa, após 1994 (minas-ferrovia-termoelétrica): com a política neoliberal, toda a parte estatal do complexo foi desativada. A Companhia Siderúrgica Nacional (CSN) fechou as unidades de extração (minas) e beneficiamento (lavador), a Petrobrás desativou a ICC e o porto parou de exportar o carvão metalúrgico. Além disso, a termoelétrica foi privatizada, e a ferrovia foi concedida à iniciativa privada. O desmonte foi parcial, porque ainda as minas continuam em operação fornecendo carvão para a termoelétrica, transportado pela ferrovia.

Deste modo, pode-se observar que o século XX foi um período de grande importância para a atividade carbonífera catarinense, que acarretou no crescimento de muitas cidades e de setores da economia. Entretanto, neste período, especial atenção deve ser dada à década de 1970 (BELOLLI et al., 2002; RAVAZZOLI, 2013). Com a ocorrência do primeiro choque do petróleo em 1973, o governo federal buscou fontes alternativas de energia, aumentando o consumo do carvão energético, passando este a ser utilizado no país inteiro como fonte energética aplicada à produção, consumo e transporte, substituindo o óleo combustível (BELOLLI et al., 2002; RAVAZZOLI, 2013). Tal fato levou ao aumento da produção de carvão, de minas mecanizadas de grande porte, de oferta de emprego, bem com, ao aumento de prejuízos à saúde do trabalhador e ao ambiente (RAVAZZOLI, 2013).

Devido ao fato, no final da década de 70, foram desenvolvidos estudos na região demonstrando dados quantitativos e qualitativos de extrema importância para o planejamento das ações governamentais e para o estabelecimento de uma política estadual de meio ambiente,

reforçando a necessidade do imediato enquadramento dessa região como "área crítica nacional" (MILIOLE et al., 2004). Tais estudos culminaram no Decreto n. 85.206, enquadrando a Região Sul de Santa Catarina como a 14ª Área Crítica Nacional para Efeito de Controle de poluição e Conservação da Qualidade Ambiental (BRASIL, 1980), para efeitos de controle da poluição gerada pelas atividades de extração, beneficiamento e usos do carvão mineral.

2.3. PASSIVOS AMBIENTAIS: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

Segundo o Sindicato da Indústria de Extração de Carvão do Estado de Santa Catarina (2015), existem 5.655 hectares impactados em superfície e 818 bocas de minas abandonadas na região carbonífera de Santa Catarina. Do total impactado, 3.511 hectares já possuem projetos de recuperação implantados ou em execução e outros 1.050 hectares tiveram seus projetos executados até o final de 2013.

Os métodos de lavra exerceram grande influência nos passivos ambientais gerados. Em Santa Catarina, desde o início dos trabalhos de mineração foram utilizadas a lavra a céu aberto e a lavra subterrânea (KOPPE & COSTA, 2008), onde o critério para seleção relaciona-se, essencialmente, com a profundidade da camada carbonífera (NICOLEITE et al., 2013). Inicialmente os métodos tiveram características manuais, evoluindo para uma fase semi-mecanizada e, posteriormente, mecanizada (KOPPE & COSTA, 2008).

As atividades de lavra a céu aberto, nas décadas passadas, não foram desenvolvidas com planejamento adequado e nem observaram os padrões de recuperação necessários e indispensáveis para manter a qualidade do meio ambiente no entorno das áreas mineradas (KOPPE & COSTA, 2008). Tal tipo de lavra envolveu a remoção de grandes volumes de estéril (rochas removidas para acesso às camadas de carvão mineral), formando cavas para acesso ao material a ser explorado, e pilhas de material resultante da escavação (KOOPE; COSTA, 2002). Nestas pilhas a camada de solo de maior fertilidade e atividade microbiana ficou soterrada por material contendo estéril, formado por arenitos, siltitos, folhelhos carbonosos e piritosos (MILIOLE et al., 2004; KOPPE & COSTA, 2008; NICOLEITE et al., 2013) e rochas de cobertura, possuindo estas pilhas até 20 m de altura, resultando no processo conhecido como inversão das camadas do solo (NICOLEITE et al., 2013). Isto trouxe dificuldades para a reabilitação destas áreas, afetando negativamente o estabelecimento da vegetação espontânea, e

favorecendo a disseminação de contaminantes no ecossistema adjacente (NICOLEITE et al., 2013).

A exploração do carvão a céu aberto resultou também em muitas áreas abandonadas, gerando diversos problemas, que incluíram, entre outros, geração de drenagem ácida de mina (DAM), impacto visual, erosão e liberação de gases para a atmosfera, comprometendo a qualidade do ar. Alguns desses impactos ainda persistem na região. Tais fatos contribuíram para que a lavra de carvão a céu aberto praticamente desaparecesse do cenário da mineração no estado de Santa Catarina (KOPPE & COSTA, 2008).

Em relação à lavra subterrânea, onde o acesso às camadas de carvão é realizado no subsolo através de galerias, apesar de não ocorrer a remoção das camadas de cobertura, os impactos ambientais estão relacionados ao beneficiamento do carvão e aos depósitos de rejeitos (produtos oriundos do beneficiamento do minério), e em menor quantidade, de estéreis (NICOLEITE et al., 2013).

Os depósitos de rejeito formados pelo beneficiamento do carvão mineral geram problemas devido à sua composição e disposição. Como os rejeitos carboníferos se originam do beneficiamento do carvão mineral, tendem a ter uma composição química semelhante ao seu material de origem, sendo constituídos por rocha fragmentada, compostos sulfurados, principalmente na forma de pirita (FeS_2) e carvão de baixa qualidade (GAIVIZZO et al., 2002; FINNEY; SHARIFI; SWITENBANK, 2009). Por serem ricos em sulfetos e elementos-traço, quando expostos às condições oxidantes do meio, são responsáveis pela formação de grande quantidade de ácido sulfúrico, que aumenta a solubilização de parte dos minerais e, conseqüentemente, dos elementos-traço que os constituem. Dessa forma, é adicionada grande quantidade de íons à água nas proximidades às minas, dando origem à um dos problemas mais sérios da região, conhecido como DAM (GAIVIZZO et al., 2002; GALATTO et al., 2007; CAMPOS et al., 2010), que também ocorre na lavra a céu aberto.

A DAM é gerada pela oxidação da pirita e a formação de ácido sulfúrico, sulfato e íons ferroso e férrico, catalisados principalmente pelas bactérias *Acidithiobacillus ferrooxidans* e *Thiobacillus denitrificans* (RUBIO, 1998 ab). O resultado desse processo oxidativo é a redução acentuada no pH do solo, atingindo valores inferiores a 4,0. Nessas condições de acidez, grande parte dos compostos contendo elementos-traço é solubilizada, ficando passível de lixiviação e contaminação de mananciais de água, além de dificultar o estabelecimento da vegetação no local contaminado (GAIVIZZO et al.,

2002; DIAS et al., 2005; FUNGARO; IZIDORO, 2006; CAMPOS et al., 2010). Devido a essas características, a mineração de carvão está entre os grandes causadores da disponibilização mundial de elementos-traço (RAYMOND & OKIEMEN, 2011). Esses elementos, em altas concentrações no meio ambiente, constituem um grave problema ambiental devido aos seus efeitos nocivos aos organismos (ZHENLI et al., 2005; PARAÍBA, 2006; PRÁ et al., 2006; SÁNCHEZ-CHARDI et al., 2008; OPAJA et al., 2012).

Deste modo, pode-se observar que, em época de alta da atividade, onde não havia preocupação com o descarte de materiais sobre o solo natural e corpos hídricos, assim como, seus impactos à biota associada, a exploração do carvão levou a geração de passivos ambientais. Como resultado, esses locais perderam ou diminuíram significativamente sua capacidade de auto recuperação, necessitando de intervenção ativa para reverter o quadro de degradação (STAHL et al., 2002; GONÇALVES, 2008; KOPPE & COSTA, 2008; NICOLEITE et al., 2013).

2.4. ÁREAS DE PRESERVAÇÃO PERMANENTE (APP): LEGISLAÇÃO NAS ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO

A partir do enquadramento da Região Sul de Santa Catarina como a 14^a área crítica nacional para efeito de controle de poluição e conservação da qualidade ambiental, foram desenvolvidas propostas de adequação ambiental da atividade. Em 1993, foi efetivamente instaurada uma Ação Civil Pública (ACP nº 93.8000533-4) pelo Ministério Público Federal visando controlar os passivos ambientais gerados pela atividade de mineração de carvão. A partir de então os responsáveis pela geração de tais passivos foram obrigados a iniciar a recuperação dos passivos ambientais decorrentes da exploração de carvão no estado de Santa Catarina. Inicialmente, a proposta foi colocada em prática sem critérios de execução, ficando a cargo dos responsáveis pela mineração realizarem a recuperação da forma que julgassem adequada. Posteriormente, foram estabelecidos os Critérios para Recuperação ou Reabilitação de Áreas Degradadas pela Mineração de Carvão, para que fosse possível tanto executar a recuperação, quanto acompanhar o progresso a partir da sua implementação (BRASIL, 2015a).

Estes critérios contam com medidas de recuperação de recursos hídricos superficiais e subterrâneos, assim como de superfícies terrestres. Em relação à superfície terrestre, a revegetação é a medida indicada e adotada para a elaboração dos projetos de reversão do

processo de degradação destas áreas. A elaboração desses Critérios Técnicos para Recuperação ou Reabilitação das Áreas Degradadas estabeleceu processos distintos de reversão da degradação para Áreas de Preservação Permanente (APP) e demais áreas não APPs.

Considerando a importância ambiental de tais áreas, nas consideradas APPs foi preconizado o processo de recuperação e para as demais áreas o processo de reabilitação. Cabe ressaltar que os distintos processos visam a reversão destas áreas à uma condição não degradada, variando de acordo com a futura finalidade de utilização pretendida. A diferença entre os processos de recuperação e restauração está estabelecida no segundo artigo do Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), incisos XIII e XIV, respectivamente (Lei 9.985/2000): recuperação é a restituição de um ecossistema ou de uma população silvestre degradada a uma condição não degradada, que pode ser diferente de sua condição original; restauração é a restituição de um ecossistema ou de uma população silvestre degradada ao mais próximo possível da sua condição original. Já o processo de reabilitação é definido segundo a NBR 13030:1999, como um conjunto de procedimentos através dos quais se propicia o retorno da função produtiva da área ou dos processos naturais, visando à adequação ao uso futuro.

As APP estão definidas pelo Código Florestal Brasileiro (BRASIL, 2012). São locais de maior sensibilidade ambiental por sua importância ecossistêmica e, por isso, nas áreas mineradas, devem ser recuperadas visando a formação de floresta característica do bioma Mata Atlântica (NICOLEITE et al., 2013). Nessas áreas, recomenda-se sempre que possível, após a caracterização, que os rejeitos não inertes e/ou estéreis com sulfetos (principalmente pirita), sejam completamente removidos, com reposição de material inerte, não contaminante. No local deverá, portanto, ser utilizado solo construído em um nível que permita a implantação de espécies arbóreas nativas e o restabelecimento de floresta típica do bioma Mata Atlântica. O único uso futuro possível dessas áreas é a preservação permanente (BRASIL, 2015a).

Estas áreas que sofreram um extremo impacto e alto grau de intervenção atuam como filtro ambiental, principalmente nos primeiros anos de plantio, selecionando espécies com maior plasticidade ecológica. Por isso, o grupo de espécies selecionado para ser introduzido em áreas em processo de recuperação deve possuir algumas características essenciais relacionadas, principalmente, a categoria sucessional e capacidade de modificar o ambiente (NICOLEITE et al., 2013).

2.5. REVEGETAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DAS ÁREAS DEGRADADAS

Para a recuperação de áreas degradadas pela mineração é necessário um adequado planejamento que permita reduzir o tempo de exposição ao impacto, assim como restituir potencialmente a diversidade biológica e a produtividade do ecossistema (SÁNCHEZ; VIÑALES; PADRÓN, 2003). Desta forma, a revegetação mostra-se como uma alternativa de implementação para recuperação das áreas degradadas pela mineração em Santa Catarina.

De acordo com Coppin et al. (1998), a revegetação é definida como o processo de estabelecimento da vegetação e os cuidados posteriores realizados como parte das etapas de recuperação, reabilitação ou restauração. Ela é uma estratégia de remediação que proporciona uma melhora da fertilidade das áreas degradadas (NASCIMENTO & BIONDI, 2008; SIQUEIRA et al., 2008). Além disso, a revegetação visa não somente a reformulação paisagística, como também constitui a forma mais amplamente aceita e útil para reduzir a erosão e proteger os solos durante o processo de reversão da degradação (BENITO; WILLIAMS; WARD, 1999; TORDOFF; BAKER; WILLIS, 2000; NASCIMENTO & BIONDI, 2008; SIQUEIRA et al., 2008; SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2010). Vale salientar que a gestão da superfície do solo é importante no processo de recuperação de áreas degradadas por reduzir as perdas de nutrientes do solo, bem como, aumentar a atividade microbiana.

Devido às características intrínsecas dos solos das áreas degradadas pela mineração, é de se esperar que nem todas as espécies vegetais empregadas no processo de revegetação consigam se estabelecer nestes locais e sobreviver a tais condições. Segundo Ferrari & Wall (2004), em ambientes degradados há dificuldade em se implantar uma cobertura vegetal devido, principalmente, à baixa disponibilidade de nitrogênio e fósforo, e às condições físicas do solo, normalmente inapropriadas para o crescimento das plantas. Siqueira, Soares & Silva (2008) ressaltam que a condição de degradação do solo engloba alterações de natureza física, química e biológica que garantem a qualidade do solo e a capacidade de suportar a vegetação. Tais alterações são fortemente influenciadas pelo baixo teor de matéria orgânica nestes locais. A matéria orgânica é responsável tanto pela ciclagem dos nutrientes no solo quanto por prover a agregação e, principalmente, por servir de suporte para a atividade microbiana. Vale salientar que no processo de degradação do solo a atividade biológica é

a primeira à ser afetada, porém é a última a ser recuperada quando os solos se encontram em processo de reversão de degradação (SIQUEIRA et al., 2007).

Mais especificamente, em áreas de mineração, onde estão presentes os solos construídos, Nicoleite et al. (2013) ressalta a presença de restrições de natureza física, química e biológica que dificultam o estabelecimento da vegetação. Segundo os autores, a acidez, os baixos teores de matéria orgânica, a deficiência de macro e micro nutrientes, a presença de níveis tóxicos de determinados elementos e a baixa atividade microbiana dos solos, são algumas das restrições químicas e biológicas destes locais. Já as físicas mais comuns são a compactação, baixa porosidade, redução da infiltração de água, escoamento superficial e transporte do solo (erosão), entre outros.

De acordo com Morgan (2005), espécies escolhidas para repor a vegetação devem ser selecionadas com base nos seguintes parâmetros: crescimento rápido; tenacidade em relação a doenças e pragas; capacidade de competir com espécies menos desejáveis; e adaptabilidade ao solo local e às condições climáticas locais. Neste contexto, espécies arbóreas são uma boa opção para implementação nestes locais, por serem geradoras de biomassa, adicionando mais matéria orgânica no solo do que outras plantas. Além da matéria orgânica, estas espécies podem, potencialmente, melhorar os solos através de vários processos, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), aumento da infiltração e armazenamento de água, redução da perda de nutrientes por erosão e lixiviação, melhoria nas propriedades físicas e redução da acidez (YOUNG, 1989; PULFORD & WATSON, 2003; COELHO, 2006), melhorando assim, a atividade biológica do solo. Vale salientar que a serrapilheira depositada na superfície do solo e os exsudatos radiculares, fornecem nutrientes e auxiliam no ciclo dos nutrientes no solo (PULFORD & WATSON, 2003), desempenhando, portanto, um papel importante na manutenção da fertilidade do solo e produtividade primária dos ecossistemas florestais.

Quando se utilizam espécies arbóreas para revegetação, promove-se uma nova dinâmica de sucessão ecológica, na qual a área impactada é considerada o ponto de partida para o restabelecimento de novas espécies (REIS; ZAMBONIN; NAKAZONO, 1999). Neste contexto, a escolha das espécies pioneiras é de extrema importância, devendo ser selecionadas espécies adequadas às restrições locais do solo que após distúrbios é geralmente pobre em minerais e fisicamente inadequado para o crescimento da maioria das plantas (REIS; ZAMBONIN; NAKAZONO 1999; SIQUEIRA; SOARES; SILVA, 2008). Segundo

Odum & Barrett (2007) o estágio pioneiro é caracterizado por espécies vegetais que apresentam altas taxas de crescimento, tamanho pequeno, tempo de vida curto e produção de um grande número de sementes de fácil dispersão.

A seleção de espécies para a revegetação também deve considerar as espécies que apresentam um grau máximo de interação biótica. Quanto maior o nível de interação, maior a capacidade de diversificar as espécies envolvidas e conseqüentemente, mais rápido o aumento da resiliência local (REIS; ZAMBONIN; NAKAZONO, 1999). Devido ao fato, leguminosas arbóreas fixadoras de nitrogênio apresentam grande potencial de utilização para a recuperação das áreas degradadas pela mineração.

2.6. LEGUMINOSAS ARBÓREAS NA RECUPERAÇÃO AMBIENTAL: BRACATINGA UMA ESPÉCIE EM POTENCIAL

A família Leguminosae ou Fabaceae é a terceira família em número de espécies (cerca de 18.500), após Asteraceae e Orchidaceae. Distribuem-se em mais de 650 gêneros e podem ser encontradas nos mais variados habitats, do ártico aos trópicos. A família inclui árvores, arbustos e herbáceas, divididas em três subfamílias, Cesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae.

A capacidade das espécies desta família em fixar o nitrogênio atmosférico a partir da associação simbiótica que estabelecem com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) é uma característica importante do ponto de vista da colonização de solos pobres, da melhoria ou regeneração dos solos degradados, além da sua utilização em práticas agrícolas (PASCUAL, 2003). Leguminosas arbóreas podem contribuir com cerca de 12 toneladas de serrapilhiera seca e 190 kg de $N^{-1} ha^{-1}$ ano para renovar os solos degradados (FRANCO & DE FARIA, 1996).

Dentre as leguminosas arbóreas estudadas na recuperação de solos degradados encontra-se a Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) (MELLONI et al., 2004; REGENSBURGER, 2004; CARNEIRO et al., 2008; SATURNO et al., 2009). Esta espécie vem sendo implantada na área de estudo da região carbonífera de Criciúma. É uma espécie nativa do sul do Brasil, encontrada na floresta ombrófila mista (floresta com araucária) nas formações Montana e Alto Montana, bem como, nas florestas secundárias, principalmente em capoeiras e capoeirões. Possui vida relativamente curta, admitindo-se que a duração individual máxima não ultrapasse 25-30 anos em sua ocorrência natural (LORENZI, 1998).

A bracatinga é uma árvore inerme (sem espinhos), perenifolia (folhagem persistente ao longo do ano), pouco exigente quanto as condições físicas e químicas do solo e, pelo rápido desenvolvimento, é indicada para a revegetação de áreas degradadas (BURKART, 1979; CARVALHO & CARPANEZZI, 1982; CARVALHO, 1994). A rusticidade e o caráter heliófilo (desenvolve plenamente em condições de intensa luminosidade solar) da espécie, proporcionam rápida cobertura de áreas de solos alterados e/ou degradados (CARVALHO, 1981).

A bracatinga é considerada uma espécie arbórea facilitadora do processo de sucessão vegetal, uma vez que facilita o estabelecimento de outras espécies vegetais devido à sua capacidade de promover melhorias na fertilidade do solo por meio da deposição de serrapilheira rica em nitrogênio, o qual é fixado na planta simbioticamente por microrganismos diazotróficos (CALLAWAY, 1995). Desse modo, ao longo do seu crescimento, a bracatinga estimula a vida microbiana no solo em função da grande quantidade de nitrogênio incorporada pela deposição de folhagem e pela associação simbiótica com bactérias, além do acúmulo de matéria orgânica proporcionado pela deposição da serrapilheira (POGGIANI et al., 1987).

As deposições de matéria orgânica e de nitrogênio pela bracatinga são consideradas elevadas em comparação a outras espécies estudadas no Brasil, como *Eucalyptus* spp., *Pinus* spp. e *Liquidambar* sp. (CARPANEZZI et al., 1988). Entretanto, os valores da deposição dos demais nutrientes são similares ou levemente superiores aos observados em outras espécies, e decorrem principalmente da deposição elevada de matéria orgânica. No entanto, à medida que a idade da espécie aumenta, há uma redução progressiva dos valores anuais de deposição foliar (CARPANEZZI et al., 1988), sendo o ambiente sustentado pela sucessão ecológica.

Deste modo, pode-se observar a complexidade do ecossistema, onde interações são necessárias para o seu funcionamento. Assim sendo, no processo de revegetação, o plantio bem sucedido de uma espécie não indica que a área esteja recuperada. A recuperação somente se processará com o aumento da resiliência, que é obtida pela interação entre todos os elementos físicos, químicos e biológicos do meio e estabelecimento de um equilíbrio dinâmico (RODRIGUES & LEITÃO FILHO, 2000). Após o estabelecimento do processo de revegetação, torna-se necessário realizar o monitoramento destas áreas para acompanhar e avaliar o aumento da resiliência do local e, conseqüentemente, o sucesso da execução dos processos de recuperação.

2.7. INDICADORES AMBIENTAIS EMPREGADOS NA REGIAO CARBONIFERA DE CRICIÚMA-SC

Para tornar possível o monitoramento de um projeto de recuperação de áreas degradadas são necessários indicadores ambientais. Segundo Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2012), um indicador ambiental pode ser definido como uma variável, qualitativa ou quantitativa, a qual pode ser mensurada ou descrita, que fundamentalmente reflita informações pontuais no tempo e no espaço afim de permitir o acompanhamento dinâmico da realidade.

No contexto da recuperação dos passivos ambientais da região carbonífera de Santa Catarina foram elencados indicadores ambientais e elaborado um plano de monitoramento, para avaliar a eficiência dos trabalhos de recuperação ambiental das áreas com depósitos de rejeitos, das áreas mineradas a céu aberto e das minas abandonadas, como também, avaliar a qualidade dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos das áreas atingidas (BRASIL, 2015b).

Nas áreas terrestres impactadas pela mineração, os indicadores ambientais elencados contemplam aqueles relacionados ao monitoramento da biota, mais especificamente, a fauna e a flora. Em relação à esta última, deve ser realizada a avaliação da diversidade e frequência de espécies, bem como os processos ecológicos envolvidos na recuperação dos ecossistemas.

Dentre os processos ecológicos envolvidos na recuperação dos ecossistemas, fatores que influenciam no estabelecimento da flora, como os microrganismos, não são contemplados. Entretanto, estes podem ser de grande valia, pois os microrganismos representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, além de manterem relações vitais entre si e com outros organismos (HUNTER-CEVERA, 1998).

2.8. INTERAÇÕES PLANTA-MICROORGANISMOS

2.8.1. Microrganismos edáficos

O estudo das comunidades microbianas associadas a plantas é importante para entender o papel dos microrganismos no ambiente do solo (CAVAGLIERI et al., 2009). Essas comunidades podem, fisicamente, ocupar locais distintos em interface com a planta, serem

responsáveis por inúmeras funções e interagir direta ou indiretamente com a mesma.

A microbiota edáfica, ou seja, fungos, bactérias e arqueias, que habitam o solo são responsáveis tanto por prover quanto por controlar diversas funções neste sistema (DOMINATI; PATTERSON; MACKAY, 2010; AISLABIE & DESLIPPE, 2013). Dentre os serviços providos encontram-se aqueles relacionados ao suporte físico, fornecimento de substâncias de interesse biotecnológico, assim como, fonte mobilizadora de nutriente e fornecedora para plantas. Já os serviços regulatórios relacionam-se ao processo de infiltração da água, regulação de ciclos biogeoquímicos dos elementos, incluindo a FBN e a ciclagem de P, degradação de agrotóxicos e metais pesados, controle biológico, estoque de carbono e regulação de gases do efeito estufa (TATE & KLEIN, 1985; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; DOMINATI; PATTERSON; MACKAY, 2010; AISLABIE & DESLIPPE, 2013). No solo, estes microrganismos podem exercer tais funções, ocupando distintos locais. Estes podem estar em íntima associação com a planta, ocupando as zonas próximas das raízes ou interferindo no estabelecimento das espécies vegetais de forma mais indireta, ocupando a massa do solo (SMALLA et al, 2001; CHAUDHARY et al., 2012; MCNEAR, 2013; CUI et al., 2015).

Estudos relacionados aos microrganismos em distintas situações de degradação vêm sendo realizados (BALOTA et al., 1998; CARNEIRO et al., 2008; MARTINS et al., 2010; SANTOS et al., 2013; QUADROS, 2013; SANTOS et al., 2015). Tais estudos utilizam diferentes abordagens e ferramentas metodológicas, visando compreender alterações e potenciais características indicadoras de reversão do processo de degradação, principalmente, relacionadas à qualidade do solo.

Devido à alta sensibilidade relacionada a modificações no ambiente e à facilidade de determinação, os atributos microbiológicos e bioquímicos relacionados à microbiota edáfica apresentam grande potencial de utilização como indicadores da qualidade de solos degradados em recuperação (GIANFREDA & BOLLAG, 1996; SANTOS et al., 2013). Pela avaliação desses atributos, inclusive em área-referência ou natural, sem impacto de atividades antrópicas, podem ser identificadas as principais limitações do ecossistema impactado e sugeridas estratégias visando a manutenção da sustentabilidade dos ecossistemas (SILVEIRA et al., 2004).

Dentre os atributos bioquímicos relacionados a características microbiológicas, estudos têm sido desenvolvidos com a avaliação do C e

N da biomassa microbiana, N potencialmente mineralizável, respiração do solo, relação C-microbiano:C-total e quociente metabólico (relação entre a biomassa microbiana e respiração basal), como indicadores de mudanças na comunidade microbiana impostas pelo tipo de manejo, distúrbio ou estresse do ambiente (LAMBASIS et al., 2005). Além destes, estudos envolvendo atividades enzimáticas no solo, também fazem parte dos atributos bioquímicos relacionados às características microbiológicas do solo (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2015).

Os atributos microbiológicos densidade e diversidade de grupos funcionais de microrganismos também têm sido utilizados como indicadores de qualidade do solo (SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2015). Entretanto, técnicas independente de cultivo vêm cada vez mais sendo utilizadas com o intuito de identificar microrganismos ou grupos de microrganismos presentes em ambientes degradados e aqueles em recuperação de forma mais robusta (QUADROS et al., 2016; LI et al., 2014).

A eficiência de diferentes indicadores biológicos para comparar respostas de sistemas de manejo a modificações das condições ambientais têm sido demonstradas, sem, no entanto, apontar para um bioindicador único. Stenberg (1999) enfatiza que nenhum indicador individualmente conseguirá descrever e quantificar todos os aspectos da qualidade do solo, devendo múltiplos indicadores serem utilizados.

2.8.2. Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos são fungos e bactérias que colonizam na totalidade ou parte do seu ciclo de vida os tecidos internos da planta (HARDOIM et al., 2015). Microrganismos endofíticos já foram isolados de todas as espécies de plantas até então estudadas (ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006; ARNOLD, 2007; SANDBER; BATTISTA; ARNOLD, 2014). Devido à íntima associação entre estes e as espécies vegetais, sugere-se que estes microrganismos co-evoluíram com seus simbiontes (MISAGHI & DONNDELINGER, 1990).

Estes microrganismos permanecem em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica, sendo encontrados, portanto, em órgãos e tecidos vegetais desde as raízes até as folhas e frutos (AZEVEDO, 1998; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Em geral, os endofíticos promovem o crescimento de plantas, reduzem a severidade de doenças e melhoram a tolerância em ambientes

estressantes. Alguns endofíticos são também diazotróficos, promovendo a fixação de nitrogênio na planta onde se abrigam (SELOSSE & VANDENKOORNHUYSE, 2004; RYAN et al., 2008; RODRIGUEZ et al., 2009; DOTY, 2011).

Pesquisas relacionadas às diferentes espécies, manejos, ecossistemas e estações do ano vem sendo desenvolvidas no intuito de compreender a diversidade e comportamento da comunidade endofítica em distintos ambientes e situações (ARNOLD et al., 2001; ARNOLD & LUTZNI, 2007; NAIK et al., 2009; JOHNSTON-MONJE & RAIZADA, 2011; PAGANI et al., 2014; SEGHERS et al., 2014). Recentemente, estudos têm sido realizados a fim de explorar os benefícios dos endofíticos em superar as restrições da fitorremediação, principalmente, os relacionados à metabolização de elementos traço, bem como, de compostos orgânicos (NEWMAN & REYNOLDS, 2005; GLICK, 2010; KHAN & DOTY, 2011).

Apesar das inúmeras funções desempenhadas pelos microrganismos endofíticos, estudos relacionados a espécies arbóreas são recentes. Para tanto, tem se utilizado técnicas dependentes e mais recentemente independentes de cultivo (ARNOLD et al., 2000; GAZIS & CHAVERRI, 2010; SURYANARAYANAN et al., 2011; ZIMMERMAN & VITOUSEK, 2012). Microrganismos endofíticos presentes nas folhas são de especial importância, pois contribuem para ciclagem de nutrientes, como colonizadores iniciais da decomposição da serapilheira (SUN; GUO; HYDE, 2011; HE et al., 2012; OSONO; TATENO; MASUYA, 2013).

Devido a íntima associação com a planta e inúmeras funções que desempenham, os microrganismos endofíticos podem nos fornecer informações do comportamento microbiano ao longo do estabelecimento das espécies, especialmente nas arbóreas perenes. Estudos de tal natureza podem permitir encontrar inferências quanto a padrões de monitoramento de grupos microbianos específicos em ambientes degradados. Entretanto, estudos desta natureza não existem.

2.9. FERRAMENTAS MOLECULARES NO ESTUDO DE MICRORGANISMOS EM ÁREAS DEGRADADAS

Associado à avaliação dos atributos bioquímicos na recuperação de áreas degradadas, o desenvolvimento das técnicas moleculares para análise de ácidos nucleicos desde o século passado, tem possibilitado o acesso a diversidade microbiana do solo, revelando que esta é extremamente maior do que pode ser avaliado por técnicas dependentes

de cultivo. Desde então, tem sido possível empregar marcadores moleculares para estudar composição, estrutura e função de comunidades microbianas (HE et al., 2008). Grande parte dos estudos utilizam marcadores filogenéticos, como genes rRNA 16S de procariotos e ITS de eucariotos para avaliar a diversidade taxonômica de ambientes (FIERER et al., 2012; ALBERTSEN et al., 2015; OLIVEIRA & MARGIS, 2015; IHRMARK et al., 2012; KARLSSON, 2014).

Um grande número de técnicas, com diferentes abordagens e poderes de resolução já foram desenvolvidas para estudar perfis de comunidades (análise estrutural), sem necessariamente acessar diretamente as sequências de genes. Dentre as técnicas independentes de cultivo encontram-se as chamadas técnicas de *fingerprint*, que possibilitam a avaliação de estruturas de comunidades de microrganismos, como SSCP, ARISA, T-RFLP, TGGE E DGGE, (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; LAMBAIS et al., 2005), sendo esta última uma das mais utilizadas em estudos de ecologia microbiana. O princípio da técnica do DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) baseia-se na separação de fragmentos de DNA de acordo com seu conteúdo de bases G-C, sendo o padrão de bandas de cada amostra referente a estrutura da comunidade do grupo de organismos avaliados, o que permite comparações entre amostras (SILVA; VIDAL-TORRADO; LAMBAIS, 2014; PINHEIRO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2002; OVREAS et al., 1997; MUYZER; DE WALL; UITTRELINDER, 1993).

A análise da estrutura de comunidades microbianas, como a proposta com a DGGE, apesar de não permitir a identificação de organismos, pode ser uma ferramenta valiosa por fornecer indicativos iniciais de potenciais mudanças no ambiente em estudo. Tal ferramenta vem sendo utilizada tanto no estudo de microrganismos endofíticos, quanto do solo (SILVA, 2015; HARDOIM et al., 2012; WEST et al., 2010; SANTOS et al., 2015; HERBELE et al., 2015).

Diante do exposto, pode-se observar que existem distintas ferramentas de estudo para avaliação da microbiota em ambientes degradados. Entretanto, estudos relacionados a indicadores ambientais microbiológicos tem se voltado quase que exclusivamente, ao estudo de microrganismos edáficos. Os microrganismos endofíticos, por sua vez, vêm sendo estudados em distintas situações, mas os estudos são escassos em ambientes degradados. Devido à importância dos microrganismos no aumento da resiliência dos ambientes degradados e a necessidade de indicadores microbiológicos que corroborem para o

apontamento de tal condição, é que surge a presente proposta de trabalho.

3. HIPÓTESE

Atributos químicos e microbiológicos do solo e a comunidade microbiana endofítica do tecido foliar da Bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) têm relação direta com o tempo de recuperação de áreas impactadas pela mineração de carvão.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os atributos químicos e microbiológicos do solo e a estrutura de comunidades microbianas associadas à bracatinga visando o estabelecimento de indicadores para monitoramento de áreas degradadas pela mineração de carvão em processo de recuperação.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

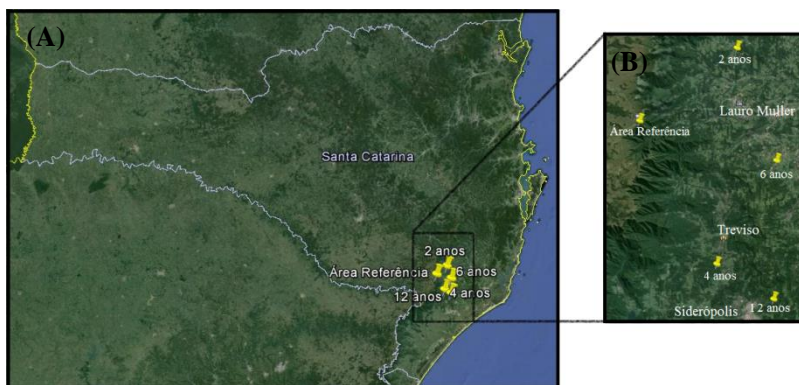
- a) Relacionar os atributos químicos do solo das áreas com plantio de bracatinga com os diferentes tempos de recuperação das áreas mineradas degradadas.
- b) Comparar os atributos microbiológicos e a estrutura de comunidades microbianas edáficas das áreas com plantio de bracatinga das áreas mineradas degradadas com diferentes tempos de recuperação e área de ocorrência natural.
- c) Comparar a estrutura de comunidades de fungos e bactérias endofíticas totais do tecido foliar da bracatinga em áreas degradadas pela mineração de carvão com diferentes tempos de recuperação e área de ocorrência natural.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. LOCAIS DE COLETA

As coletas de solo e material vegetal foram realizadas em agosto de 2013, sendo selecionadas áreas com 2, 4, 6 e 12 anos de recuperação, estando as duas primeiras áreas situadas no município de Lauro Muller e as demais em Treviso e Siderópolis, respectivamente, todas inseridas na bacia carbonífera de Santa Catarina (Figura 4). Nestes locais há predominantemente solos construídos, sendo portanto, classificados como antropossolos. Além das áreas de mineração em recuperação, também foi selecionada uma área de ocorrência natural da bracinga, situada no município de Bom Jardim da Serra. Neste local o solo é classificado como Cambissolo hístico (EMBRAPA, 2013).

Figura 4: (A) Localização das áreas de coleta no estado de Santa Catarina. (B) Visualização local das áreas de coleta na região carbonífera Catarinense.



5.2. HISTÓRICO DAS ÁREAS

Em todas as áreas estudadas, previamente ao início do processo de revegetação, os materiais considerados contaminantes (rejeito ou estéreis) foram removidos. Posteriormente, foram adicionados materiais (solo e substratos) para conformação topográfica e suporte à vegetação implantada (espécies arbóreas e herbáceas). Apesar destas etapas serem executadas em todas as áreas, o processo de recuperação foi realizado conforme cada responsável (Tabela 1). A situação atual do processo de revegetação destas áreas pode ser observado na figura 5.

Tabela 1: Localização e características das áreas em distintos estágios de recuperação na região carbonífera de Criciúma.

(continua)

Local/Tempo recuperação	Coordenada	Material contaminante	Material adicionado	Espécies Arbóreas ¹	Espécies herbáceas ¹
Lauro Muller (2 anos)	28°19'08.97"S 49°26'20.93"O elevação 351 m	mineração à céu aberto	argila e material orgânico (cama de aviário)	<i>Ceiba speciosa</i> St. Hil, <i>Croton celtidifolius</i> Baill, <i>Inga sessilis</i> (Vell.) Mart., <i>Mimosa scabrella</i> Benth., <i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. <i>Pitadenia gonoacantha</i> (Mart.) J.F.Macbr, <i>Psidium cattleyanum</i> Sabine, <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi, <i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S. Irwin & Barneby, <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume e <i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke.	Oriunda do banco de sementes do substrato utilizado
Lauro Muller (4 anos)	28°33'26.62"S 49°27'56.19"O elevação 150 m	presença de materiais contaminantes, sendo estes compostos por rejeito proveniente da lavagem do carvão	argila e material orgânico (cama de aviário e turfa ³)	<i>Alchornea triplinervia</i> (Spreng.) Müll. Arg., <i>Ceiba speciosa</i> St. Hil, <i>Citharexylum myrianthum</i> Cham., <i>Garcinia gardneriana</i> (Planch. & Triana) Zappi, <i>Mimosa scabrella</i> Benth., <i>Phytolacca dioica</i> L., <i>Psidium cattleyanum</i> Sabine., <i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Cav.) A. Robyns, <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi, , <i>Senna multijuga</i> (Rich.) H.S. Irwin & Barneby.	<i>Avena sativa</i> L. <i>Lolium multiflorum</i> Lam.

Tabela 2: Localização e características das áreas em distintos estágios de recuperação na região carbonífera de Criciúma.

(continuação)					
Local/ Tempo recuperação	Coordenada	Material contaminante	Material adicionado	Espécies Arbóreas ¹	Espécies herbáceas ¹
Treviso (6 anos) ²	28°26'10.78"S 49°23'36.04"O elevação 259 m	presença de materiais contaminantes, sendo este composto por rejeito proveniente da lavagem do carvão	argila e material orgânico (cama de aviário e turfa)	<i>Alchornea triplinervia</i> (Spreng.) Müll. Arg., <i>Allophylus edulis</i> (A. St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk., <i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart., <i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth., <i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg, <i>Cedrela fissilis</i> Vell. , <i>Ceiba speciosa</i> A. St.-Hil., <i>Cupania vernalis</i> Cambess., <i>Eugenia brasiliensis</i> Lam., <i>Eugenia involucrata</i> DC., <i>Eugenia pyriformis</i> Cambess., <i>Eugenia uniflora</i> L., <i>Inga sessilis</i> (Vell.) Mart., <i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz, <i>Inga striata</i> Benth., <i>Mimosa scabrella</i> Benth., <i>Myrcia</i> sp., <i>Myrcia splendens</i> (Sw.) DC., <i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. <i>Occotea odorifera</i> Rohwer, <i>Phytolacca dioica</i> L., <i>Pseudobombax grandiflorum</i> (Cav.) A. Robyns, <i>Psidium cattleianum</i> Sabine, <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi, <i>Tabebuia chrysotricha</i> (Mart. ex A. DC.) Standl., <i>Tabebuia umbellata</i> (Sond.) Sandwith, <i>Tabernaemontana catharinensis</i> A. DC., <i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vell.) Toledo <i>Trema micrantha</i> (L.) Blume, <i>Senna macranthera</i> (DC. ex Collad.) H.S. Irwin & Barneby e <i>Vitex megapotamica</i> (Spreng.) Moldenke	<i>Avena sativa</i> L. <i>Lolium multiflorum</i> Lam.

Tabela 3: Localização e características das áreas em distintos estágios de recuperação na região carbonífera de Criciúma. (conclusão)

Local/ Tempo recuperação	Coordenada	Material contaminante	Material adicionado	Espécies Arbóreas ¹	Espécies herbáceas ¹
Siderópolis (12 anos)	28°35'09.30"S 49°25'25.93"O elevação 154 m	mineração à céu aberto presença de estéreis	argila e material orgânico (cama de aviário e turfa)	<i>Mimosa scabrella</i> Benth.	<i>Melinis minutiflora</i> <i>Urochloa humidicola</i>

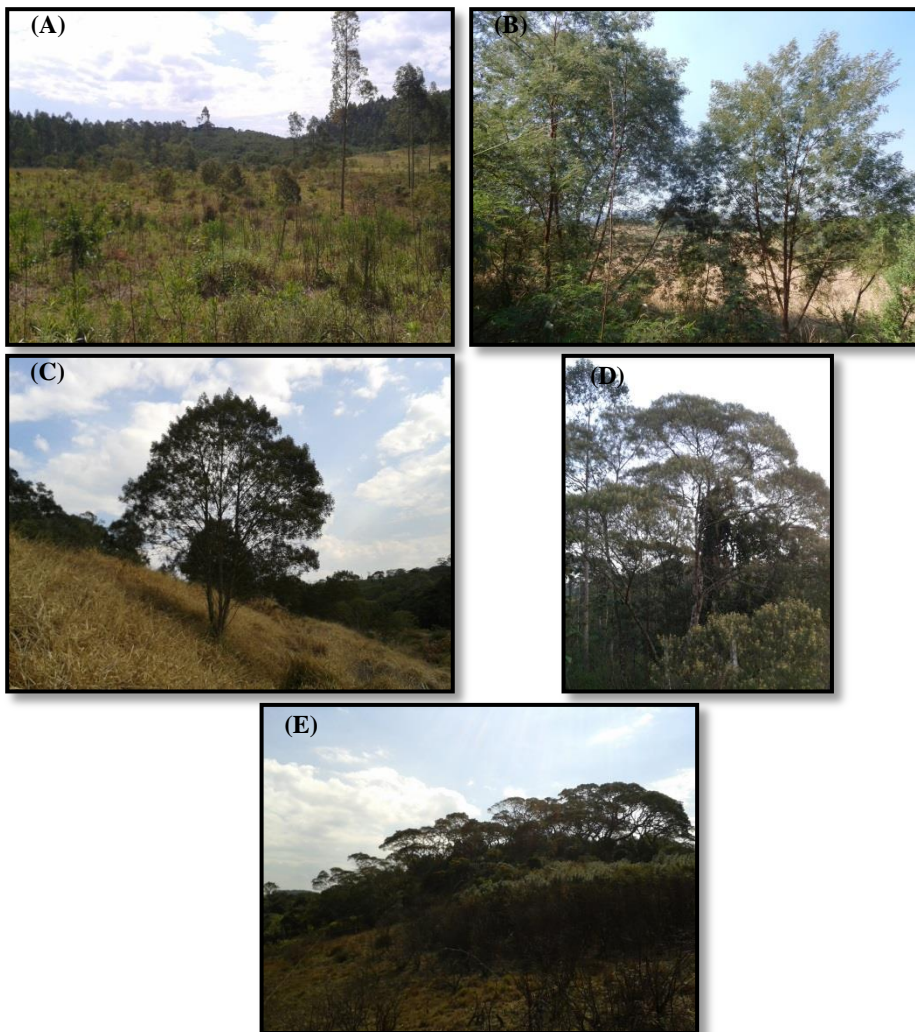
¹ Vegetação implantada para iniciar o processo de recuperação destas áreas.

² Deve-se salientar que no momento da coleta a cobertura vegetal na área de 6 anos apresentava predomínio de *Urochloa* sp., ocasionando elevada cobertura do solo e competição com as espécies arbóreas introduzidas, conforme discutido em Nicoleite et al. (2013).

³ A turfa utilizada corresponde à camada mais superficial da jazida, considerada “rejeito” pelas empresas mineradoras de turfa, devido à grande quantidade de sementes presentes. Devido ao fato, esta turfa é mais barata fazendo com que seja economicamente viável sua utilização.

A área de ocorrência natural da bracatinga selecionada para coleta possui a localização 28°24'04.13"S; 49°33'05.99"O.

Figura 5: Áreas degradadas pela mineração de carvão em distintos estágios de recuperação. (A) 2 anos (B) 4 anos (C) 6 anos (D) 12 anos de recuperação (E) área de ocorrência natural da bracatinga.



5.3. COLETA DE FOLHAS DA BRACATINGA

Em cada área foram coletadas cinco amostras de folhas de bracatinga, oriundas de cinco árvores distintas presentes nas áreas de recuperação, sendo cada amostra composta por 12 subamostras. As subamostras foram coletadas em ramos posicionados em sentidos opostos na planta (quatro pontos), sendo selecionadas folhas da parte proximal, mediana e distal (três pontos) de cada ramo, totalizando 25 amostras de folha para análises moleculares e 25 para análises químicas. Todo o material usado na manipulação das plantas foi desinfetado com álcool 70%, previamente as coletas. As amostras coletadas foram transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia do Solo. As amostras destinadas às análises moleculares foram armazenadas à -80 °C até o processamento e as destinadas as análises químicas foram destinadas à secagem.

5.4. AMOSTRAGEM DE SOLO

Os locais de coleta das amostras de solo foram a projeção da copa das árvores de bracatinga selecionadas para coleta das amostras de tecido foliar. O tamanho amostral foi o mesmo utilizado para coleta das folhas, diferindo apenas no número de subamostras, que para as amostras de solo foram seis. Em função da espessa camada de material orgânico empregado no preparo das áreas, a amostragem foi realizada na profundidade de 0-20 cm, com auxílio de um trado tipo holandês, previamente flambado, removendo-se previamente os resíduos orgânicos da superfície do solo. Após coletadas e homogeneizadas em sacos estéreis, as amostras foram fracionadas, sendo mantidas nestes sacos aquelas destinadas às análises microbiológicas e as destinadas para análises químicas, acondicionadas em sacos de polipropileno não estéreis. Para as análises microbiológicas as amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte até o laboratório microbiologia do solo. As amostras destinadas às análises moleculares foram armazenadas à -80 °C até o processamento. As amostras destinadas às demais análises microbiológicas foram mantidas sob refrigeração (4°C) e aquelas destinadas à análise química do solo foram secas à temperatura ambiente.

5.5. ATRIBUTOS QUÍMICOS

5.5.1. Análise química do solo e do tecido foliar da bracinga

Para a realização das análises de N, P e K, pH em água e pH em KCl as amostras de solo foram secas ao ar e passadas em peneira de 2 mm. A análise de N foi determinada pelo método semi-micro Kjeldahl, de acordo com Tedesco et al. (1995). Para a determinação do conteúdo de P e K, realizou-se a digestão segundo Tedesco et al. (1995) e a determinação pelo método de Murphy & Riley (1962). A determinação do pH em água e KCl foi realizada segundo EMBRAPA (1997). Para análise dos elementos-traço, o solo seco foi passado em peneira de 0,15 mm e moído em almofariz de cerâmica, sendo as amostras digeridas pelo método USEPA 3051a, utilizando-se forno micro-ondas Cem Mars 5. A quantificação dos teores totais de Zn, Cu, Mn, As, Pb, Cd e Cr foram determinados por espectrometria de absorção atômica utilizando o equipamento AAnalyst 800 (Perkin Elmer).

As amostras de tecido foliar foram secas à 65 °C até atingir peso constante e processadas em moinho para posterior análise de N e elementos-traço. O teor de N foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl, de acordo com Tedesco et al. (1995). Os elementos-traço foram determinados utilizando-se a mesma metodologia empregada na análise de solo.

5.6. ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS

5.6.1. Contagem de bactérias e fungos do solo

Cerca de 10 g de solo foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de solução salina (0,85%), agitando-se a 120 rpm por 20 min. Em seguida foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-5} e de 10^{-1} a 10^{-3} , para contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de bactérias e fungos, respectivamente. As diluições foram plaqueadas em superfície em meios de cultura específicos, em triplicatas, e incubadas a 28 °C por 3 dias. Para contagem de bactérias foi utilizado o meio Ágar Triptona de Soja (TSA) em (g L^{-1}): 15,0 g de digestão pancreática de caseína; 5,0 g de cloreto de sódio; 5,0 g de digestão papaica de farinha de soja; 15,0 g de ágar; pH 7,3, acrescido de 0,04 g do fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB). Para contagem de fungos foi utilizado o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Chloranfenicol (DRBC) (g L^{-1}): 10,0 g de glicose; 5,0 g de peptona de soja; 1,0 g de

KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g de Rosa Bengala; 0,002 g de Dicloran ; 0,1 g de Cloranfenicol; 15 g ágar; pH 5,7, acrescidos ainda de 0,03 g de estreptomicina e 0,05 g de tetraciclina. Ambos os meios foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos.

5.6.2. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana

A determinação do C e N da biomassa microbiana foi realizada através do método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). O princípio é baseado na lise celular e posterior liberação de seus constituintes, que é promovida pelo contato do solo com o vapor do agente fumigante (clorofórmio) em dessecador a vácuo por 24 horas. Após o processo de fumigação foi realizada a extração de C e N com solução de sulfato de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Na sequência procedeu-se as leituras dos extratos em auto analisador de C e N (Autoanalisador marca Shimadzu), empregando-se fator de correção de 0,40 e 0,54 para C e N, respectivamente (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). Amostras não fumigadas foram submetidas ao mesmo procedimento, exceto à exposição ao clorofórmio.

5.6.3. Determinação da respiração basal microbiana

A respiração basal do solo consiste do valor obtido da quantidade de C- CO_2 emanado das amostras durante os dias de incubação, refletindo a atividade microbiana. O CO_2 produzido durante a respiração pelos microrganismos é capturado em uma solução de hidróxido de sódio. Para determinação da respiração basal microbiana foi empregado o método proposto por Jenkinson & Powlson (1976), com adaptações. Para isso, o solo foi incubado em frascos, hermeticamente fechados, contendo um recipiente com 10 mL de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os frascos foram incubados por um período de 7 dias em BOD a 25°C. A taxa de respiração foi determinada a partir da titulação com HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, adicionando-se 1 mL de BaCl_2 10% (m/v) e 2 gotas indicador fenolftaleína 1% (m/v) ao NaOH remanescente. Os controles foram preparados utilizando-se frascos sem solo, procedendo-se às mesmas análises descritas anteriormente.

O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) foi obtido a partir da razão entre a respiração basal por unidade de carbono da biomassa microbiana do solo (ANDERSON & DOMSCH, 1993).

5.7. ANÁLISES MOLECULARES

5.7.1. Extração de DNA de microrganismos edáficos e endofíticos

Para a extração do DNA das amostras de solo das áreas de revegetação com bracatinga e da área referência, foi utilizado o Kit PowerSoil® DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Já para obtenção dos endofitos, previamente a extração de DNA, foi realizada a desinfecção superficial do tecido foliar das amostras de bracatinga mediante imersão do material em água Milli-Q esterilizada contendo Tween 20 (0,01%). As folhas em solução foram submetidas a ultrassom por 2 minutos à 42 Hz. Os processos subsequentes de desinfecção foram realizados em falcon de 50 mL e consistiram na imersão do material vegetal por 2 min em álcool 70%, 5 min em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) (V/V), novamente por 30 s em álcool 70%, e por fim lavado cinco vezes em água Milli-Q esterilizada. Da última água de lavagem dos tecidos foi extraído o DNA e realizada a PCR, da mesma forma que foi procedido com as amostras, conforme segue abaixo, para confirmação do processo de desinfecção. Após a desinfecção superficial, as amostras de tecido foliar foram maceradas com auxílio de almofariz e pilão de porcelana em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas em -80 °C até a extração de DNA.

A extração de DNA total das amostras do tecido foliar da bracatinga foi realizada com o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a extração de DNA das amostras de solo e do tecido foliar, a concentração e pureza das amostras foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

5.7.2. Análise da estrutura de comunidades de microrganismos edáficos e endofíticos

A análise da estrutura da comunidade de bactérias e fungos edáfica, bem como, endofítica, foi realizada por PCR-DGGE. Para a análise de bactérias totais, a região V3 do gene rRNA 16S de Bacteria foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG

GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997).

A amplificação parcial do gene rRNA 16S foi realizada em solução tampão 1X para Taq DNA polimerase contendo 0,2 mmol L⁻¹ de dNTPs, 1,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil), 1 umol L⁻¹ de cada um dos iniciadores e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação da PCR utilizadas foram 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C.

A comunidade de fungos totais foi avaliada a partir de nested PCR através da amplificação parcial da região ITS utilizando-se os iniciadores ITS1-FGC (5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3') (GARDES & BRUNS, 1993), ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE et al., 1990) e ITS2 (5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC 3') (WHITE et al., 1990).

A primeira PCR, com os iniciadores ITS1-F-GC e ITS4 foi realizada em solução tampão 1X para Taq DNA polimerase contendo 0,2 mmol L⁻¹ de dNTPs, 2,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil), 1 umol L⁻¹ de cada um dos iniciadores e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação da PCR foram 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C e 1 min a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C. O produto da primeira PCR foi utilizado na segunda reação com os iniciadores ITS1 FGC e ITS2. A reação foi realizada em solução tampão 1X para Taq DNA polimerase contendo 0,2 mmol L⁻¹ de dNTPs, 1,5 umol L⁻¹ de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil), 1 umol L⁻¹ de cada iniciador e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação da PCR foram 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 57°C e 30s a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C.

Para confirmar a amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, sendo as amostras coradas com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), e submetidas a eletroforese horizontal com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), por 45 minutos a 90 V. A concentração dos produtos da PCR foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

Para a realização da DGGE, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel com 8% (m/V) de acrilamida:bisacrilamida (37,5: 1, m:m), contendo um gradiente de 25 a

65% de formamida e uréia (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada à 200 V e 60 °C constantes, por 3h e 30 min, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão TAE 1X. Os produtos da PCR (300 ng) foram corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos géis feita em fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, Califórnia, USA).

5.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de atributos microbiológicos foram transformados em $\log(x)$, submetidos a análise de variância ANOVA e teste de separação de médias Scott Knott (5 %), utilizando o programa estatístico Assistat versão 7.7. Os atributos químicos e microbiológicos do solo foram submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP) usando o programa CANOCO for Windows 4.5 (TER BRAAK & SMILAUER, 2002).

Os perfis de amplicons dos géis da DGGE foram analisados pelo programa Gel Compar II versão 6.5 (Biosystematica, wales, UK), a partir da análise de agrupamento hierárquico, utilizando índice de Jaccard e o modelo de agrupamento por UPGMA. As comparações aos pares foram realizadas utilizando o teste de similaridade de ANOSIM, utilizando o coeficiente de Jaccard no programa PAST 10.0 (HAMMER, HARPER, RYAN, 2011). Esse método compara a distância entre os grupos gerando uma correlação R onde se pode constatar que os grupos estão claramente separados ($R=1$) ou não ($R=0$).

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISES QUÍMICAS

A caracterização química do solo das áreas com distintos tempos de recuperação encontra-se na Tabela 2.

De acordo com o Manual de Adubação e Calagem para os Estados de SC e RS (Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC, 2004), independente da textura do solo, os teores de P podem ser considerados de baixo ($>7,1 \text{ mg dm}^{-3}$) a muito alto ($>42 \text{ mg dm}^{-3}$). Já em relação ao K, independente dos valores da $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$, os teores no solo podem ser considerados médios ($> 61 \text{ mg dm}^{-3}$) a altos ($> 90 \text{ mg dm}^{-3}$).

Em relação ao Carbono Orgânico Total (COT) pode-se observar nas áreas com 4, 6 e 12 anos, incrementos da ordem de 315%, 886% e 234%, respectivamente, em relação a área com menor tempo de recuperação (2 anos). Em relação ao N, verificou-se incrementos de 157%, 345% e 121%, considerando estas mesmas áreas, respectivamente. Já os valores do pH em água, demonstram que tanto os solos das áreas em recuperação quanto da referência, são ácidos. Em relação ao ΔpH , nota-se um predomínio de cargas negativas, o que favorece a adsorção de íons com cargas positivas (MEURER; RHEINHEIMER; BISSANI, 2000).

Quando avaliados os elementos-traço no solo, estes não apresentam valores acima dos valores de prevenção preconizados pela CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). Cabe ressaltar que os valores de prevenção se referem a concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo ou da água subterrânea. Este valor indica a qualidade de um solo capaz de sustentar as suas funções primárias, protegendo-se os receptores ecológicos e a qualidade das águas subterrâneas.

Tabela 4: Análise química de solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação e valores de prevenção preconizados pela CETESB

Áreas	P	K	N _{Total}	COT	pH	pH	Δ pH
	----- mg kg ⁻¹ -----	----- mg kg ⁻¹ -----	----g kg ⁻¹ ----		H ₂ O	KCl	
2 anos	23,17	65,53	0,70	5,03	4,66	3,79	-0,87
4 anos	74,55	79,51	1,80	20,89	4,53	3,73	-0,81
6 anos	152,60	78,38	3,12	49,59	3,80	3,33	-0,47
12 anos	8,14	91,79	1,55	16,78	4,91	3,73	-1,18
Referência	9,43	126,06	12,83	212,09	4,04	3,53	-0,51
	Zn	Cu	Mn	Cr	Pb	Cd	As
	----- mg kg ⁻¹ -----						
2 anos	8,12	4,58	166,37	9,31	20,74	0,11	2,40
4 anos	19,84	7,79	510,40	5,60	28,00	0,12	3,76
6 anos	22,43	20,38	37,56	5,55	25,96	0,19	5,27
12 anos	30,71	7,86	694,68	5,14	19,08	0,12	0,85
Referência	14,29	35,51	128,01	1,52	9,68	0,16	13,53
CETESB*	86	60	-	75	72	1,3	15

*Valores de Prevenção. COT = Carbono orgânico total

Com relação as análises químicas do tecido foliar das plantas de bracinga das áreas com diferentes tempos de recuperação (Tabela 3), pode ser observado que todos os elementos-traço, com exceção do Mn, apresentaram valores abaixo dos considerados excessivos ou tóxicos, quando comparados com os teores compilados de vários trabalhos apresentados por KABATA-PENDIAS (2011). Em relação ao nitrogênio, observa-se os menores valores na área de menor tempo, bem como, na área referência.

Tabela 5: Teores foliares de N e elementos-traço na Bracatinga implantadas em áreas de mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação e faixa de valores de elementos-traço considerados fitotóxicos segundo Kabata-Pendias (2011).

Áreas	N	Zn	Cu	Mn	Cr	Pb	Cd	As
	(g kg ⁻¹)	----- mg kg ⁻¹ -----						
2 anos	28,5	29,84	7,19	418,05	0,75	5,24	0,09	0,04
4 anos	36,7	43,57	10,48	1214,66	0,90	5,65	0,10	0,09
6 anos	36,7	56,07	8,21	609,90	0,94	4,81	0,10	0,13
12 anos	34,9	26,31	10,74	975,99	0,55	5,11	0,07	0,04
Referência	28,2	24,21	13,33	554,90	0,92	4,20	0,05	0,05
KABATA-PENDIAS*		100- 400	20- 100	400- 1000	5-30	30- 300	5-30	5- 10

*Faixa de valores de elementos-traço em tecidos de folhas maduras considerados excessivos ou tóxicos para várias espécies.

6.2. ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO

Em relação aos atributos microbiológicos do solo das áreas revegetadas com bracatinga, pode-se observar que o NBM, CBM e o RBM apresentaram comportamentos semelhantes. Verificou-se que áreas com 4 a 12 anos de recuperação apresentaram incrementos médios de 281, 230, e 157% para a NBM, CBM e RBM, respectivamente, em relação ao menor tempo de recuperação (2 anos), respectivamente. Entretanto, essas áreas não atingiram os valores de NBM, CBM e RBM encontrados no solo de região de ocorrência natural da bracatinga (Tabela 4).

Com relação ao qCO_2 , que permite inferir sobre a atividade microbiana do ambiente, pode-se verificar que as áreas com menor tempo de recuperação (2 a 6 anos) apresentaram incremento médio de 60% em relação à área de 12 anos e de 149% em relação a área referência não impactada (Tabela 4). Já as contagens de bactérias e fungos do solo, expressas em UFC mL solo⁻¹, não apresentaram efeito significativo sobre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 6: Atributos microbiológicos de solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.

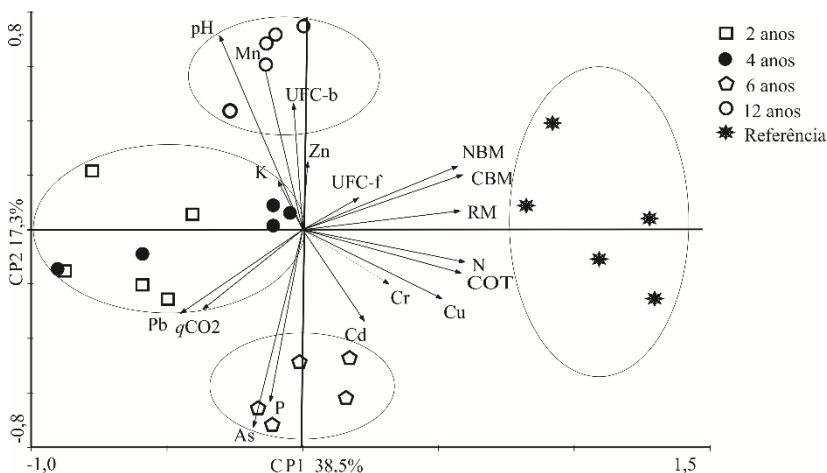
Áreas	NBM	CBM	RBM	qCO_2	Fungos	Bactérias
					($\times 10^4$)	($\times 10^5$)
---UFC mL solo ⁻¹ ---						
2 anos	8,53 c ¹	81,25 c	0,34 c	4,18 a	1,8 ns ²	4,8 ns
4 anos	28,63 b	231,91 b	0,92 b	3,97 a	3,0 ns	8,0 ns
6 anos	24,20 b	222,33 b	0,83 b	3,73 a	2,1 ns	6,6 ns
12 anos	44,69 b	351,34 b	0,87 b	2,48 b	3,9 ns	12,7 ns
Referência	323,06 a	2252,93 a	3,57 a	1,59 b	2,7 ns	12,5 ns

¹Letras seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5% de probabilidade. ² ns: F test não significativo a 5% de probabilidade; NBM: Nitrogênio da Biomassa microbiana (mg N kg solo⁻¹); CBM: Carbono da Biomassa microbiana (mg C kg solo⁻¹); RBM: Respiração Basal Microbiana (mg C-CO₂ kg solo⁻¹ h⁻¹); qCO_2 : quociente metabólico (mg C-CO₂ g CBM⁻¹ h⁻¹); UFC: unidades formadoras de colônias.

6.3. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Alternativamente, para correlacionar os atributos químicos e microbiológicos do solo e avaliar se ocorre um padrão de separação das áreas, foi feita uma ACP, onde pode-se observar que a projeção do primeiro eixo da componente principal explica 38,5% da variação (CP1), enquanto o segundo eixo (CP2) explica 17,3% da variação dos dados (Figura 6). Deste modo, os dois eixos juntos explicam 55,8% da variação considerando os atributos químicos e microbiológicos do solo. A partir das cinco áreas avaliadas, foi possível verificar a formação de 4 grandes grupos. Grupo 1 abrangendo as áreas com menor tempo de recuperação (2 e 4 anos); Grupo 2 representado pelas amostras da área de 6 anos; Grupo 3 representado pelas amostras da área de 12 anos; e Grupo 4 representado pelas amostras da área referência. A área referência difere das áreas em recuperação, mas principalmente das áreas em início de recuperação (2 e 4 anos). Este fato deve-se aos principais atributos que contribuem no eixo 1, como CBM, NBM, RM, COT, N e Cu (maiores na área referência), assim como qCO_2 e Pb (maiores nas áreas em início de recuperação). As áreas de maior tempo de recuperação (6 e 12 anos), possuem os componentes do eixo 2 como os principais responsáveis da separação dessas áreas, sendo que na área de 12 anos os atributos com maiores valores foram pH, Mn e UFC-b, enquanto na área de 6 anos P e As.

Figura 6: Análise de Componentes Principais dos atributos químicos e microbiológicos dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.



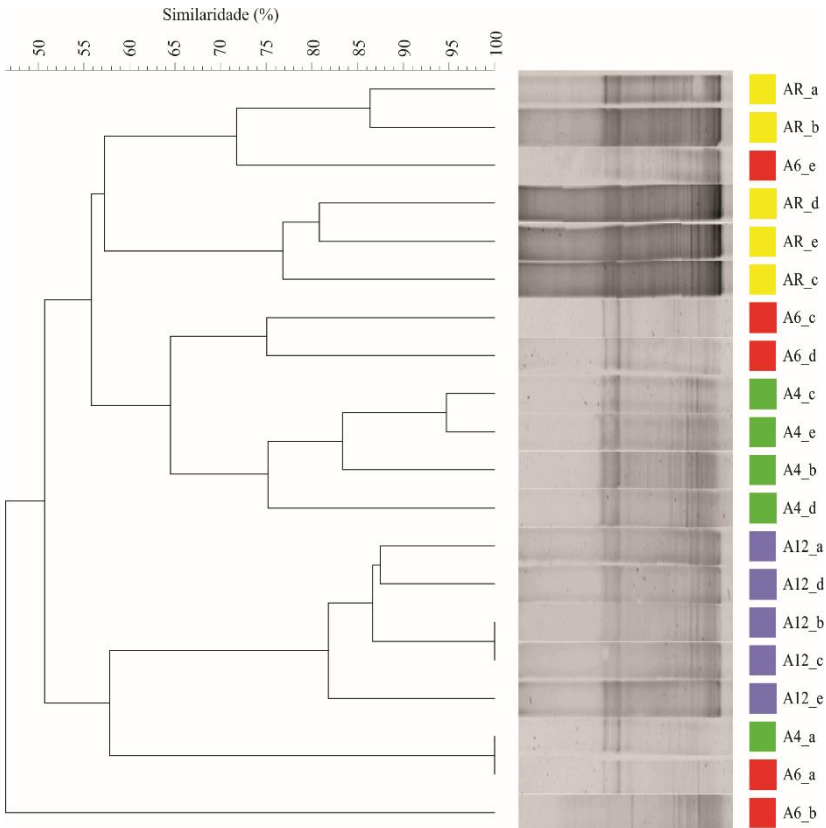
6.4. ESTRUTURA DAS COMUNIDADES MICROBIANAS EDÁFICAS E ENDOFÍTICAS

6.4.1. Solo

Nas análises de estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas das amostras de solo das áreas de recuperação da mineração de carvão, as amostras da área com 2 anos não foram incluídas nas análises. Isso ocorreu devido a baixa recuperação de DNA no processo de extração e, conseqüentemente, o insucesso na amplificação das amostras. Deste modo, as análises de solo contam apenas com as amostras provenientes das áreas de 4, 6, 12 anos e Referência.

Em relação à comunidade bacteriana edáfica, pela análise de agrupamento hierárquico (Figura 7) foi possível observar a formação de dois grupos com cerca de 47% de similaridade. Um destes grupos é composto por apenas uma amostra da área 6 anos. No outro grupo observa-se a formação de dois grandes grupos à 51% de similaridade, separando as amostras da área de 12 anos assim como uma amostra da área de 4 e uma de 6 anos, das demais amostras (4 e 6 anos e referência). Amostras provenientes da área de 6 anos não apresentam um padrão de distribuição, encontrando-se agrupadas com amostras de todos os estágios de recuperação. Para as demais áreas as comunidades de bactérias do solo apresentam um padrão de agrupamento mais evidente.

Figura 7: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de bactérias dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA. A nomenclatura inicial das amostras refere-se às áreas (A4, A6, A12 e AR), e letras correspondem às repetições (a-e). (A4: área de 4 anos; A6: área de 6 anos; A12: área de 12 anos; e AR: área referência).



Esses resultados podem ser comprovados estatisticamente pela análise de ANOSIM (Tabela 5), onde é possível observar um indicativo de dissimilaridade entre as amostras através do R global (0,468). Quando realizado o teste *pairwise*, nota-se que altas dissimilaridades significativas são encontradas entre a área de 4 e 12 anos (R=0,812), 4 anos e referência (0,790) e entre a área de 12 anos e referência (0,856). Em relação à área de 6 anos, apesar dos baixos valores encontrados em comparação com as demais áreas, mostra-se apenas significativamente semelhante à área de 12 anos (R=0,256).

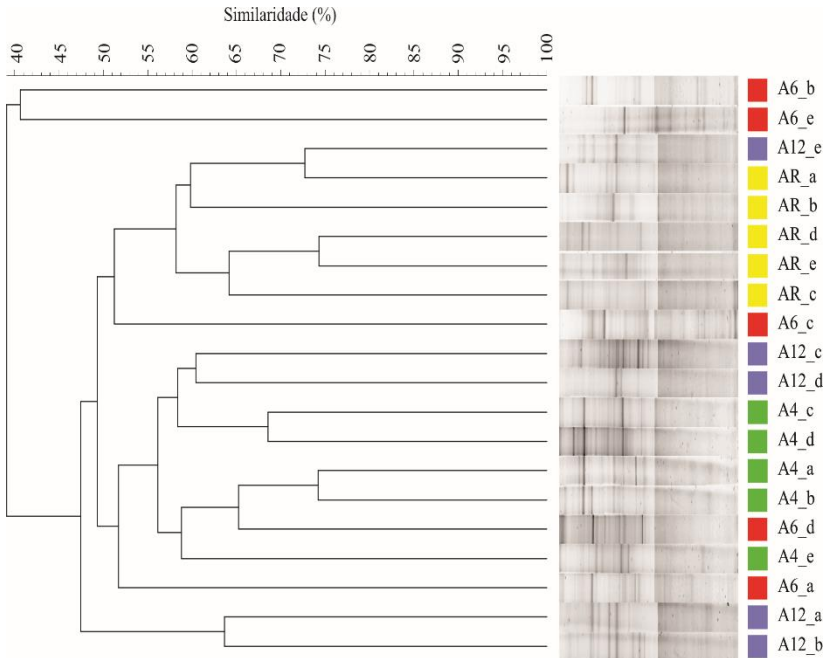
Tabela 7: Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (*Pairwise*) baseado nos perfis de amplicons da região 16S rRNA de bactérias presentes nos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.

Tratamento (Áreas)	Teste de <i>Pairwise</i> ¹			
	4 anos	6 anos	12 anos	Referência
4 anos	-			
6 anos	0,046	-		
12 anos	0,812*	0,256*	-	
Referência	0,790*	0,206	0,856*	-

(R global = 0,468; P < 0,001). ¹Valores de R *Pairwise*; * valor de P < 0,05.

Em relação à análise da comunidade fúngica do solo, nota-se a formação de dois grupos à cerca de 40% de similaridade (Figura 8). Um destes grupos é formado apenas por duas amostras provenientes da área 6 e outro grupo formado pelas demais áreas. Neste último pode-se observar a formação de dois grandes grupos com cerca de 47% de similaridade. Dentro deste grande grupo pode-se observar que todas as amostras da área referência estão agrupadas com pelo menos 58% de similaridade e as de 4 anos com 56 % de similaridade. Apesar da tendência destes grupos formarem uma separação por área, as amostras provenientes das áreas com 6 e 12 anos encontram-se dispersas entre as demais áreas, apresentam menos de 50% de similaridade entre todas as amostras, não consolidando assim, uma nítida separação entre as áreas. Além disso, comparativamente a estrutura da comunidade bacteriana, a similaridade da estrutura da comunidade fúngica entre as amostras das mesmas áreas é menor, demonstrando uma maior heterogeneidade deste grupo de microrganismos nas amostras analisadas.

Figura 8: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de fungos dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard eo método de agrupamento UPGMA. A nomenclatura inicial das amostras refere-se às áreas (A4, A6, A12 e AR), e as letras correspondem às repetições (a-e). (A4: área de 4 anos; A6: área de 6 anos; A12: área de 12 anos; e AR: área referência).



Considerando a análise de ANOSIM (Tabela 6), o valor do R global (0,396) nos mostra uma moderada dissimilaridade entre as áreas. Quando realizada a comparação par a par (teste *pairwise*), uma dissimilaridade moderada significativa é observada entre as áreas de 4 e 12 anos ($R=0,300$), enquanto verifica-se dissimilaridade significativas mais nítidas entre as áreas de 4 anos e referência ($R= 0,848$) e entre a de 6 anos e a referência ($R=0,696$). Entre a área de 4 e 6 anos, 6 e 12 anos e de 12 anos e referência, apesar de não significativas, mostram-se praticamente iguais, observando-se baixa dissimilaridade.

Tabela 8: Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (*Pairwise*) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos dos solos degradados pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.

Tratamento (Áreas)	Teste de <i>Pairwise</i> ¹			
	4 anos	6 anos	12 anos	Referência
4 anos	-			
6 anos	0,168	-		
12 anos	0,300*	0,202	-	
Referência	0,848*	0,696*	0,200	-

(R global = 0,3957; P < 0,002). ¹Valores de R *Pairwise*; * valor de p < 0,05.

6.4.2. Endofíticos

A eficiência do processo de desinfecção superficial dos tecidos foliares de bracinga foi avaliada através da realização de PCR da alíquota da última água de lavagem das folhas de bracinga. Tanto para bactérias quanto para fungos totais, não houve amplificação de nenhuma das amostras da água da última lavagem das folhas de bracinga.

A partir da confirmação da eficiência do processo de desinfecção superficial das folhas de bracinga foi realizada a avaliação da estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas das áreas com diferentes tempos de revegetação.

Pelo agrupamento hierárquico das bactérias endofíticas do tecido foliar da bracinga (Figura 9), pode-se observar a formação de dois grandes grupos a 30% de similaridade e dentro destes a formação de dois grupos com cerca de 33% de similaridade. Entretanto, não há um agrupamento evidente para nenhuma das áreas amostradas.

Tal fato pode ser confirmado através da análise de ANOSIM (Tabela 7), pelo baixo valor do R global (R=0,241), indicando baixa dissimilaridade entre as amostras. Pode-se observar através do teste *pairwise* que as maiores dissimilaridades observadas foram entre as áreas de 2 e 12 anos (R=0,516) e 2 anos e referência (R=0,550). Valores moderados são encontrados entre as áreas de 4 e 12 anos (R=0,262), 4 anos e referência (R=0,262), assim como, entre as áreas de 6 e 12 anos (R=0,398) e 6 anos e referência (R=0,462).

Figura 9: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de bactérias do tecido foliar de bracinga em áreas de mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA. A nomenclatura inicial das amostras refere-se às áreas (A2, A4, A6, A12 e AR), e os números correspondem às repetições (1-5). (A2: área 2 anos; A4: área de 4 anos; A6: área de 6 anos; A12: área de 12 anos; e AR: área referência).

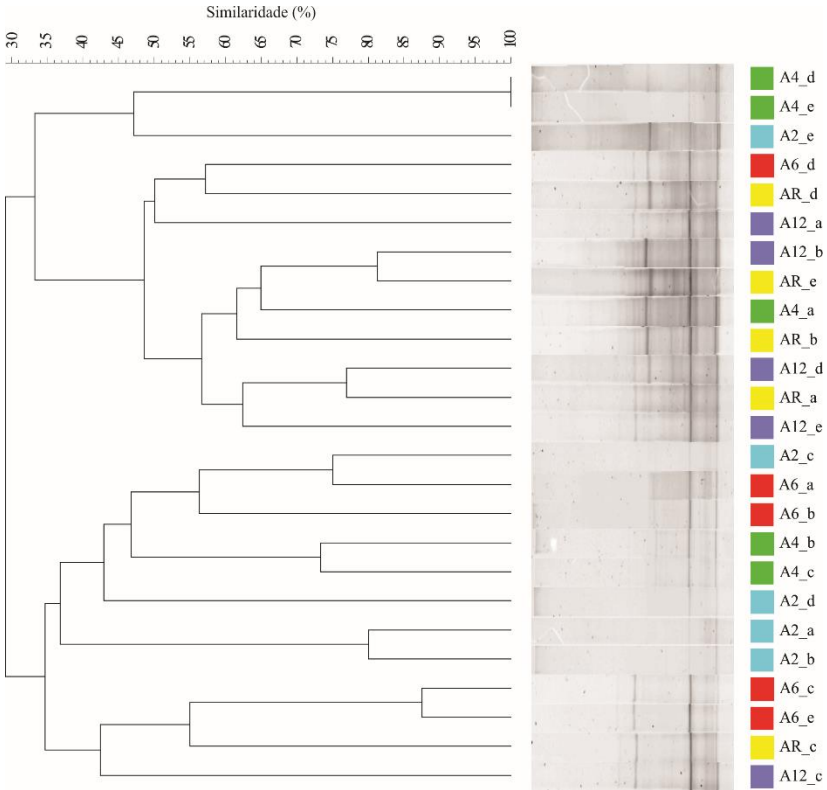


Tabela 9: Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (*Pairwise*) baseado nos perfis de amplicons da região 16S rRNA de bactérias do tecido foliar de bracinga em áreas degradadas pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.

Tratamento (Áreas)	Teste de <i>Pairwise</i> ¹				Referência
	2 anos	4 anos	6 anos	12 anos	
2 anos					
4 anos	-0,068				
6 anos	-0,096	-0,052			
12 anos	0,516*	0,262*	0,398*		
Referência	0,550*	0,262*	0,462*	-0,076	

R global = 0,241; P < 0,006). ¹Valores de R *Pairwise*; * valor de p < 0,05.

Em relação aos fungos endofíticos do tecido foliar da bracinga, assim como para bactérias, não houve agrupamento por tempo de recuperação das áreas degradadas pela mineração de carvão (Figura 10). Pode-se observar a formação de 2 grupos à 36% de similaridade, um formado por uma amostra da área de 4 anos e outro pelas demais amostras. No maior grupo formado, vários subgrupos podem ser observados, onde pode ser destacado que metade das amostras da área referência e de 12 anos agrupam-se com cerca de 60% de similaridade, demonstrando uma maior homogeneidade das comunidades fúngicas dessas áreas. As demais áreas demonstram um padrão de distribuição heterogêneo, típico de áreas que imprimem algum tipo de estresse às comunidades microbianas.

Pela análise de ANOSIM é possível observar uma tendência de dissimilaridade entre as áreas a partir do R global de 0,402 (Tabela 8). Em relação ao teste *pairwise*, diferenças significativas moderadas podem ser observadas entre as áreas de 2 e 6 anos (R=0,294) e 2 e 12 anos (R=0,374), enquanto que maiores diferenças significativas foram encontradas entre as áreas de 4 e 6 anos (R=0,514), 4 e 12 anos (R=0,716) e 4 anos e referência (R=0,662). Diferenças moderadas também foram encontradas entre a área de 6 e 12 anos (R=0,402) e 6 anos e referência (R=0,682).

Pelos resultados obtidos na avaliação da estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas das amostras de solo e do tecido foliar da bracinga, pode-se observar que a única comunidade que apresentou diferenças significativas consistentes entre as áreas, foi a estrutura da comunidade de fungos endofíticos.

Figura 10: Agrupamento hierárquico da estrutura de comunidade de fungos do tecido foliar de bracinga em áreas de mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação obtido a partir do coeficiente de Jaccard e método de agrupamento UPGMA. A nomenclatura inicial das amostras refere-se às áreas (A2, A4, A6, A12 e AR), e os números correspondem às repetições (1-5). (A2: área 2 anos; A4: área de 4 anos; A6: área de 6 anos; A12: área de 12 anos; e AR: área referência).

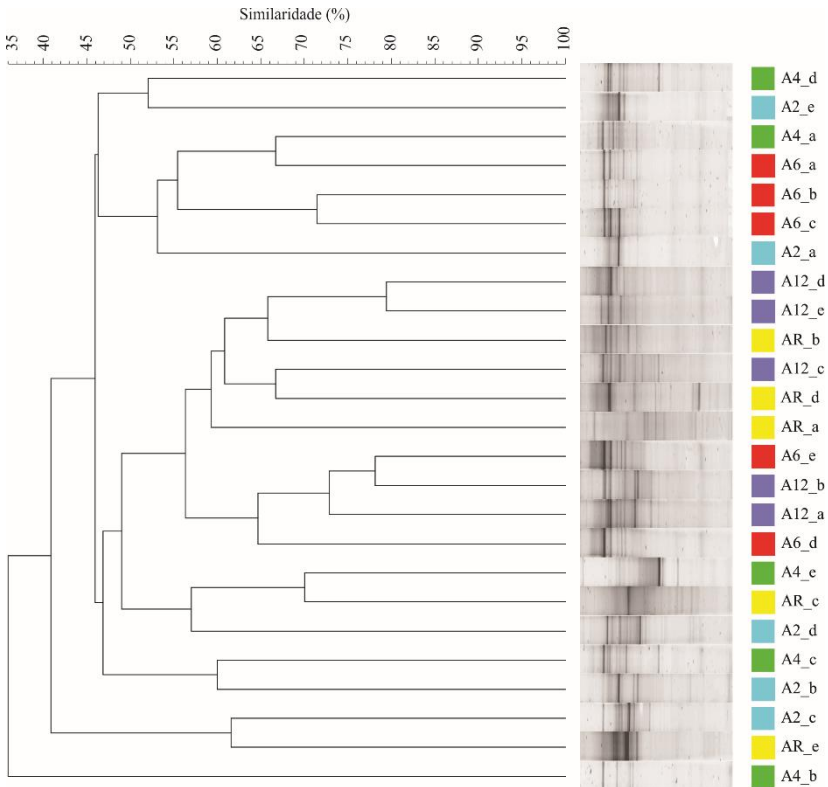


Tabela 10: Resultado do teste de ANOSIM por pareamento (*Pairwise*) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos do tecido foliar de bracinga em áreas degradadas pela mineração de carvão na região carbonífera de Santa Catarina com diferentes tempos de recuperação.

Tratamento (Áreas)	Teste de <i>Pairwise</i> '				Referência
	2 anos	4 anos	6 anos	12 anos	
2 anos					
4 anos	0,058				
6 anos	0,294*	0,514*			
12 anos	0,374*	0,716*	0,402*		
Referência	0,468*	0,662*	0,682*	0,208	

(R global = 0,4079; P < 0,001). 'Valores de R *Pairwise*; * valor de p < 0,05

6.4.3. Número de amplicons

Na tabela 9 é possível verificar que o número de amplicons entre os grupos microbianos avaliados não apresenta oscilação marcante entre as áreas degradadas em recuperação e a referência. Independentemente do tempo de recuperação ou do material analisado (solo ou folhas de bracinga), verifica-se que há maior quantidade de amplicons da comunidade fúngica em relação à bacteriana.

Tabela 11: Número de amplicons obtidos a partir da análise da DGGE para comunidade de fungos e bactérias do solo e endofíticas do tecido foliar de bracinga em áreas degradadas pela mineração de carvão em recuperação.

Áreas	Bactéria	Fungo	Bactéria	Fungo
	Solo		Endofítico	
2 anos	-	-	7	19
4 anos	17	28	12	20
6 anos	17	28	8	24
12 anos	14	31	12	30
Referência	23	30	12	27

7. DISCUSSÃO

7.1. ATRIBUTOS QUÍMICOS

Inicialmente, é importante ressaltar que a escolha da área de ocorrência natural da bracatinga como parâmetro de comparação com as áreas em recuperação, deve ser vista com ressalva, pois esta área possui características físicas, químicas e biológicas que dificilmente serão alcançadas pelas áreas em processo de recuperação estudadas. Este fato deve-se além das características da área de ocorrência natural da espécie, pela forte intervenção antrópica durante a atividade de mineração, bem como, pelos processos de recuperação adotados.

Em relação aos atributos químicos do solo das áreas degradadas pela mineração de carvão, destaque deve ser dado ao COT. O COT foi o que apresentou resultados mais expressivos, com aumento de teores comparando-se a área de menor tempo com as demais áreas em recuperação. Segundo SIQUEIRA, SOARES e SILVA (2008), para que ocorra a recuperação de processos funcionais em ambientes degradados, em nível satisfatório, deve-se recuperar no mínimo 20-25 g kg⁻¹ de carbono orgânico no solo (equivalente a 3-4% de MO). Deste modo, verificando-se a Tabela 2 é possível notar que apenas a área com menor tempo de recuperação não se encontra próxima desta faixa, indicado que com o decorrer do tempo de recuperação há aumentos nos teores de COT, embora não proporcional.

A incorporação de carbono orgânico é de grande importância para o restabelecimento das condições bióticas no ambiente, pois a matéria orgânica, e conseqüentemente o carbono orgânico, afetam inúmeras características físicas, químicas e biológicas do solo (BAYER & MIELNICZUK, 2008). Segundo os autores, a agregação é a principal característica de natureza física afetada pela MO que, indiretamente afeta a densidade, porosidade, aeração e infiltração de água. Entre as características de natureza química destacam-se a disponibilidade de nutrientes, CTC, complexação de elementos tóxicos e micronutrientes. Quanto as características biológicas do solo, atua como fonte de carbono, energia e nutrientes para os microrganismos quimioheterotróficos e, através da mineralização do N e S orgânico, atua como fonte de energia para os quimioautotróficos.

A área de 6 anos, que apresentou os maiores teores de COT entre as áreas em recuperação, possui características peculiares atualmente, como o predomínio de gramíneas herbáceas (destacando-se a braquiária), com esparsas árvores crescendo, predominantemente a

bracatinga. Vale salientar que a braquiária não foi implantada nesta área (6 anos), oriunda provavelmente do banco de sementes do substrato utilizado no remodelamento topográfico ou da dispersão de áreas adjacentes às recém recuperadas. Carneiro et al. (2008), avaliando atributos químicos e microbiológicos do solo em áreas de exploração de bauxita com diferentes tempos de recuperação e vegetação, verificaram que áreas recém-recuperadas (1 ano), apresentaram incrementos de cerca de 2% de matéria orgânica quando foram empregadas gramíneas no processo de recuperação (braquiária e capim gordura). Isto se deve, principalmente, à capacidade das gramíneas de se estabelecerem rapidamente, formando um sistema radicular abundante, ampliando o efeito rizosférico, facilitando assim o fluxo de C fotoassimilado para o solo (via rizodeposição) e posteriormente pela produção de necromassa (CARNEIRO et al., 2008). Com a constante renovação do sistema radicular, as raízes mortas são decompostas pelos microrganismos do solo, liberando nutrientes e alterando os compostos orgânicos que, além do efeito favorável na estruturação do solo, contribuem para melhoria das condições químicas, aumentando a disponibilidade de nutrientes (SALTON & TOMAZI, 2014).

As gramíneas são espécies colonizadoras de início de sucessão e apresentam as características ecológicas de tais plantas, encontrando no ambiente em fase de recuperação condições ambientais propícias ao seu desenvolvimento (RODRIGUEZ, 2010). Entretanto, tornam-se espécies invasoras altamente prejudiciais aos plantios de recuperação, pois são espécies extremamente agressivas, competidoras, com alta taxas de cobertura e de crescimento, além de difícil controle (PARROTA et. al., 1997; TOLEDO et. al., 1999). Este fato foi constatado por Nicoleite et al. (2013) nesta área em especial, onde verificaram maiores taxas de cobertura por gramíneas exóticas, uma maior mortalidade das mudas introduzidas e menor abundância de regenerantes. Devido ao fato, os benefícios promovidos por estas gramíneas devem ser vistos com ressalva quando se pretende a recuperação de áreas degradadas visando a formação de florestas nativas.

Além da contribuição das gramíneas no incremento do carbono orgânico do solo na área de 6 anos, um fator a ser considerado é a possibilidade da presença de estéreis (camadas de rochas retiradas para acesso às camadas de carvão) e rejeitos. Andreola (2011), estudando as áreas da região carbonífera de Lauro Muller (SC), também encontrou elevada quantidade de COT levando-se em consideração o tempo de recuperação e situação paisagística do local. A autora atribuiu as

quantidades erráticas encontradas à provável presença de materiais estéreis ou rejeitos que ainda possam estar presentes no local, superestimando assim tal atributo. . Outra possibilidade está relacionada a origem dos materiais orgânicos empregados no preparo das áreas. Apesar de não haver informações detalhadas sobre o substrato orgânico e o solo construído utilizado no remodelamento topográfico realizado previamente ao processo de revegetação, os substratos utilizados são potenciais fontes de carbono e, portanto, fortes candidatos para superestimar o seu valor quando empregada a metodologia de avaliação de COT no solo.

Deste modo, o COT apesar de ser avaliado como um potencial indicador químico de recuperação de ambientes degradados, quando avaliado isoladamente não nos fornece dados conclusivos com o decorrer do processo. Os resultados apontam que este atributo isoladamente deve ser visto com ressalva em tais áreas, devendo portanto, ser utilizando em conjunto os demais atributos bióticos do meio, para inferências sobre o processo de recuperação.

Em relação aos demais atributos químicos poucas informações nos fornecem em relação ao processo de recuperação, devido à heterogeneidade cronológicas dos dados verificadas com o decorrer do tempo de recuperação. Tal fato pode ser justificado pelo processo e materiais empregados no preparo das áreas.

Levando-se em consideração os elementos-traço no solo, estes se encontram abaixo do preconizado pela CETESB. Apesar da proximidade das fontes geradoras de drenagem ácida e conseqüentemente de disponibilização de elementos-traço, as áreas APP escolhidas para coleta, não apresentam teores considerados tóxicos para o estabelecimento de espécies vegetais. Tal fato pode ser atribuído ao processo de recuperação que envolve a retirada do material contaminante das áreas de APP (BRASIL, 2015), e também ao potencial de espécies vegetais em acumular tais elementos em seus tecidos, auxiliando na baixa disponibilidade no solo.

Já nas análises químicas do tecido foliar, o teor de N encontra-se dentro do que é reportado na literatura. Té et al. (2010) encontraram teores de 25 g kg^{-1} de N em folhas de bracinga entre 6 - 14 anos de idade, em povoamentos naturais em pequenas propriedades na região metropolitana de Curitiba. Caldeira (2003), estudando espécies da floresta ombrófila mista montana, encontrou teores de $37,60 \text{ g kg}^{-1}$ de N nas folhas da bracinga, destacando que a bracinga foi uma das espécies que apresentou maiores teores de N nas folhas. Segundo o autor, os maiores teores de N nas folhas de *Mimosa scabrella*,

comprovam o potencial de ciclagem de nutrientes desta espécie, via serapilheira.

Quanto aos teores de elementos-traço nas folhas, o Mn destacou-se por encontrar-se acima da faixa considerada tóxica para algumas espécies vegetais, segundo KABATA PENDIAS (2011). Para bracatinga, estudos com elementos traço considerados micronutrientes têm sido realizados, destacando-se B, Cu, Fe, Zn e Mn (CALDEIRA, 2003; TÉO et al., 2009; RIBEIRO & MACHADO, 2012). Caldeira (2003), estudando espécies arbóreas da floresta ombrófila mista montana verificou concentrações médias de Mn de 675 mg kg^{-1} , sendo que a bracatinga especificamente, apresentou concentração média de 509 mg kg^{-1} . Portanto, é provável que seja uma característica dessa leguminosa arbórea em absorver maiores quantidades deste elemento.

Utilizando a razão entre os teores de elementos-traço no material vegetal e no solo encontrou-se os valores médios de 2,2, 1,0 e 5,3, para Zn, Cu e Mn, respectivamente. Esses valores representam o potencial de bioacumulação de elementos-traço na bracatinga uma vez que, segundo MCGRATH & ZHAO (2003), valores superiores a 1 caracterizam plantas como bioacumuladoras. No entanto, estudos mais detalhados devem ser realizados em condições controladas para comprovar esta hipótese, incluindo a avaliação em diferentes partes do tecido vegetal como a raiz (fator de translocação) e formas químicas dos elementos-químicos presentes no solo.

Altos teores de elementos-traço podem interferir diretamente no processo de recuperação das áreas de mineração de carvão, devido a possibilidade de comprometer o crescimento microbiano e conseqüentemente o desenvolvimento de espécies vegetais não bioacumuladoras.

7.2. ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS

A partir das análises dos atributos microbiológicos foi possível verificar diferentes respostas com o tempo de recuperação das áreas.

O carbono e nitrogênio da biomassa microbiana (CBM, NBM) e a respiração basal (RBM) apesar de não apresentarem os valores atingidos na área de ocorrência natural da bracatinga, pelos motivos discutidos anteriormente, apresentaram incrementos com o tempo de recuperação das áreas, indicando uma melhoria da qualidade microbiológica do solo com o processo e vegetação. Já os atributos microbiológicos relacionados à contagem, não demonstraram ser bons indicadores de monitoramento do processo de recuperação das áreas

impactadas pela mineração de carvão (Tabela 4), uma vez que este método determina somente organismos cultiváveis.

O interesse no monitoramento dos atributos microbiológicos do solo deve-se a sua importância como indicadores da eficiência dos processos de revegetação, especialmente quando aplicada na remediação *in situ* (GEETS et al., 2008). Parâmetros bioquímicos que são mediados pela atividade microbiológica do solo têm sido caracterizados como indicadores precoces e sensíveis do estresse do solo ou de processos de restauração, sendo utilizados para indicar as tendências, a longo prazo, de recuperação da qualidade do solo (SAVIOZZI et al., 2002).

Dentre os atributos bioquímicos relacionados aos aspectos microbiológicos empregados na avaliação da qualidade do solo, a biomassa microbiana e suas atividades, têm fornecido informações úteis que permitem acompanhar o sucesso da implementação de técnicas de recuperação de solos contaminados (CARNEIRO et al., 2008; SANTOS et al., 2015). A biomassa microbiana do solo corresponde à massa de todos os microrganismos do solo (JENKINSON 1976), representando a parte viva da matéria orgânica, a qual regula as transformações bioquímicas, o estoque e o fluxo de C e outros nutrientes que são liberados durante a sua reciclagem (SIQUEIRA et al., 1994; GILLER; WITTER; MCGRATH, 1998).

Além disso, a fração da biomassa microbiana da matéria orgânica, devido à sua constituição representa um importante reservatório de C, N e P, contendo em torno de 1 a 5 % de C, 2 a 5 % de N e 2 a 20 % de P (SRISVASTAVA & SINGH, 1991). A biomassa microbiana é a fração mais instável do carbono orgânico, sendo altamente afetada por alterações no solo (SANTOS et al., 2015). Assim, os fatores que afetam negativamente o fornecimento de carbono no solo também afetam direta ou indiretamente a biomassa microbiana (SANTOS et al., 2013). Deste modo, estratégias que promovem o incremento deste atributo do solo são ferramentas potenciais no sucesso do processo de recuperação de áreas degradadas.

Dentre os componentes da biomassa microbiana, o CBM é um exemplo desses atributos, sensível às mudanças no ambiente do solo e, portanto, tem sido um dos atributos microbiológicos mais avaliados em estudos de solos afetados por elementos-traço (HE; YANG; STOFFELLA, 2005; RENELLA et al., 2008). O CBM é altamente influenciado pelos aportes de C e N nos solos, cujo balanço entre o COT e o nitrogênio mineral deve ser suficiente para suprir o crescimento da microbiota do solo, sendo estes posteriormente disponibilizados na

forma de C e N orgânicos através da morte dos microrganismos (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006).

A vegetação por meio da rizodeposição e também via deposição de material orgânico mais facilmente decomponível pode influenciar o CBM e NBM, fazendo com que esses atributos apresentassem relação com os estágios de recuperação. Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam os estudos que apontam o CBM como potencial indicador de solos degradados (HE; YANG; STOFFELLA, 2005; RENELLA et al., 2008; SANTOS et al., 2013; SANTOS et al., 2015). Carneiro et al. (2008) verificaram que a mineração de bauxita provoca grande impacto no solo, causando déficits de até 99 % nos teores de COT, nitrogênio total, biomassa microbiana e atividade enzimática do solo. Entretanto, a revegetação das áreas mineradas promoveu a recuperação dos atributos bioquímicos do solo, sendo que estes se recuperam mais rapidamente (a partir de um ano) que os teores de CO e N total, que apresentaram concentrações semelhantes às da área referência, com tendências estáveis, a partir de 18 anos de reabilitação. O CBM também mostrou melhorias em áreas revegetadas impactadas pela mineração contaminadas com elementos-traço, em distintos tempos de recuperação, conforme estudos realizados por Santos et al. (2013) e Santos et al. (2015). Isso também foi demonstrado em estudos realizados por Quadros et al. (2016), em áreas de mineração de carvão em recuperação no RS. Esses resultados evidenciam que o CBM pode ser um importante atributo microbiológico na avaliação de ambientes degradados em processos de recuperação.

Em relação a RBM, esta tem pouco significado quando avaliada isoladamente, pois com o aumento da quantidade de microrganismos é esperado um aumento da respiração, entretanto a proporção entre estes atributos é que se torna relevante, o que caracteriza o quociente metabólico do solo (qCO_2).

O valor do qCO_2 torna possível uma inferência sobre a eficiência da biomassa microbiana em utilizar o carbono disponível para a biossíntese, mostrando-se como um sensível indicador para estimar a atividade biológica e a qualidade do substrato (SAVIOZZI et al., 2002). A utilização do qCO_2 como uma medida de indicador de mudanças na qualidade do solo está baseado em ODUM (1985). Segundo o autor, o aumento na respiração da comunidade pode ser o indicativo de ambientes sob estresse, uma vez que a reparação dos danos causados por distúrbios no solo requer desvio de energia do crescimento e reprodução para a manutenção celular. Deste modo, tais situações levarão a biomassa microbiana a direcionar mais energia para a manutenção

celular, em lugar do crescimento, de forma que uma proporção de carbono da biomassa não será incorporada e sim, perdida como CO_2 .

Ao se observar a tabela 4, verifica-se diminuição do $q\text{CO}_2$ com o aumento do tempo de recuperação. Como resultado, tem-se uma maior incorporação do que perdas de C na forma de CO_2 , indicando uma diminuição do estresse nestes locais e condições favoráveis para o crescimento regular dos mesmos, indicando, portanto, a eficiência do processo de vegetação.

Na região carbonífera de Criciúma, os resultados encontrados dão indícios que o processo de vegetação vem recuperando com êxito os atributos microbiológicos do solo, os quais seriam os últimos a serem recuperados em áreas em processo de reversão da degradação. Estes por sua vez, tanto são influenciados pelo processo como também podem influenciá-lo pela sua participação na melhoria nos atributos químicos e físicos do solo e até mesmo pela própria interação existente no meio biótico do solo, dando portanto, suporte para a sucessão ecológica nestes locais.

Nicoleite et al. (2013) mencionam que, após a implantação do projeto de restauração florestal, são necessárias duas categorias de monitoramento, de implantação e de sustentabilidade, realizados simultaneamente, mas com diferentes objetivos. Este segundo contemplaria respostas relacionadas à sustentabilidade do projeto, fornecendo subsídios suficientes para a avaliação das atividades de implantação e de manutenção do mesmo, e que necessitam de uma rápida resposta. Entretanto, os autores não consideraram os atributos microbiológicos, os quais apresentam respostas rápidas com o tempo de recuperação, conforme demonstrado no presente trabalho. A avaliação da biomassa microbiana deve ser considerada em conjunto com atributos químicos como COT e Nitrogênio total. Observando-se a Figura 6, estes apresentam a mesma influência e padrão de distribuição que distingue os grupos, principalmente, 1 e 4, formados pelas áreas de menor tempo (2 e 4 anos) e referência, respectivamente.

No entanto, apesar da eficiência obtida na resposta do conjunto de alguns parâmetros químicos e microbiológicos do processo de recuperação das áreas degradadas pela mineração de carvão, um ponto que deve ser considerado diz respeito as comunidades microbianas que estão se desenvolvendo nestas áreas ao longo do tempo de recuperação. Tal fato deve-se que as respostas obtidas com os parâmetros descritos até o momento, permitem avaliar a biomassa e ter uma idéia da atividade dessa microbiota nessas áreas. No entanto, tão importante quanto esses aspectos é a diferenciação das comunidades microbianas

dessas áreas, o que permite determinar se ocorrem alterações ao longo do tempo de recuperação, identificando padrões com a avaliação da estrutura das comunidades.

Posteriormente, caso padrões sejam estabelecidos, com o emprego de técnicas mais sensíveis, será possível identificar a microbiota presente nessas áreas e identificar funcionalidades. Este aspecto é determinante no processo de recuperação de áreas degradadas, pois quanto maior for a redundância funcional estabelecida em um ambiente, maior será sua resiliência e, conseqüentemente, maior sua estabilidade, fornecendo condições para a recuperação das áreas degradadas pela mineração de carvão.

7.3. ANÁLISES MOLECULARES

A técnica de DGGE vem sendo uma ferramenta muito eficiente de avaliação de estrutura de comunidades microbianas em ambientes naturais, assim como, no monitoramento de ambientes sujeitos à degradação, como mangues contaminados por petróleo (CURY, 2012), áreas agrícolas (RACHID et al., 2012) e, mais recentemente, áreas de mineração contaminadas por elementos-traço (SANTOS et al., 2015). No presente trabalho, esta técnica permitiu avaliar o comportamento dos principais grupos microbianos (fungos e bactérias) presentes no solo e endofiticamente em folhas de bracinga em áreas degradadas pela mineração de carvão, sendo esse o primeiro estudo dessa natureza. Na literatura é crescente o número de pesquisas com comunidades endofíticas em espécies arbóreas (SCHOLTYSIK et al., 2012; SURYANARAYANAN et al., 2011; GORE & BUKAT, 2007), sendo que muitas das pesquisas recentes adotam o estudo da filosfera (endofíticos e epifíticos do tecido foliar), e não somente dos microrganismos endofíticos (LAMBAIS et al., 2006; REDFORD et al. 2010; KEMBEL et al., 2014; KIM et al., 2012). Entretanto, independentemente da abordagem utilizada, estudos com bracinga são inexistentes.

Ao se avaliar a estrutura de comunidades microbianas, uma maior semelhança entre as áreas de maior tempo de recuperação e a referência foi observada para a comunidade de fungos endofíticos, fato não constatado para a comunidade bacteriana, tanto edáfica quanto endofítica, bem como a comunidade fúngica edáfica. Enquanto que, como discutido anteriormente, os atributos microbiológicos CBM, NBM, RBM e qCO_2 apresentaram relação direta com o tempo de recuperação, alcançando este último os valores da área referência. Deste

modo, é possível observar que esses resultados evidenciam a capacidade distinta dos atributos microbiológicos em revelar o grau de recuperação das áreas impactadas pela atividade de mineração de carvão.

Embora diferenças das áreas em recuperação em relação à referência possam ser esperadas, as comunidades bacterianas edáficas, utilizando a técnica do DGGE, não apresentaram diferenças na estrutura das comunidades de acordo com o tempo de recuperação. Verifica-se que a área de 6 anos se assemelha com áreas de ocorrência natural da espécie, não sendo um grupo de monitoramento efetivo para essas áreas.

Nielsen et al. (2010), apesar de não realizarem estudos temporais, encontraram que diferentes fatores afetam os distintos grupos de microrganismos do solo, demonstrando que fatores químicos como pH e a relação C/N estariam mais relacionados aos grupos de bactéria e arqueias, respectivamente, enquanto as espécies vegetais estariam mais relacionadas à comunidade fúngica. Entretanto, pode-se observar que para a comunidade bacteriana, o pH não é um dos fatores mais explicativos neste estudo, tendo em vista que a área de 6 anos é a que possui o menor pH e, ainda assim, se assemelha às demais. Em relação à comunidade fúngica, às baixas dissimilaridades entre as áreas, podem estar relacionadas à deposição das folhas e efeito da planta, sendo estas possivelmente capazes de selecionar este grupo microbiano, tendo em vista que as amostras foram coletadas na projeção da sua copa.

Lambais et al. (2006) e Redford et al. (2010), estudando a variação da comunidade bacteriana da filosfera de espécies arbóreas utilizando técnicas independentes de cultivo, observaram que a variação entre as espécies vegetais é mais significativa do que dentro da espécie. Apesar destes estudos não incluírem análises das estruturas bacterianas em diferentes idades da planta, parece haver uma tendência de espécies arbóreas selecionarem as espécies bacterianas. Redford et al. (2010), avaliaram também a comunidade bacteriana da filosfera de folhas de *Pinus ponderosa* em distintos locais e verificaram que a espécie vegetal tem maior influência sobre as espécies microbianas encontradas na folha do que a própria distribuição geográfica. Estes autores ressaltam que diferenças entre espécies em comunidades da filosfera podem estar relacionadas com características específicas das folhas, como a estrutura fina da cutícula e composição, idade da folha, composição química foliar e/ou emissões de compostos orgânicos voláteis, necessitando de mais estudos para confirmação de tal hipótese. Estes trabalhos, apesar de estudarem a filosfera, corroboram com os dados obtidos no presente estudo, não apresentando grandes diferenças entre as áreas em relação à

estrutura de bactérias endofíticas, independentemente da idade da mesma.

Ao contrário do encontrado na literatura para bactérias, estudos com fungos endofíticos em espécies arbóreas utilizando técnicas independentes de cultivo são escassos. Embora CORDER et al. (2012), tenham demonstrado haver uma influência genética maior que a fisiológica e geográfica, para a seleção de fungos endofíticos em *Fagus sylvatica*, o presente trabalho demonstrou haver uma tendência de relação com o a idade da planta.

Deste modo, os resultados obtidos com este trabalho despertam o interesse em explorar o grupo dos fungos endofíticos em bracatinga, devido a respostas promissoras apresentadas com o tempo de recuperação das áreas. Estes podem exercer importantes funções tanto nas plantas, como no solo, com a deposição da serapilheira e consequentemente exercer funções chaves para a recuperação de ambientes degradados com a bracatinga.

8. CONCLUSÕES

- Os atributos químicos do solo não apresentaram relação direta com o tempo de recuperação das áreas de mineração de carvão.
- Os atributos microbiológicos edáficos apresentaram melhorias com o decorrer do tempo de recuperação, como o aumento do CBM e NBM e diminuição do qCO_2 , indicando o potencial de utilização desses atributos no monitoramento das áreas impactadas.
- A comunidade fúngica e bacteriana edáfica não apresentou relação direta com o estágio de recuperação das áreas, indicando ser afetada por outros fatores.
- A comunidade de fungos endofíticos de folhas de bracatinga apresentou alterações significativas com o tempo de recuperação e, portanto, deve ser estudada quanto a funcionalidade e papel na recuperação das áreas impactadas pela mineração de carvão.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a realização do presente trabalho foi possível observar que os distintos métodos de preparação das áreas impossibilitam uma inferência confiável quanto a relação dos atributos químicos do solo com o processo de recuperação destas áreas. Isto poderia ser resolvido através do preparo das áreas a campo de forma padronizada pelos responsáveis pelos projetos de recuperação, ou até mesmo incentivando que tais responsáveis reservassem parte das áreas para projetos de pesquisa relacionados à implementação de alternativas de recuperação e de avaliação do processo nestes locais.

Pelos resultados obtidos, estudos relacionados à bioacumulação da bracinga devem ser realizados em condições controladas e, posteriormente, à campo afim de avaliar o potencial da espécie para utilização em ambientes contaminados por determinados elementos bioacumulados pela mesma.

Pelo presente estudo foi possível também observar que os atributos microbianos, como CBM, NBM e $q\text{CO}_2$, podem ser adotados no monitoramento dos microrganismos das áreas degradadas pela mineração de carvão, devendo estes serem avaliados juntamente às análises da flora e da fauna preconizadas para o monitoramento das áreas degradadas pela mineração, respondendo de forma rápida ao processo de recuperação.

Aliado ao fato, a técnica do DGGE nos fornece uma indicação de mudança de estrutura de comunidades, entretanto, sabe-se da limitação da técnica relacionada com o fato de cada banda poder representar mais de uma espécie microbiana, assim como, não se obter uma análise quantitativa confiável a partir desse método. Deste modo, a partir dos dados obtidos é demonstrada a necessidade de estudos mais aprofundados em condições controladas, contemplando as variáveis de estudo, assim como, a utilização de outras ferramentas com maior poder de resposta, como o sequenciamento de nova geração. Assim, será possível identificar as comunidades fúngicas endofíticas que se alteram com o decorrer do tempo de recuperação, visando identificar e inferir funcionalidades a esse grupo de microrganismos nas áreas degradadas pela mineração de carvão em recuperação.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (ANEEL). **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3.ed. – Brasília : Aneel, 2008. 236 p.
- AISLABIE, J. & DESLIPPE, J.R. Soil microbes and their contribution to soil services. In: Dymond J.R. ed. **Ecosystem services in New Zealand – conditions and trends**. Manaaki Whenua Press, Landcare Research, New Zealand, 2013. v. 143161, p.143-161.
- ALBERTSEN, M. et al. Back to Basics – The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0132783, 2015.
- ANDERSON, J. P. E. & DOMSCH, K. H. The metabolic quotient of CO₂ (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental condition, such as pH, on the microbial of forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.
- ANDREOLA, A. **Avaliação dos atributos químicos de um solo construído pós - mineração de carvão no município de Lauro Müller, SC / 2011**. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2011..
- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.417-432, 2009.
- ARAÚJO, L.P.P. Carvão mineral. In: BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Sumário Mineral. Brasília**. Brasília,: DNPM, 2014. v. 34, p.46-48.
- ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xilella fastiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.4906-4914, 2002.
- ARNOLD A. E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters** v. 3,p267-274, 2000.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 51–66, 2007.

ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p.1502-1507, 2001.

ARNOLD, A.E.; LUTZONI. F. Diversity And Host Range Of Foliar Fungal Endophytes: Are Tropical Leaves Biodiversity Hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p.541–549, 2007.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia microbiana**. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 1998. 486p.

BAYER, C. & MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G. A. et al. **Fundamentos da Matéria orgânica do solo Ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2ed. ver. e atual. Porto Alegre: Metropole, 2008. p.7-16.

BELLITTO, M. W.; WILLIAMS, H. T.; WARD, J. N. Application of ameliorative and adaptative approaches to revegetation of historic high altitud mining waste. In Conference: 16th Annual National Meeting of the American Society for Surface Mining and Reclamation, Scottsdale, AZ (US), 1999.

BELOLLI, M. et al. **História do Carvão de Santa Catarina**. Criciúma: Imprensa Oficial do Estado de Santa Catarina, 2002. 300p.

BALOTA, E. L. et al. Biomassa Microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas R. Bras. Ci. Solo, 22:641-649, 1998

BORBA, R. F. Carvão mineral. In: **Balço mineral brasileiro** Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), 2001

BP Statistical Review of World Energy (2014) 64th. ed. Disponível em: <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical->

review-2015/bp-statistical-review-of-world-energy-2015-full-report.pdf. Acessado em: 07/01/2016.

BRASIL. Decreto nº 85206, de 25 de setembro de 1980. Dispõe sobre as medidas de prevenção e controle da poluição Industrial. Diário Oficial da União, Brasília, 25 de setembro de 1980. 159º da Independência 92ª da República.

BRASIL. Justiça Federal. 1ª vara Federal de Criciúma, SC. Ação Civil Pública nº 93.8000533-4 (Processo nº 2000.72.04.002543-9). **Critérios para recuperação ou reabilitação de áreas degradadas pela mineração de carvão.** Criciúma, mar. 2015a.

BRASIL. Justiça Federal. 1ª vara Federal de Criciúma, SC. Ação Civil Pública nº 93.8000533-4 (Processo nº 2000.72.04.002543-9). **Proposta sobre o conjunto de indicadores e plano de monitoramento e acompanhamento da qualidade ambiental.** Criciúma, mar. 2015b.

BRASIL. Lei Federal nº 12.651, de 25 de maio de 2012. O Novo código Florestal Brasileiro. Brasília. Congresso Federal, 2012.

BRASIL. Lei Federal nº 9.985/2000, **de 18 de julho de 2000.** Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC). Brasília: Congresso federal, 2000.

BURKART, A. **Leguminosas mimosóideas.** Itajaí, Herbario Barbosa Rodrigues (Tradução e observações ecológicas por Roberto Miguel Klein). 1979, 299 p.

CALDEIRA, M. V. W. **Determinação de biomassa e nutrientes em uma floresta ombrófila mista montana em general carneiro, Paraná-Curitiba.** 2003. 196p. Tese (Doutorado em Ciências florestais) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2003.

CALLAWAY, R. M. Positive interactions among plants. **The botanical review**, New York, v. 61, n. 4, p. 306-349, 1995.

CAMPOS, M. L. et al. Impactos no solo provocados pela mineração e depósito de rejeitos de carvão mineral. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 2, p. 198-205, 2010.

CARNEIRO, M. A. C. et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossequências de reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p.621-632, 2008.

CARPANEZZI, A. A. et al. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth)**. Curitiba, PR. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1988. 70p.

CARVALHO, P. E. R. & CARPANEZZI, A. A. Espécies florestais com associações simbióticas, promissoras ou indicadas para plantio no Sul do Brasil. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS: Associações biológicas entre espécies florestais e microorganismos para aumento da produtividade economica dos reflorestamentos. n. 7, 1982, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1982. p.7-17

CARVALHO, P. E. R. Composição e crescimento de um povoamento natural de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham.). In: SEMINARIO SOBRE ATUALIDADES E PERPECTIVAS FLORESTAIS Bracatinga uma opção para reflorestamento n. 4, 1981, Curitiba. **Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNPF, 1981, p. 77-90.

CARVALHO, P. E. R. *Mimosa scabrella* Bentham. var aspericarpa (Hoehne) Burkart. In: CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendacoes silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPF/Brasilia: EMBRAPA SPI., 1994. p. 344- 347.

CAVAGLIERI L. et al. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbial Research**, v. 164 , n. 4 ,p. 391-399, 2009.

CHAUDHARY, D. R. et al. Microbial Profiles of Rhizosphere and Bulk Soil Microbial Communities of Biofuel Crops Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and Jatropha (*Jatropha curcas* L.) **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, 2012.

COELHO, S. R. F. **Crescimento e fixação de nitrogênio em plantios mistos de eucalipto e leguminosas arbóreas. 2006. 55p.** Dissertação

(Mestrado em Recursos Florestais: Silvicultura e Manejo Florestal) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC . **Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina.** Porto Alegre: SBCS-NRS, 2004. 394p

COPPIN N. J. & BOX J. Sustainable rehabilitation and revegetation: The identification of the after use option for mines and quarries using a land suitability classification involving nature conservation. In: WARHURTS A. & NORONHA L. **Environmental policy in mining: Corporate strategy and Plan for closure.** 1998.

CORDIER, T. et al. Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). **Fungal Ecology**, v. 5, n. 5, p. 509–520, 2012.

CUI, H. et al. Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere and bulk soil of *Stellera chamaejasme* L. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 3, p.171-181, 2015.

CURY, J. C. **Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo.** 2002. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

DELGADILLO, L. A. E et al. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación Tropical and Subtropical. **Agroecosystems**, v. 14, n. 2, p. 597- 612, 2011.

DEPARTAMENTO NACIONAL DA PRODUÇÃO MINERAL (DNPM). **Anuário Mineral Brasileiro.** Brasília: DNPM, 2010.

Ministério do Meio Ambiente (MMA), **PNIA 2012 PAINEL NACIONAL DE INDICADORES AMBIENTAIS: Referencial teórico, composição e síntese dos indicadores da versão-piloto.** Brasília, 2014.

DIAS, L.E.; PENEDO, A.P.; MELO, R.F. Revegetação de substratos sulfetados remanescentes de mineração: avanços e limitações. VI Simpósio Nacional e Congresso Latinoamericano sobre Recuperação de Áreas Degradadas - A fauna em foco. 2005 (Palestra).

DOMINATI, E.; PATTERSON, M.; MACKAY, A. A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. **Ecological Economics**, v. 69, n. 9, p.1858-1868, 2010.

DOTY, S. L. Nitrogen-Fixing Endophytic Bacteria for Improved Plant Growth, in: MAHESHWARI, D. K. ed. **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses**. Springer Science & Business Mediar, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3ªed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013. v.1. 353p.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE- BRASIL) **Balço Energético Nacional 2015: Ano base 2014**. Rio de Janeiro Empresa de Pesquisa Energética-: EPE, 2015.

FERRARI, A. E. & WALL, L. G. Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. **Revista Facultad Agronomia La Plata**. v. 105, n. 2, p 63-87, 2004.

FIERER, N. et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 52, 2012.

FINNEY, K. N.; SHARIFI, V. N.; SWITENBANK, J. Combustion of spent mushroom compost and coal tailing pellets in a fluidised-bed. **Renewable Energy**, v. 34, n. 3, p. 860-868, 2009.

FRANCO, A. A. & DE FARIA, S. M. The contribution of N₂ fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 897 -903, 1997.

FUNGARO, D. A. & IZIDORO, J. C. Remediação de Drenagem Ácida de Mina Usando Zeólitas Sintetizadas a Partir de Cinzas Leves de Carvão. **Revista Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 735-740, 2006.

GAIVIZZO, L. B. et al. Potencial poluidor de rejeitos carboníferos. I - caracterização química da água de lixiviação. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p.771-780, 2002.

GALATTO, S. L. et al. Emprego de coberturas secas no controle da drenagem ácida de mina – estudos em campo. **Engenharia sanitária ambiental**, v. 12, n. 2, p. 229-236, 2007.

GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, v. 2, n. 2, p.113–118, 1993.

GAZIS, R. & CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal ecology** v. 3, n. 3, p. 240 – 254, 2010.

GEETS, J. et al. Microbial activities, monitoring and applications as part of a management strategy for heavy metal-contaminated soil and ground water. In: **NAIDU, R.** (ed) *Chemical Bioavailability in Terrestrial Environments*. 1ed. Developments in Soil Science, 2008, v. 32, p. 521–559.

GIANFREDA, L. & BOLLAG, J.M. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. In: STOTZKY, G. e BOLLAG, J. M. (eds). **Soil Biochemistry**. New York, ,1996 v. 9, , p. 123-193.

GILLER, K.E.; WITTER, E.; MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 10, p. 1389–1414, 1998.

GLICK, B. R. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 367–374, 2010.

GOMES, A. J. P.; CRUZ, P. R.; BORGES L. P. Recursos Minerais Energéticos: Carvão e Urânio. In: BIZZI, L. A. et al. **Geologia**,

tectônica e recursos minerais do Brasil : texto, mapas & SIG. Brasília: CPRM – Serviço Geológico do Brasil, 2003, p. 577-628

GONÇALVES, F. C. **Efeito de plantas de cobertura sobre os atributos físicos de um solo construído na área de mineração de carvão de Candiota-RS após três anos.** 2008. 91p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

GORE, M. E. & BUCAK, C. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. **Forest Pathology**, v. 37, n. 4, p. 281–288, 2007.

GOULARTI, F. A. & MORAES, F. F. Formação, expansão e desmonte parcial do complexo carbonífero catarinense. **Revista História & Perspectivas**.v. 1, n. 40, 2009. HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analyses. **Paleontologia eletrônica**, v. 4, 2001.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HE, X. et al. Diversity and decomposition potential of endophytes in leaves of a *Cinnamomum camphora* plantation in China. **Ecol Res** v. 27, n. 2, p.273–284, 2012.

HE, Z. et al. Development and application of functional genes arrays for microbial community analysis. **Transactions of Nonferrous Metals Society of china**, v. 18, n. 6 p. 1319-1327, 2008.

HE, Z. L.; YANG, X.E.; STOFFELLA, P.J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, n. 2, p. 125–140, 2005.

HEBERLE, E. dos S. et al . Occurrence and Structure of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Cassava after Cultivation of Cover Crops as Observed by the “PCR-DGGE” Technique. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 39, n. 5, p. 1292-1301, 2015.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology** v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

IHRMARK, K. et al. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 3, p. 666–677, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) & INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA) . Key World Energy Statistics, 2015. International energy Agency.

https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld_Statistics_2015.pdf . Acessado em 03/01/2016.

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, 1976.

JOHNSTON-MONJE, D. & RAIZADA M. N. Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology. **Plos One**, v. 6, n. 6, p. 20396, 2011.

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soil and plants 4th ed. Boca Raton CRC, 2011. 505 p.,

KARLSSON, I. et al. Fungicide Effects on Fungal Community Composition in the Wheat Phyllosphere. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. e111786, 2014.

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. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2010.

KEMBEL, S. W. et al. Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 38, p. 13715–13720, 2014.

KHAN, Z. & DOTTY, S. Endophyte-assisted phytoremediation. **Curr Topics in Plant Biology**, v. 12, p. 97–105, 2011

KIM, M. et al., Distinctive Phyllosphere Bacterial Communities in Tropical Trees. **Microbial ecology**, v. 63, n. 3, p. 674–681, 2012.

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, 2008, p. 25-35.

LAMBAIS, M. R. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1917, 2006.

LAMBAIS, M. R. et al. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos Ci. Solo**, v. 4, p. 43-84, 2005.

LI, Y. et al. Succession of Bacterial Community Structure and Diversity in Soil along a Chronosequence of Reclamation and Re-Vegetation on Coal Mine Spoils in China. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. e115024, 2014.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1 e 2 ed. São Paulo: Editora Plantarum, 1998.

MARTINS, C. M. et al. Atributos químicos e microbianos do solo de áreas em processo de desertificação no semiárido de Pernambuco. **R. Bras. Ci. Solo**, 34:1883-1890, 2010.

MCGRATH, S. P. & ZHAO, F. J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current Opinion in Biotechnology** v. 14, n. 3, p. 277–282, 2003.

MCNEAR Jr., D. H. The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. **Nature Education Knowledge**, v. 4, n. 3, p.1, 2013.

MELLONI, R. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, p.85-93, 2004.

MEURER, E. J.; RHEINHEIMER, D. ; BISSANI, C. A. Fenômenos de superfície. In: Meurer, E. J. (Org.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: **Genesis** 2000. v. 5, p. 77-105.

MILIOLE , G. et al. O Sul do Estado de Santa Catarina (2004). Disponível em: http://www.ib.usp.br/limnologia/Sul_catarinense/Sulcatarinense/ Acessado em: 03/12/2015.

MISAGHI, I. J. & DONNDELINGER, C. R. Endophytic Bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v. 80, n. 9, p. 808-811, 1990.

MOREIRA, F. M. de S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. atual e ampl. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729p.

MORGAN, R. P. C. **Soil erosion and Conservation**. 3rd edition. U. K.: Blackwell Publishing Ltd, ,2005.

MURPHY, J. & RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimia Acta**, v.27, p.31–36, 1962.

MUYZER, G.; De WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NAIK, B. S. et al. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro* **Microbiological Research**, v. 164, n. 3, p. 290–296, 2009.

NASCIMENTO, C. W. A. & BIONDI, C. M. Fitorremediação de solos contaminados por metais pesados. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E .R. S. **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 463-486.

NEWMAN, L.A. & REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, n. 1, p. 6-8, 2005.

NICOLEITE, E. R. et al, **Mata Ciliar: implicações técnicas sobre a restauração após a mineração de carvão**. Criciúma: SATC, 2013. 80p.

NIELSEN, U.N. et al. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 7, p. 1317–1328, 2010.

ODUM, E. P. & BARRETT, G. W. **Fundamentos de ecologia**. São Paulo: Thomson, 2007. xvi,612p

ODUM, E. P. Trends expected in stressed ecosystems. **BioScience**, v. 35, n. 7, p. 419-422, 1985.

OLIVEIRA, L. F. V. & MARGIS, R. The Source of the River as a Nursery for Microbial Diversity. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 0120608, 2015..

OPAJA, S. V. et al. Determination Of Mining Activity Of River Sediments Of Three Chilean Basins By Particle Induced X-Ray Emission (Pixe). **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 57, n. 4, 2012.

OSONO, T; TATENO, O.; MASUYA, H. Diversity and ubiquity of xylariaceous endophytes in live and dead leaves of temperate forest trees. **Mycoscience**, v. 54, n. 1, p. 54 e 61, 2013.

ØVREÅS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PAGANI, B. B. et al. Plant growth-promoting and phytopathogen-antagonistic properties of bacterial endophytes from potato (*Solanum tuberosum* L.) cropping systems. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 94, n. 5, 2014.

PARAÍBA, L. C. et al. Fator de bioconcentração de poluentes orgânicos de lodos em frutos de laranjeiras. **Revista ecotoxicologia e meio ambiente**, v.16, p.125-134, 2006.

PARROTA, J. A. et. al. Catalyzing native forest regeneration on degraded tropical lands. **Forest Ecology and Management**. v. 99, n. 1-2, p. 1-7, 1997.

PASCUAL, J. O. Cuatro décadas en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*. Discurso leído en el acto de su recepción como académico numerario. Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada, 2003.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microorganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PINHEIRO, J. C. et al., The performance of *Fraxinus angustifolia* as a helper for metal phytoremediation programs and its relation to the endophytic bacterial communities. **Geoderma**, v. 202, p. 171-182, 2013.

POGGIANI, F. et al. Quantificação da deposição de folheda em talhões experimentais de *Pinus taeda*, *Eucalyptus grandis* e *Mimosa scabrella* plantados em uma área degradada pela mineração do xisto betuminoso. **IPEF**, v. 37, p. 21-29, 1987.

PRÁ, D. et al. Toxicidade e Genotoxicidade do Sulfato de Cobre em Planárias de Água Doce e Camundongos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 2, p. 171-175, 2006.

PULFORD, I.D. & WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. **Environment International**, v. 29, p. 529–540, 2003.

QUADROS, P. D. Diversidade e composição de comunidades microbianas de solos construídos e de solos sob diferentes manejos agrícolas. Porto Alegre, 125p. Tese (doutorado) – PPGCS-UFRGS. Rio Grande do Sul, 2013.

QUADROS, P. D. et al. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. **Applied Soil Ecology**, v. 98, p. 195–203, 2016.

RACHID, C. T. C. C. et al. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado Soil under differing sugarcane harvest management systems. **BMC Microbiology**, v.12, n. 1., p. 170, 2012.

RAVAZZOLI, C. A problemática ambiental do carvão em Santa Catarina: sua evolução até os termos de ajustamento de conduta vigente entre os anos de 2005 e 2010. **Geografia em questão**, v. 6, n. 1, 2013.

RAYMOND, A. W. & OKIEIMEN F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. **ISRN Ecology**, v. 2011, 2011.

REDFORD, A. J. et al. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 11, p. 2885–2893, 2010.

REGENSBURGER, B. **Recuperação de áreas degradadas pela mineração de argila através da regularização topográfica, da adição de insumos e serrapilheira, e de atratores da fauna**. 2004. 99p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

REIS A.; ZAMBONIN R. M.; NAKAZONO, E. M. Recuperação de áreas florestais degradadas utilizando a sucessão e as interações planta-animal. Caderno n. 14, São Paulo, 1999.

RENELLA, G. et al. Long-term effects of aided phytostabilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 3, p. 702–712, 2008.

RIBEIRO, A. & MACHADO, S. A. Avaliação Econômica dos Benefícios dos Macronutrientes em Diferentes Povoamentos de Bracatinga. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 4, p. 422-430, 2012.

RODRIGUES, E. R. Controle biológico de *Brachiaria decumbens* stapf em área de reserva legal em processo de recuperação, na região do

pontal do paranapanema, São Paulo, Brasil. 2010. 83p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

RODRIGUES, R. R. & LEITÃO-FILHO, H. F. **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: Edusp/FAPESP. 2000. p. 320-

RODRIGUEZ, R.J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-37, 2006.

RUBIO, J. Aspectos ambientais no setor minero-metalúrgico. In: DA LUZ, A. B.,POSSA, M.V. e DE ALMEIDA, S.L.(eds) **Tratamento de Minérios**, CETEMCNpq- MCT, 1998a. p.537-570,

RUBIO, J. Environmental applications of the flotation process. In: CASTRO, S.H.; VERGARA, F.; SANCHEZ, M. **Effluent Treatment in the Mining Industry**, University of Concepción-Chile, 1998b. p.335-364.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbioly Letter**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

SALTON, J. C. & TOMAZI, M. **Sistema Radicular de Plantas e Qualidade do Solo** Dourados:EMBRAPA, 2014. 6 p. (Comunicado técnico 198).

SANCHEZ, N. B; VIÑALES, A. M; PADRÓN, C. M. Prueba de especies forestales en áreas devastadas por minería a cielo abierto en Holguín. **Centro Agrícola**. n.1 p. 80-83, 2003.

SÁNCHEZ-CHARDI, A. et al. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 1332-1339, 2008.

SANDBERG, D. C.; BATTISTA, L. J.; ARNOLD, A. E. Fungal endophytes of aquatic macrophytes: diverse host-generalists

characterized by tissue preferences and geographic structure. **Microbiology Ecology**, v. 67, n. 4, p. 735-47, 2014.

SANTOS, J. V. et al. Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-14, 2015.

SANTOS, J. V. et al. Soil biological attributes in arsenic-contaminated gold mining sites after revegetation. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 10, p. 1526–1537, 2013.

SATURNO, D. F.; NOVAES, A. G.; LIMA FILHO, A.; DORIGO, O. F.; ANDRADE, D. S. Ocorrência de microrganismos simbióticos fixadores de nitrogênio em solos cultivados e sob floresta. In: **Congresso de Ecologia do Brasil, IX**, 2009, São Lourenço, MG . Anais.... São Lourenço, MG, 2009. p.- 1-4.

SAVIOZZI, A. et al. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. **Biol Fertil Soils**, v. 35, n. 2, p. 96–101, 2002.

SCHOLTYSIK, A. et al. Spatio-temporal dynamics of endophyte diversity in the canopy of European ash (*Fraxinus excelsior*). **Mycological Progress**, v. 12, n. 2, p. 291-304, 2013.

SEGHERS, D. et al. Impact of Agricultural Practices on the *Zea mays* L. Endophytic Community. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1475–1482, 2004.

SELOSSE, M. A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, n. 7, p. 639–64, 2004.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A. S.; POONIA, P. Soil Reclamation of Abandoned Mine Land by Revegetation: a review. **International Journal of Soil, Sediment and Water**, v. 3, n. 2, p.13, 2010.

SILVA, K. J. da. **Introgessão de híbridos transgênicos e convencional em milho crioulo**: efeitos sobre fungos e bactérias endofíticas. 2015. 143 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Florianópolis, 2015.

SILVA, K. J. VIDAL-TORRADO, P.; LAMBAIS, M. R. Bacterial and Archaeal Communities in Bleaches Mottles of Tropical Podzols. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 2, p. 372-382, 2015.

SILVEIRA, R. B.; MELLONI, R.; PEREIRA, E. G. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v. 2, n. 2, p. 21-29, 2004.

Sindicato da Indústria de Extração de Carvão do Estado de Santa Catarina-SIECESC- Meio ambiente. Disponível em: http://www.siecesc.com.br/meio_ambiente/projeto-educacao-ambiental. Acessado em: 03/12/2015.

SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S. S.; SILVA, C. Matéria Orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G. A. et al. **Fundamentos da Matéria orgânica do solo Ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2ed. ver. e atual. Porto Alegre: Metropole, 2008. 654p.

SIQUEIRA, J.O. et al. Microorganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA,, 1994. 142p.

SMALLA, K. et al, Bulk and Rhizosphere soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-dependent enrichment and Seasonal Shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4742-4751, 2001.

SRIVASTAVA, S. C. & SINGH, J. S. Microbial C, N and P in dry tropical forest soils: Effects of alternate land-user and nutrient flux. **Soil biology and Biochemistry**, v. 23, n. 2, p.117-124, 1991.

STAHL, P. D. et al. Topsoil stockpiling versus exposure to traffic: A case study on In situ Uranium wellfields. **Restoration Ecology**, v. 10, n. 1, p. 129-137, 2002.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Soil Plant**, v.49, n. 1, p.1-24, 1999.

SUN, X; GUO, L. D; HYDE, K. D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 85–95, 2011.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. **Biodiversity and Conservation**, v. 20, n. 5, p. 913–928, 2011.

TATE III, R. L. & KLEIN, D.A. **Soil Reclamation Processes: microbiological analyses and applications**. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 1-33.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TÉO, S. J. Concentração e conteúdo de macronutrientes da biomassa de *Mimosa scabrella* Benthams, em diferentes classes de sítio, idade e diâmetro. **Scientia Agraria**, v.11, n. 6, p. 459-467, 2010.

TÉO, S. J. et al. Modelagem de Micronutrientes para *Mimosa scabrella* na Região Metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 59, p. 15-26, 2009.

TER BRAAK, C. J. F. & SMILAUER, P. **CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)**. Ithaca, Microcomputer Power, 2002. 500p.

TOLEDO, R. E. B. et. al. Manejo de *Brachiaria decumbens* e seu reflexo no desenvolvimento de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis** Piracicaba, p. 129-141, 1999.

TORDOFF, G. M.; BAKER, A. J. M.; WILLIS, A. J. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. **Chemosphere**, v. 41,n. 1, p.219-228, 2000.

USEPA Method 3051 A: microwave assisted acid digestion of sediments sludges, soils and oils: revision 1. Technical report. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2007.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass. **Soil biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, 1987.

WEST, E. R. et al. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine **Canadian Journal of Microbiology**.. 56, n. 3, p. 209-216, 2010,

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. J. J., et al (ed.). **Book Protocols: A guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

WORLD COAL INSTITUTE. London WCI 2013. Disponível em: <https://www.worldcoal.org/coal/what-coal> Acessado em: 10/12/2015.

YOUNG, A. Agroforestry for Soil Conservation. CAB International, ICRAF,1989. 318p.

ZHENLI L. et al. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, p. 125–140, 2005.

ZIMMERMAN, N. B. & VITOUSEK, P. M. Fungal endophytes communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. **PNAS**, v. 109, n. 32, p. 13022-13027, 2012.

WORLD ENERGY COUNCIL (WEC) World Energy Resources. World Energy Council. 2013 https://www.worldenergy.org/wp-content/uploads/2013/09/Complete_WER_2013_Survey.pdf. Acessado em 04/01/2016.

