



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

MARCELA ALVES BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA EM SOLOS DE
RESTINGA E DUNAS COM ATIVIDADE DE MINERAÇÃO NO MUNICÍPIO DE
MATARACA, PARAÍBA, BRASIL**

RECIFE
2014

MARCELA ALVES BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA EM SOLOS DE
RESTINGAEDUNAS COM ATIVIDADE DE MINERAÇÃO NO MUNICÍPIO DE
MATARACA, PARAÍBA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração
Micologia básica

Orientadora
Profa. Dra. Elaine Malosso

RECIFE
2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Barbosa, Marcela Alves

Caracterização molecular da microbiota em solos de restinga e dunas com atividade de mineração no Município de Mataraca, Paraíba, Brasil / Recife: O Autor, 2014.

93 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Elaine Malosso

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2014.

Inclui referências e apêndices

1. Fungos do solo 2. Biodiversidade 3. Paraíba I. Malosso, Elaine (orientadora) II. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-039

MARCELA ALVES BARBOSA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA MICROBIOTA EM SOLOS DE RESTINGA E DUNAS COM ATIVIDADE DE MINERAÇÃO NO MUNICÍPIO DE MATARACA, PARAÍBA, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 13/03/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Elaine Malosso – (Orientadora) / Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neiva Tinti de Oliveira – Examinador Interno – Titular / Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Renata Gomes de Souza– Examinador Externo – Titular / Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Gladstone Alves da Silva– Examinador Interno – Suplente/ Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cláudia Elizabete Pereira de Lima– Examinador Externo – Suplente / Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, Edvaldo e Maria José,
E ao meu irmão, Cristiano, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me carregou quando me faltaram forças e pela sua presença constante em minha vida;

Ao CNPQ pela concessão da bolsa e à CAPES pelo financiamento do projeto e à UFPE pelo conhecimento e formação;

Ao Departamento de Micologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos;

À Embrapa pela realização das análises de Ergosterol;

À Profa. Dra. Elaine Malosso, pela orientação, empenho, ensinamentos, paciência, apoio e dedicação à ciência;

A todos os professores do Departamento de Micologia e do PPGBF;

À equipe do Laboratório de Micorrizas pela cumplicidade na realização dos trabalhos, e pela amizade;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular pelos agradáveis momentos de convivência e pela troca de conhecimentos;

À profa. Patricia Vieira Tiago, pela atenção e ajuda com o programa Quantity One;

Ao prof. Bruno Severo, pelo apoio;

Ao prof. Gladstone Alves da Silva, pela gentileza e atenção;

À profa. Neiva Tinti de Oliveira, pela disponibilidade em ajudar e ser sempre prestativa;

À Dra. Cláudia Elisabete Pereira, pelo apoio e conselhos;

À Dra. Mariele Porto Carneiro Leão, pelo apoio e disponibilidade em ajudar com as análises das matrizes geradas pelo programa NTSYS;

À Dra. Renata Gomes de Souza, pela gentileza e colaboração nas compostas do solo;

À Dra. Cíntia Renata Rocha, pela ajuda e atenção;

À Dra. Indra Escobar, pela ajuda da extração do Ergosterol;

À Dra. Danielle Karla Alves da Silva, pela ajuda e por ceder às imagens das áreas de coleta.

À turma do mestrado em Biologia de Fungos pelo companheirismo;

Às amigas, Elaiza Rocha, Maria José Lucena, Fabíola Gomes, Patrícia Barbosa e Diana Duarte, que me acompanharam ao longo dessa caminhada;

Ao amigo Roger Melo, pelos conselhos, incentivo e carinho;

Aos amigos, Renan Nascimento, Helena Oliveira e Gianne Rizzuto, pelo apoio e incentivo;

Às amigas e companheiras do Laboratório de Micorrizas, Jessica Costa, Daniele Magna, Iolanda Ramalho, Mayra Silva, Marina Araújo e Heloísa Medeiros pelo suporte nas horas difíceis;

Agradeço as minhas amigas Cíntia Lira, Maria da Conceição Souza e Wanessa Dornelas, por me acompanharem desde a adolescência;

Aos meus pais, Maria José e Edvaldo, pela importante base familiar, amor, exemplo e dedicação ao longo desses anos;

Ao meu irmão, Cristiano, e aos meus tios, Luzinete e Flávio, pelo conforto nos momentos de incerteza;

A toda minha família e a todos meus amigos que de alguma forma contribuíram para realização desta pesquisa.

“Confia no Senhor de todo o teu coração e não te estribes no teu próprio entendimento. Reconhece-o em todos os teus caminhos, e ele endireitará as tuas veredas.”

Provérbios 3:5-

RESUMO

A exploração mineral é considerada como uma das atividades que mais degradam o meio ambiente, considerando os diversos impactos que gera. Técnicas moleculares, que têm grande potencial para estudos de diversidade de fungos, podem ser utilizadas para monitorar impactos ambientais e recuperação de áreas degradadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar molecularmente as comunidades microbianas do solo de áreas nativa e mineradas e suas implicações na dinâmica da regeneração da vegetação de dunas litorâneas. Foram analisados os solos no período de estiagem e de chuva dos anos de 2009, 2010, 2011 e 2012 em seis áreas: duas matas de restinga controle e uma restinga arbustiva (matas naturais) e três dunas revegetadas (em 1989, 2001 e 2009). Foram feitas análises pela técnica de DGGE das comunidades de bactérias e fungos e pelo método de quantificação do ergosterol foi analisada a biomassa de fungos. Observou-se que a concentração de ergosterol no período de chuva foi maior em relação ao período de estiagem em todas as áreas de coleta. A comunidade de bactérias não apresentou diferenças significativas na diversidade, porém, a comunidade de fungos apresentou mudanças, com incremento do número de bandas 84 para 268 ao longo do estudo. O uso do solo de cobertura nas áreas mineradas proporciona boas condições para a recuperação da microbiota, porém, isso ocorre em função do tempo de revegetação. Conforme evidenciam as análises da biomassa de fungos e da estrutura molecular das comunidades microbianas evidenciaram isso.

Palavras chaves: Biodiversidade. Análise molecular. Solo de mineração. Biomassa de fungos.

ABSTRACT

Mineral exploitation is regarded as one of the activities that mostly degrade the environment, considering the different impacts it generates. Molecular techniques, which have great potential for studies of fungal diversity, can be used to monitor environmental impacts and reclamation. This study aimed to molecularly assess soil microbial communities of cover soil of native and mined areas and their implications on the dynamics of regeneration of the vegetation of coastal dunes. Soils were analyzed during the dry and rainy seasons of the years 2009, 2010, 2011 and 2012 in six areas: two forests and one shrub *Restinga* (natural forests) and three revegetated dunes (in 1989, 2001 and 2009). DGGE analyzes of the bacterial and fungal communities were performed and the quantification of ergosterol was carried out to access fungal biomass. It was observed that the concentration of ergosterol in the rainy season was higher than in the dry season in all sampling areas. The bacterial community showed no significant differences in diversity, however, the fungal community showed significant changes, with the increase of the number of DGGE bands from 84 to 268 throughout the study. The use of the cover soil in mined areas promotes good conditions for the recovery of soil microbial communities; however, recovery happens over time along with revegetation. Analyzes of the fungal biomass and the molecular structure of microbial communities showed that.

Keywords: Biodiversity. Molecular analysis. Mining the ground. Fungal biomass.

FIGURA 1 - MAPA DO ESTADO DA PARAÍBA COM DESTAQUE PARA O MUNICÍPIO DE MATARACA.....	32
FIGURA 2 - GRÁFICO DE PRECIPITAÇÃO DE MATARACA-PB. FONTE: AESA.....	33
FIGURA 3 - ASPECTOS DA VEGETAÇÃO DAS ÁREAS DE COLETA NO MUNICÍPIO DE MATARACA, PB. FOTOS DE DANIELLE KARLA ALVES DA SILVA TIRADAS EM 2011.....	35
FIGURA 4 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 18S DO RDNA DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO SECO DE 2009 NAS ÁREAS REVEGETADAS EM 1989 E 2001, E NA ÁREA DE 2009 ANTES DO INÍCIO DA MINERAÇÃO. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.95.....	44
FIGURA 5 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 18S DO RDNA DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2009 NAS ÁREAS REVEGETADAS EM 1989, 2001 E 2009. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.80.....	46
FIGURA 6 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 18S DO RDNA DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2009 NAS ÁREAS DE MATA CONTROLE E RESTINGA ARBUSTIVA. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.98.....	48
FIGURA 7 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 18S DO RDNA DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO SECO DE 2010 NAS ÁREAS DE MATA CONTROLE I E II, RESTINGA ARBUSTIVA, REVEGETADA 1989, 2001 E 2009. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.83.....	50
FIGURA 8 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 18S DO RDNA DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2010 NAS ÁREAS DE MATA CONTROLE I E II, RESTINGA ARBUSTIVA, REVEGETADA 1989, 2001 E 2009. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.93.....	52
FIGURA 9 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 18S DO	

RDNA DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO SECO DE 2011 NAS ÁREAS DE MATA CONTROLE I E II, RESTINGA ARBUSTIVA, REVEGETADA 1989, 2001 E 2009. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.88.....54

FIGURA 10 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 18S DO RDNA DA COMUNIDADE DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2011 NAS ÁREAS DE MATA CONTROLE I E II, RESTINGA ARBUSTIVA, REVEGETADA 1989, 2001 E 2009. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.88.....56

FIGURA 11 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 16S DO RDNA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO SECO DE 2009 NAS ÁREAS REVEGETADAS EM 1989 E 2001, E NA ÁREA DE 2009 ANTES DO INÍCIO DA MINERAÇÃO. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.91.....59

FIGURA 12 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 16S DO RDNA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2009 NAS ÁREAS REVEGETADAS EM 1989 E 2001. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.97.....61

FIGURA 13 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 16S DO RDNA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2009 NA ÁREA NATURAL DE MATA CONTROLE I. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 1.0.....62

FIGURA 14 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 16S DO RDNA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2010 NAS ÁREAS: MCII (MATA CONTROLE II), MCI (MATA CONTROLE I), RA (RESTINGA ARBUSTIVA), REVEGETADA 1989, 2001 E 2009. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.93.....64

FIGURA 15 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADE GENÉTICA BASEADO NOS PERFIS DE FRAGMENTOS DE DNA DE AMPLIFICAÇÃO DE PCR-DGGE DA REGIÃO 16S DO RDNA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE AMOSTRAS DE SOLO COLETADAS NO PERÍODO CHUVOSO DE 2011 NAS ÁREAS: MCII (MATA CONTROLE II), MCI (MATA CONTROLE I), RA (RESTINGA ARBUSTIVA),

REVEGETADA 1989, 2001 E 2009. OS NÚMEROS AO LADO DAS ÁREAS INDICAM AS SUBÁREAS. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO COFENÉTICA (R) 0.89.....66

FIGURA 16 - CURVA PADRÃO OBTIDA A PARTIR DO ERGOSTEROL.....67

FIGURA 17 - CONCENTRAÇÃO DO ERGOSTEROL NO SOLO DAS ÁREAS REVEGETADAS EM 1989, 2001 E 2009, MATA CONTROLE I E II E RESTINGA ARBUSTIVA, NOS ANOS DE COLETA 2010, 2011 E 2012, RESPECTIVAMENTE. DR: DUNA REVEGETADA E N: ÁREA NATURAL.....68

FIGURA 18- ANÁLISE DE VARIÂNCIA E INTERAÇÕES ENTRE FATORES PARA DADOS DE ERGOSTEROL DE SEIS ÁREAS (NATURAIS E REVEGETADAS) NO MUNICÍPIO DE MATARACA, PB, EM TRÊS ANOS DE COLETAS CONSECUTIVAS, NOS PERÍODOS DE SECA E CHUVA.....71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANOS DE COLETAS E NÚMERO DE ÁREAS NOS PERÍODOS SECO E CHUVOSO.....	34
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO SOLO DA COLETA DE 2010 EM ÁREAS DE MATA CONTROLE I E II, RESTINGA ARBUSTIVA (RA) E ÁREAS REVEGETADAS EM 1989, 2001 E 2009.....	35
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO SOLO DA COLETA DE 2011 EM ÁREAS DE MATA CONTROLE I E II, RESTINGA ARBUSTIVA (RA) E ÁREAS REVEGETADAS EM 1989, 2001 E 2009.....	36
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DO SOLO DA COLETA DE 2012 EM ÁREAS DE MATA CONTROLE I E II, RESTINGA ARBUSTIVA (RA) E ÁREAS REVEGETADAS EM 1989, 2001 E 2009.....	36
TABELA 5 - PROTOCOLO PARA AMPLIFICAÇÃO DO RDNA SSU DE FUNGOS POR PCR UTILIZANDO OS INICIADORES FR1 _(GC) /FF390.....	39
TABELA 6 - PROTOCOLO PARA AMPLIFICAÇÃO DO RDNA SSU DE BACTÉRIAS POR PCR UTILIZANDO OS INICIADORES AF1/530R _(GC)	39
TABELA 7 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO SECO DE 2009.....	43
TABELA 8 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2009.....	45
TABELA 9 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2009.....	47
TABELA 10 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO SECO DE 2010.....	49
TABELA 11 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2010.....	51
TABELA 12 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO SECO DE 2011.....	53
TABELA 13 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2011.....	55
TABELA 14 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO SECO DE 2009.....	58

TABELA 15 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2009.....	60
TABELA 16 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2009.....	62
TABELA 17 - NÚMERO DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2010.....	63
TABELA 18 - NÚMERO DE PERFIS DE FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DO PERÍODO CHUVOSO DE 2011.....	65
TABELA 19 - VALORES DE <i>P</i> DAS COMPARAÇÕES DO TEOR DE ERGOSTEROL NO SOLO ENTRE OS PERÍODOS SECO E CHUVOSO DAS COLETAS DE 2010 PARA DUNAS NATURAIS E REVEGETADAS.....	69
TABELA 20 - VALORES DE <i>P</i> DAS COMPARAÇÕES DO TEOR DE ERGOSTEROL NO SOLO ENTRE OS PERÍODOS SECO E CHUVOSO DAS COLETAS DE 2011 PARA DUNAS NATURAIS E REVEGETADAS.....	70
TABELA 21 - VALORES DE <i>P</i> DAS COMPARAÇÕES DO TEOR DE ERGOSTEROL NO SOLO ENTRE OS PERÍODOS SECO E CHUVOSO DAS COLETAS DE 2012 PARA DUNAS NATURAIS E REVEGETADAS.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DGGE	- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
PLFA	- Phospholipid Fatty Acid
FMA	- Fungos Micorrízicos Arbusculares
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
GC	- Guanina-Citosina
IGS	- Região não codificadora intergênica
ITS	- Espaço Interno Transcrito
PRAD	- Plano de Recuperação de Áreas Degradadas
MMA	- Ministério do Meio Ambiente
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MIC	- Millennium Inorganic Chemicals
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	- Ácido desoxirribonucléico ribossomal
RFLP	- Restriction Fragment Length Polimorphism
rRNA	- Ácido ribonucléico ribossomal
LSU	- Subunidade maior do ribossomo
SSU	- Subunidade menor do ribossomo
TGGE	- Eletroforese em gel com gradiente de temperatura
T-RFLP	- Polimorfismo de comprimento de fragmento terminal de restrição
ARISA	- Análise Ribosomal do Espaço Intergênico
CDGE	- Eletroforese em gel desnaturante constante
GLB	- Gel Loading Buffer
UTO	- Unidade Taxonômica Operacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 A IMPORTÂNCIA DO SOLO PARA O ECOSISTEMA TERRESTRE.....	18
2.2 A DEGRADAÇÃO E POSSÍVEL RECUPERAÇÃO DO SOLO.....	19
2.2.1 Impactos ocasionados pela mineração no solo.....	20
2.3 DIVERSIDADE E BIOMASSA DE MICRO-ORGANISMOS NO SOLO.....	23
2.4 ANÁLISE DA BIOMASSA DE FUNGOS USANDO ERGOSTEROL COMO BIOMARCADOR.....	26
2.5 AS FERRAMENTAS MOLECULARES EM ESTUDOS DE BIODIVERSIDADE...	27
2.5.1 A reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR).....	28
2.5.2 Eletroforese.....	28
2.5.3 Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE).....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 LOCAL DE ESTUDO.....	32
3.2 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	33
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA METAGENÔMICO.....	37
3.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	37
3.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DO SOLO.....	38
3.6 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS rDNA 18S DE FUNGOS E 16S DE BACTÉRIAS.....	38
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE.....	39
3.7.1 DGGE de fungos.....	39
3.7.2 DGGE de bactérias.....	39
3.7.3 Eletroforese desnaturante.....	40
3.7.4 Análise das imagens dos géis de DGGE.....	40
3.8 EXTRAÇÃO DE ERGOSTEROL.....	41
3.8.1 Quantificação cromatográfica do ergosterol.....	41
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 ANÁLISE DA COMUNIDADE DE FUNGOS NO SOLO POR DGGE.....	43
4.2 ANÁLISE DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS NO SOLO POR DGGE.....	57
4.3 ANÁLISE, POR ERGOSTEROL, DA BIOMASSA DA COMUNIDADE DE FUNGOS NO SOLO.....	67
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICE A - PERFIL DOS FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DE FUNGOS DA REGIÃO DO rDNA SSU.....	92
APÊNDICE B - PERFIL DOS FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DE BACTÉRIAS DA REGIÃO DO rDNA SSU.....	93

1 INTRODUÇÃO

O solo é considerado um dos principais habitats para as populações de micro-organismos e, dentre estes, encontram-se os fungos, que estão representados na maioria dos tipos de solo. Os fungos atuam nos ciclos biogeoquímicos de vários nutrientes no solo, a partir da decomposição da matéria orgânica, disponibilizando nutrientes retidos nos coloides do solo e fazendo a fixação biológica de nutrientes (KENNEDY, 1999; RANJARD; POLLY; NAZARET, 2000; STERFLINGER, 2000) Existe uma variedade de tipos de solos e esses são o produto das variações determinadas pelo clima, pela geologia e pelo histórico da vegetação. Os efeitos das perturbações e estresses ambientais podem afetar os micro-organismos presentes no solo, que estão sujeitos às mudanças nas propriedades físicas e químicas deste habitat (SILVA; ESPOSITO, 2010).

A exploração mineral é vista como uma das atividades que mais degradam o meio ambiente, considerando os diversos impactos que gera como degradação visual da paisagem, do solo, do relevo e das populações que habitam o entorno dos projetos minerários. O solo é um dos elementos naturais que mais é degradado pela mineração em curto período de tempo, em função de suas peculiaridades (COOKE; JOHNSON, 2002).

Em regiões litorâneas, o estabelecimento vegetal enfrenta problemas devido à ocorrência de solos extremamente arenosos, com alta salinidade, baixo teor de matéria orgânica, altas taxas de infiltração e conseqüente baixa retenção de umidade, com superaquecimento das camadas superficiais expostas à insolação (JOLY, 1970; KUHLMANN, 1977).

A comunidade de micro-organismos, mais especificamente de fungos que habitam os solos de restinga, permanece, em grande parte, desconhecida e inexplorada devido à dificuldade de replicar, em meios de culturas laboratoriais, o crescimento e desenvolvimento dos micro-organismos nestes solos. Além disso, muitas vezes o método de identificação fenotípico resulta em falhas porque os caracteres são similares e sua diferenciação requer bastante experiência por parte do pesquisador (ANDERSON; INGRAM, 1993; BRODIE; EDWARDS; CLIPSON, 2003; HOUSTON; VISSER; LAUTERNISCHLAGER, 1998).

As técnicas moleculares baseadas no DNA de amostras ambientais se tornaram de grande potencial para estudos de identificação e levantamento da diversidade de fungos sem os problemas de variações nos caracteres morfológicos que dificultam a taxonomia tradicional (O'BRIEN et al., 2005).

Várias técnicas moleculares permitem a análise de comunidades de fungos de solo, dentre as quais, uma das mais importantes é a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Desenvolvida para a pesquisa médica, logo depois foi introduzida no estudo da ecologia microbiana (ROSADO; DUARTE, 2002). É considerada uma das técnicas de fingerprinting mais utilizadas para análises de comunidades de fungos e bactérias do solo (GAMS, 2007; MUYZER; SMALLA, 1998).

A DGGE gera perfis moleculares que possibilitam a análise de várias amostras ambientais simultaneamente, sendo bastante útil para o monitoramento e compreensão de variações temporais e espaciais de comunidades microbianas. Pela técnica de DGGE, os fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas de sequências diferentes, podem ser separados (MUYZER; SMALLA, 1998). A análise por PCR e DGGE, aplicada a regiões polimórficas do genoma, pode fornecer impressão digital molecular detalhada do ambiente ou amostra estudada (DE SOUZA et al., 2004; OPIK et al., 2003).

Além disso, algumas moléculas específicas dos micro-organismos, consideradas biomarcadoras, podem ser usadas para complementar as informações dos perfis genéticos. Entre elas, destaca-se o ergosterol que é considerado um bom indicador de biomassa de fungos (HIRSCH et al., 2010).

Este trabalho foi conduzido para testar a hipótese de que o solo de cobertura de uma duna a ser minerada, quando usado para reconstrução de uma duna onde o trabalho foi encerrado, permite o restabelecimento da microbiota do solo em menor tempo e acelera o processo de reflorestamento.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar molecularmente as comunidades microbianas do solo de cobertura de áreas nativa e mineradas e suas implicações na dinâmica da regeneração da vegetação em dunas litorâneas após atividade mineradora.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A IMPORTÂNCIA DO SOLO PARA O ECOSISTEMA TERRESTRE

O solo é a base dos sistemas de produção agrícola e a sustentabilidade das produções são dependentes da manutenção desse recurso. As atividades de cultivo de plantas e a criação de animais pelo homem, para a produção de alimentos, energia e fibras, em substituição da extração do que a natureza oferecia, são recentes. Troeh; Hobbs; Donahue (1980) fazem referência à antiga vila de Jarmo, no norte do Iraque, que foi ocupada a cerca de 11.000 anos antes de Cristo e é considerada como o mais antigo local conhecido onde agricultura foi praticada.

Na metade do século XIX, o trabalho desenvolvido pelo geólogo russo Dokuchaev proporcionou o reconhecimento dos solos como corpos naturais organizados, com características morfológicas, físicas, químicas e mineralógicas relacionadas aos processos e fatores que deram origem aos mesmos (LOPES; GUILHERME, 2007). Sendo assim, a origem do solo se dá a partir da decomposição de material rochoso, processo em que, com o decorrer do tempo, forma a crosta terrestre. Esta camada natural e superficial é constituída de matéria orgânica e de minerais desintegrados e decompostos pela ação do intemperismo físico, químico e biológico, onde as plantas aderem suas raízes e retiram ar, água e todos os elementos químicos para o seu desenvolvimento (VIEIRA; CASTILHOS; CASTILHOS, 2011).

O crescimento das raízes de plantas e as atividades de escavação ou tocas de animais contribuem para a quebra mecânica do solo. Além disso, o dióxido de carbono e outros gases dissolvidos na água da chamada chuva ácida também podem causar quebra das rochas calcáreas pela mudança do pH e contribuir para o processo de formação do solo (OADES; WATERS, 1991; VIEIRA; CASTILHOS; CASTILHOS, 2011).

O solo é um meio insubstituível para a agricultura, além de ser um componente essencial de processos e ciclos ecológicos, no qual ocorrem processos e ciclos de transformações físicas, biológicas e químicas (MILLER, 1995). É também um depósito para acomodar resíduos e um melhorador da qualidade da água (SCHIEDECK; GONÇALVES; SCHWENGBER, 2006).

Este recurso natural é um ambiente que apresenta uma grande diversidade de interações biológicas, incluindo a competição, a predação, o parasitismo, o comensalismo e o mutualismo. As interações biológicas têm um papel fundamental no funcionamento do solo,

ou seja, na sua capacidade de sustentar a vida tanto das plantas quanto dos animais e dos micro-organismos que habitam o solo (KIBBLEWHITE; RITZ; SWIFT, 2008).

Além disso, o solo é capaz de estocar elementos químicos como o carbono e outros componentes essenciais para a composição da matéria orgânica (PAVINATO; ROSOLEM, 2008). A matéria orgânica do solo desempenha funções importantes como fortalecimento da estabilidade dos agregados, aumento da retenção de água, quelação de metais pesados e ajuda a equilibrar o pH (BOT; BENITES, 2005).

Embora o solo seja de grande valor, ainda é considerado um dos habitats pouco estudados do planeta e só recentemente iniciou-se a compreensão da sua biodiversidade como um fator primordial na regulação e funcionamento dos ecossistemas (COPLEY, 2000).

2.2. A DEGRADAÇÃO E POSSÍVEL RECUPERAÇÃO DO SOLO

A definição de qualidade do solo está estreitamente ligada à degradação, pois quando ocorre a perda de qualidade do solo devido à diminuição de matéria orgânica, nutrientes, populações microbianas e suas atividades e pH, há aumento da compactação e descaracterização da vegetação (MELLONI; MELLONI; ALVARENGA, 2008).

A degradação dos solos iniciou com a derrubada das matas nas encostas que circundavam os vales, para expandir o cultivo. Essa prática causava erosão acelerada, sedimentação e assoreamento de rios, lagos e dos próprios vales. Com isso, muitas áreas da Ásia, América do Sul e Norte e África foram afetadas, e muitas civilizações deixaram de existir (KLAMT; REINERT, 2003).

Dentre os solos bastante ameaçados encontram-se as restingas, que se estendem por cerca de 5.000 km do litoral brasileiro e têm sido muito degradados, principalmente, pela ação antrópica. Esses ecossistemas litorâneos têm sido descaracterizados, ou mesmo totalmente dizimados, não apenas pela facilidade de acesso, mas também pela sua beleza natural que atrai o turismo (FREIRE, 1990; SCARANO, 2002).

As dificuldades encontradas nas regiões litorâneas para reabilitação de áreas degradadas são consequências da ocorrência de solos muito arenosos, com alta salinidade, baixo teor de matéria orgânica, altas taxas de infiltração e consequente baixa retenção de umidade, com superaquecimento das camadas superficiais expostas à insolação (ABUA; EDET, 2007).

Várias práticas podem promover condições mais propícias para o restabelecimento da vegetação como, por exemplo, a adição de solo da camada superficial proveniente do

decapeamento pré-exploratório da área. Essa prática agrega também o valor representado pelo banco de sementes, pela matéria orgânica e pelos nutrientes do solo superficial que contém micro-organismos simbióticos e degradadores de matéria orgânica. Além dessa, outras práticas importantes são: a incorporação de matéria orgânica, que pode facilitar processos como agregação do solo e ciclagem de nitrogênio, a fertilização, pois acelera o estabelecimento vegetal e a irrigação que é utilizada para abreviar o processo (BARTH, 1989; CUNHA et al., 2003; IBAMA, 1990).

Vale ressaltar também, como recuperação de áreas degradadas, a associação micorrízica arbuscular aliada ao papel que as comunidades microbianas do solo desempenham quanto à melhoria das condições edáficas e crescimento de plantas (BÉCARD et al. 2004; BEVER, 2003). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) têm demonstrado grande capacidade de se adaptar quando são submetidos às condições adversas, sendo encontrados em locais sujeitos à degradação ambiental extrema. Os principais benefícios para a vegetação, oriundos da associação mutualista são: maior sobrevivência, aumento da taxa de crescimento, alocação de biomassa, biocontrole de doenças e pragas e diminuição do estresse ocasionado pelo transplante (CARNEIRO et al., 2010; CAVALCANTE et al., 2008; MAIA; SILVEIRA; CAVALCANTE, 2005).

2.2.1. Impactos ocasionados pela mineração no solo

Dentre as atividades antrópicas que interferem no meio ambiente, a mineração é uma das que causam maior impacto ambiental (KUMAH, 2006), devido às diversas alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (BARROS et al., 2013). A recuperação dessas áreas é apenas uma tentativa de remediar o dano. Porém, nem sempre é possível o retorno de um ecossistema ao seu estado original devido ao grau de depauperação a que foi submetido. Contudo, a recuperação de áreas degradadas tem sido motivo de esforços por parte das empresas do setor de mineração e dos órgãos ambientais, universidades e institutos de pesquisas, que buscam procedimentos eficazes para restabelecer os processos essenciais do solo e dos ecossistemas alterados (CARNEIRO et al., 2008).

O processo de mineração tem como consequência a degradação de uma área. No entanto, a intensidade da degradação depende do volume, do tipo de mineração e dos rejeitos produzidos. No processo de mineração, o minério bruto não se encontra suficientemente puro ou adequado para que seja submetido a processos metalúrgicos ou para a utilização industrial (KLEPKA et al., 2005). Portanto, após a lavra, os minérios são submetidos a um tratamento,

ou beneficiamento, que os torna aptos à utilização. O tratamento divide o minério bruto em duas frações: concentrado e rejeito. Este último é a fração constituída quase que exclusivamente pelos minerais presentes nas jazidas, e que, devido a aspectos econômicos, tecnológicos ou composicionais, não são utilizados (MUNIZ; OLIVEIRA-FILHO, 2006).

Quando o trabalho em uma mina é encerrado são acarretados diversos impactos no solo que acabam limitando a disponibilidade de recursos (água, nutrientes, energia) ou criam diversos tipos de estresses (emissões de poluentes, por exemplo). Sendo assim, há a necessidade de fazer previsões para que áreas mineradas se tornem autossustentáveis depois que uma empresa encerra suas atividades (SOUZA, 2002).

Um plano de recuperação de áreas degradadas deve ser incluído no planejamento de fechamento de mina e tem que apresentar soluções para garantir novas formas de uso do solo da área minerada depois de encerradas as atividades de mineração. Pelo fato desse processo de recuperação de áreas degradadas ser muito lento, é necessário começar desde a fase de planejamento do projeto minerário e finalizar apenas muito tempo após o término da exploração da lavra, quando as relações entre os componentes bióticos e o ambiente apresentarem condições de equilíbrio e auto sustentabilidade (GOMES; LIMA; FLÔRES, 2010).

No Brasil, a mineração de metais de interesse comercial tem promovido a liberação de rejeitos que se constituem uma das principais formas de contaminação do solo e da água por metais pesados. O aumento nas concentrações desses rejeitos no solo próximos às zonas de mineração pode estar relacionado com processos químicos e biológicos que controlam a solubilidade, a disponibilidade biológica e a mobilidade desses metais (GUILHERME et al., 2005).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA) o Brasil é um dos grandes produtores minerais no mundo ocidental, mas isso não quer dizer que esteja seguindo adequadamente a legislação ambiental pertinente. Sendo a mineração um processo de grande importância devido aos recursos minerais estarem presentes em quase todas as atividades humanas, é ao mesmo tempo um desafio para a implementação do desenvolvimento sustentável, uma vez que retiram da natureza recursos naturais que não se renovam (SCHUELER; KUEMMERLE; SCHRÖDER, 2011).

Portanto, a partir de 1989, no Brasil, todas as empresas de mineração foram obrigadas a apresentar ao órgão ambiental um Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD). Este documento preconiza a adoção de procedimentos para estabelecer ou restabelecer a cobertura vegetal nas áreas degradadas (ALMEIDA; SÁNCHEZ, 2005).

Pode ser citada, como exemplo de pesquisas sobre a recuperação em áreas litorâneas degradadas, a revegetação em áreas de dunas na região Nordeste do Brasil que são exploradas para fins de extração de minerais titaníferos, como ilmenita, rutilo e zirconita. A recuperação nessas áreas degradadas pode atuar na melhoria da estruturação do solo, contribuindo para redução dos riscos de erosão e desertificação (OLIVEIRA et al., 2009).

O programa de recuperação do meio ambiente desenvolvido pela mineradora Millennium Inorganic Chemicals (MIC) é reconhecido nacionalmente, inclusive pelo IBAMA que o considera modelo para recomposição de dunas. A MIC, com a implantação do plano de recuperação das áreas degradadas, se encarrega de reconstituir as características ambientais, recompondo a fauna e flora local. Do total de mudas nativas replantadas nas áreas mineradas, 80 por cento são produzidos pela comunidade local em um programa em que a empresa qualifica o pessoal, fornece os insumos e compra as mudas, gerando renda para a população rural circunvizinha (CRISTAL-MINA DA PARAÍBA, 2009). As pesquisas que visam a recuperação e estabilização das dunas de rejeito desta atividade foram iniciadas em 1987, tendo como suporte técnico a Universidade Federal de Lavras. A partir disso, tem sido evidenciado a avanço do processo da sucessão ecológica, com conseqüente complexação estrutural da vegetação e aumento da diversidade vegetal (CUNHA et al. 2003).

Outros estudos que visam a recuperação de dunas de rejeito da atividade mineradora têm sido realizados desde 1988. Foi proposta a utilização de plantio intercalado de propágulos de quatro espécies de herbáceas, com a colocação de uma camada de solo superficial e serapilheira de mata de dunas naturais que ainda seriam mineradas (CARVALHO; OLIVEIRA-FILHO, 1993). Além disso, os processos de revegetação das dunas de rejeito em Mataraca continuaram sendo realizadas com o recapeamento associado ao plantio de espécies nativas e exóticas que suportam as adversidades ambientais como déficit hídrico e os fortes e constantes ventos, além de incorporação de matéria orgânica ao solo (CUNHA et al., 2003; SANTOS et al., 2000).

O método da mineradora MIC para a revegetação do rejeito da mineração mostra evidências de que em áreas mais antigas, que foram reflorestadas, a vegetação é semelhante à das áreas naturais menos impactadas e mais estáveis (CARVALHO; OLIVEIRA-FILHO, 1993; OLIVEIRA-FILHO; CARVALHO, 1993). Porém, o sucesso da reabilitação está baseado na vegetação analisada, incluindo o acúmulo da biomassa, e na ciclagem dos nutrientes. A cobertura vegetal é o principal componente na formação do solo e desempenha efeitos químicos, físicos e biológicos, que contribuem para o aumento dos níveis de nutrientes (GOMES et al., 2004).

As comunidades de micro-organismos do solo, e os processos bioquímicos mediados por esses micro-organismos, são também fundamentais e são indicadores potencialmente sensíveis às mudanças na qualidade do solo e indispensáveis ao monitoramento do processo de recuperação ambiental de áreas degradadas pela mineração (SOUZA; SILVA, 1996).

Desta forma, a busca por métodos para a recuperação da área para o uso após a mineração, com o retorno da vegetação nativa, é fundamental para melhoria da qualidade ambiental e garantia da qualidade de vida (DOMINGUES; BOSON; ALÍPAZ, 2006).

2.3. DIVERSIDADE E BIOMASSA DE MICRO-ORGANISMOS NO SOLO

Entre as diversas comunidades que habitam o solo encontram-se os fungos e bactérias. Esses micro-organismos constituem uma elevada porcentagem da biomassa viva do solo, além de manterem a produção, função e saúde dos ecossistemas. A biomassa microbiana no solo controla a decomposição e o acúmulo de matéria orgânica e as transformações envolvendo os nutrientes minerais (GIL-SOTRES et al., 2005; RÖMBKE et al., 2005).

Devido à sua importância no ecossistema terrestre, os micro-organismos são utilizados, normalmente, como indicadores na avaliação da qualidade do solo por sua capacidade de responder rapidamente às mudanças neste ambiente (PEÑA et al., 2005). Os micro-organismos tendem a responder a alterações de estresse ambiental, i.e. liberação de contaminantes, enzimas ou toxinas, desenvolvendo espécies com capacidades favoráveis à sobrevivência nas novas condições ambientais (RITZ et al., 2009).

Grande parte dos sistemas naturais é limitada por nutrientes fazendo com que os micro-organismos tenham crescimento lento ou mesmo que fiquem em estado de latência (LOUREIRO; AQUINO; ZONTA, 2007). A qualidade da matéria orgânica também é importante para estimular a biomassa microbiana e adições de resíduos de alta qualidade podem aumentar a relação C-microbiano com C-orgânico nos solos (VIEIRA; CASTILHOS; CASTILHOS, 2011). O C e N presentes na cobertura vegetal morta e nos compostos derivados da cobertura vegetal morta são, de um modo geral, aproveitados rapidamente pela biomassa microbiana (AQUINO; OLIVEIRA; LOUREIRO, 2005; BALOTA et al., 1998). Consequentemente, fatores que alteram os teores de matéria orgânica do solo normalmente provocam também alterações na biomassa microbiana (ONTL; SCHULTE, 2012). Isso é notório quando resíduos de plantas são adicionados ao solo, ou quando ocorre um decréscimo no teor de matéria orgânica (AQUINO; OLIVEIRA; LOUREIRO, 2005).

A biomassa da população e a estrutura da microbiota são comumente sensíveis a alterações que possam ocorrer no solo em função de atividades antropogênicas, erosão e contaminação (WINDING; HUND-RINKE; RUTGERS, 2005). Diversos parâmetros podem ser utilizados para quantificar a biomassa, a atividade e diversidade microbiana e, dessa maneira, avaliar o impacto que determinada alteração ambiental possa promover na comunidade. Sendo a maior parte da biomassa no solo de origem microbiana, este é um parâmetro importante para se avaliar. Vários métodos têm sido usados para quantificar a biomassa microbiana como: a contagem direta de micro-organismos ou de colônias, o processo de fumigação por clorofórmio ou o método de medição da respiração induzida por adição de um substrato de fácil degradação, como a medição do conteúdo em carbono de uma amostra de solo, por exemplo (ARAÚJO; MONTEIRO; CARVALHO, 2007; RITZ et al., 2009; SCHLOTTER; DILLY; MUNCH, 2003; YAN; YANG; CAMPBELL, 2003).

Apesar das bactérias existirem no solo em um grande número, elas compõem uma menor biomassa, devido ao seu pequeno tamanho, quando comparadas com os fungos. No entanto, quando ocorrem perturbações no solo, as bactérias e protozoários são mais resistentes que a comunidade de fungos (HOORMAN; ISLAM, 2010).

As bactérias são de grande importância em solos sendo que grande parte delas retiram o carbono e a energia diretamente da matéria orgânica. Lewinshn e Prado (2002) estimaram que no Brasil existe um número entre 300 a 450 espécies de bactérias descritas e conhecidas. O número de espécies de bactérias descritas no mundo, de acordo com os mesmos autores, era cerca de 4200 espécies. Esses dados mostram a necessidade de mais estudos e pesquisas sobre a diversidade bacteriana, demandando cada vez mais métodos rápidos de análises para a diversidade microbiana. No entanto, várias técnicas de classificação de micro-organismos baseadas nas sequências de nucleotídeos de rRNA mostram que o número de espécies microbianas descritas ainda é baixo.

Os fungos ocorrem em número menor na população em relação às bactérias, mas eles dominam a biomassa do solo quando o solo não é perturbado. Dentre as formas de se quantificar a biomassa dos fungos do solo, a quantificação do ergosterol tem sido relatada como uma forma que dá resultados confiáveis (ANDERSON; DAVIDSON; LITTLEJOHN, 1994). O ergosterol é um componente das membranas das células de fungos que pode fornecer uma estimativa da biomassa no solo, porém, não fornece informações sobre as espécies envolvidas nos processos que ocorrem no solo, pois é um método indireto de estimativa (HIRSCH; MAUCLINE; CLARK, 2010).

Os fungos representam o principal grupo responsável pela decomposição de material orgânico, ciclagem de nutrientes de plantas, doenças de plantas, além de atuarem em sinergismo ou antagonismo com vários micro-organismos. Os fungos são essenciais para manter o funcionamento de solos naturais e agrícolas, pois estão envolvidos na formação da estrutura do solo, facilitando dessa forma a disponibilidade de nitratos, sulfatos, fosfatos e metais essenciais (GARBEVA; VAN VEEN; VAM ELSAS 2004; GOMES et al., 2003).

Os fungos estão entre os grupos de micro-organismos mais diversificados do planeta. Embora sejam megadiversos, são também os menos conhecidos. Eles desempenham um papel extremamente importante no meio ambiente, e ocorrem-nos mais diversos habitats, ocupando vários nichos em todos os ambientes, desde o terrestre até o aquático. Além disso, a grande maioria é sapróbia, decompondo qualquer tipo de matéria orgânica sujeita a degradação, e em um número menor estão alguns grupos como parasitas obrigatórios ou oportunistas de plantas e animais e outros que apresentam uma relação simbiótica, como as micorrizas (GUSMÃO; MARQUES, 2006).

Hawsworth (2001) estimou a existência de 1,5 milhões de espécies de fungos no planeta. Atualmente, o uso dos métodos moleculares tem auxiliado na identificação de novas espécies como, por exemplo, análises ambientais de amostras de DNA de solo revelaram uma alta razão de novas espécies acumuladas neste ambiente e esses dados suportam uma estimativa de 3,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos (O'BRIEN et al., 2005). Alguns autores estimam que levará 4000 anos até que todas as espécies de fungos sejam descritas (MUELLER; SCHMIT, 2007).

O conhecimento sobre a diversidade de fungos do solo permanece escasso quando comparado com as comunidades de bactérias. A pouca informação sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais deve-se em grande parte aos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e cultivo de microrganismos em laboratório (RANJARD; POLLY; NAZARET, 2000). Além disso, alguns grupos de fungos, tais como os basidiomicetos, são difíceis de serem cultivados e podem não esporular em cultura axênica, o que impede sua identificação. Os membros do filo Glomeromycota, formadores de micorriza arbuscular, são biotróficos obrigatórios e também não crescem na ausência de plantas hospedeiras (STÜRMER; SIQUEIRA, 2006). Fatos como esses estimularam o desenvolvimento de novas técnicas que permitam o estudo das comunidades microbianas de forma independente do cultivo.

Considerando que parte das espécies de fungos possa ocorrer no solo em alguma fase do seu ciclo de vida, outras técnicas devem ser usadas para complementar as técnicas

tradicionais, para um melhor entendimento da diversidade e dinâmica de fungos do solo (BRIDGE; SPOONER, 2001). Essas técnicas, associadas aos avanços da bioinformática e aos métodos de análise estatística, são ferramentas promissoras para estudos de caracterização da diversidade microbiana e de como as comunidades microbianas se organizam em diferentes ambientes (LAMBALIS et al., 2005).

2.4. ANÁLISE DA BIOMASSA DE FUNGOS USANDO ERGOSTEROL COMO BIOMARCADOR

Diversas técnicas têm sido aplicadas para caracterizar a comunidade de fungos no solo (RUZICKA et al., 2000). Métodos indiretos para estudo dos fungos consistem na determinação de biomoléculas características de grupos específicos de organismos e as análises podem ser qualitativas ou quantitativas (GRAYSTON et al., 2001). A determinação indireta quantitativa envolve a análise do ergosterol, método que indica a biomassa de fungos eumicetos. Sendo assim, o ergosterol é restrito a um grupo taxonomicamente e ecologicamente bem definido de organismos (WALLANDER; MASSICOTTE; NYLUND, 1997).

O ergosterol é um precursor biológico (uma provitamina) para Vitamina D₂ e um biomarcador específico dos fungos (NYLUND; WALLANDER, 1992). O ergosterol (C₂₈H₄₄O, ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol, 396.66 g/mol), é o mais importante esteroide, constituinte natural das células ou membranas miceliais da grande maioria dos fungos e foi primeiramente descoberto no fungo que causa ergostismo, *Claviceps purpurea* (HART; BROKKE, 1996). Os maiores níveis são encontrados nas camadas fosfolipídicas da membrana fúngica onde desempenha importante função estrutural e hormonal na progressão do ciclo celular (MONTGOMERY et al., 2000).

O ergosterol é um bom indicador de crescimento de fungos, pois pode proporcionar uma boa correlação com a biomassa metabolicamente ativa do fungo (NYLUND; WALLANDER, 1992). O conteúdo de ergosterol varia com a fase do crescimento do fungo e, também, entre as espécies. Estudos tem demonstrado que ele é maior em micélios jovens ou velhos do que em micélio na fase estacionária (ARNEZEDER; HAMPEL, 1991; HUANG; YUNG; CHANG, 1985). A concentração de ergosterol numa massa fúngica é dependente do estágio de desenvolvimento e, conseqüentemente, da umidade, temperatura e tempo de crescimento (ANDERSON; DAVIDSON; LITTLEJOHN, 1994; BENTZ; SIX, 2006).

O ergosterol é praticamente insolúvel em água, mas apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos. A quantificação do ergosterol tem sido utilizada como indicador da biomassa fúngica em substratos como o solo, por exemplo (RUZICKA et al., 2000).

O principal caminho para a produção do ergosterol e seu precursor é a Acetil-CoA, composto intermediário chave no metabolismo celular (KOCHARIN et al., 2012). A importante etapa da via de produção do ergosterol é a remoção de um grupamento metil de um carbono na posição C-14. Essa etapa é catalisada por uma enzima, C-14 demetilase, a qual apresenta um citocromo, como grupo prostético, contendo um átomo de ferro. Diferente dos esteróis das plantas superiores, como o sitosterol, o ergosterol tem em sua estrutura um dieno conjugado, portanto, sua absorção específica de luz ultravioleta permite que ele seja identificado e quantificado tanto por espectrofotometria quanto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um detector de ultravioleta com o comprimento de onda de 282 nm (DEACON, 1998; GOULSTON; MERCER, 1969; MARTIN; DELARUELLE; HILBERT, 1990).

Diversos estudos têm sido realizados com sucesso correlacionando a concentração de ergosterol e a biomassa de fungos. Estudos realizados por Djajakirana; Joergensen; Meyer(1996); Stahl & Parkin (1996); Montgomery et al.(2000) determinaram o teor de ergosterol utilizando-o para estimar a biomassa de fungos em vários tipos de solos. Outros trabalhos como de Moraes et al. (2003) que avaliaram o grau de contaminação de fungos em grãos de milho armazenados.

O ergosterol tem sido sugerido para uso na quantificação de crescimento de fungos em substratos sólidos devido à boa correlação entre o conteúdo de ergosterol e o comprimento de hifas e entre a concentração total de ergosterol e a massa micelial (NEWELL, 1994; SCHNURER, 1993).

2.5. AS FERRAMENTAS MOLECULARES EM ESTUDOS DE BIODIVERSIDADE

Diversas variações nas técnicas de extração de ácidos nucléicos do solo já foram descritas (ATKINS; CLARK, 2004). Hoje, é possível contar com kits que possuem eficiência e rapidez para recuperação do DNA do solo (RANJARD et al., 2003), lembrando que os ácidos nucléicos extraídos tem origem diversificada, incluindo DNA ou RNA de bactérias, fungos e outros micro-organismos. A qualidade e a pureza dos ácidos nucléicos extraídos do solo são importantes para o sucesso de sua amplificação por PCR. Durante a extração, componentes como os ácidos húmicos, polissacarídeos e tanino, além de elementos como

zinco, cobre e enxofre, podem ser co-precipitados com o DNA e o RNA e inibir a PCR (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

A extração de DNA metagenômico do solo, seguida de amplificação pela PCR e aplicação de uma técnica de *fingerprinting* fornece uma nova opção para o esclarecimento de características da diversidade e da dinâmica das comunidades de micro-organismos do solo. Várias técnicas de *fingerprinting* geram perfis da comunidade de microrganismos do solo (KENNEDY; CLIPSON, 2003) como, por exemplo, a DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), TGGE (eletroforese em gel com gradiente de temperatura), T-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos terminais de restrição), ARISA (análise de espaçadores intergênicos ribossomais automatizados), dentre outras (LIM et al., 2010; VAN ELSAS et al., 2000).

2.5.1. A reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR)

Foi a partir do desenvolvimento da PCR que os métodos moleculares receberam grande impulso. Essa técnica, descoberta em 1985 por Kary Mullis da Cetus Corporation, permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, promovendo a obtenção, *in vitro*, de várias cópias de determinada região do DNA (MICKLOS; FREYER; CROTTY, 2005), sendo as regiões mais usadas as que transcrevem os RNA ribossômicos (rDNA). Essas regiões se encontram em sequência e com grande número de cópias, sendo caracterizadas pelas sequências transcritas 18S, 5.8S e 28S e não transcritas (ITS e IGS) (GARDES; BRUNS, 1993).

A especificidade e sensibilidade da PCR são obtidas a partir da utilização de um par de oligonucleotídeos (*primers*) com um comprimento mínimo de sequência única de bases, que se anelarão ao DNA-alvo quando as condições de temperatura e força iônica forem apropriadas (SCHOR; BOIM; SANTOS 2003). Essa técnica demanda uma pequena quantidade de DNA, não necessariamente puro, podendo ser extraído de amostras de solos para identificação de espécies de fungos presentes nestes ambientes (FUNGARO, 2000).

2.5.2. Eletroforese

A palavra eletroforese vem do grego e significa “conduzida pela eletricidade”, referindo-se ao deslocamento de biomoléculas numa matriz sólida (agarose ou poliacrilamida) pela ação de um campo elétrico (SNUSTAD; SIMMONS, 2008). Por ser uma técnica simples e bastante rápida, é o método mais utilizado para separação de biomoléculas. As matrizes ou

géis fornecem um meio poroso no qual os ácidos nucleicos vão ser separados. Os géis de poliacrilamida são referidos em análises que requerem alta resolução como, por exemplo, o sequenciamento do DNA, em que o tamanho dos fragmentos gerados diferencia-se em uma base nitrogenada; os géis de agarose são bastante utilizados para se verificar a qualidade do DNA genômico extraído, estimar a concentração de DNA, purificar plasmídeo e recuperar insertos de vetores (MICKLOS; FREYER; CROTTY,2005).A concentração desses componentes, agarose ou poliacrilamida, é um fator de extrema importância na eletroforese, uma vez que é ela quem determina o poder de resolução do gel (ALMEIDA; SERAFIM; EÇA2004; MARIN et al., 2009)

2.5.3. Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE)

Descrita pela primeira vez por Fischer e Lerman (1979), a técnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e suas variações, CDGE (Constant Denaturant Gel Electrophoresis) e TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), baseiam-se no fato de que moléculas de DNA de mesmo peso molecular, porém com composição nucleotídica diferente, apresentam comportamento distinto em relação à temperatura de desnaturação. Além disso, estas moléculas apresentam mobilidades diferentes quando submetidos à desnaturação parcial. A temperatura de desnaturação de uma cadeia de DNA é influenciada simultaneamente pelas pontes de hidrogênio que se estabelecem entre pares de bases complementares e pela atração entre bases adjacentes da mesma cadeia (GEJMAN et al., 1998).

Fischer e Lerman (1979) testaram a técnica DGGE usando uma temperatura uniforme de 60°C, e as amostras submetidas a um gradiente crescente de concentração de agentes desnaturantes (ureia e formamida). Os fragmentos analisados do DNA λ ou de *Escherichia coli* apresentaram diferentes mobilidades em uma concentração característica do desnaturante. Esta experiência demonstrou que a separação era dependente das sequências específicas de nucleotídeos do DNA.

Os agentes desnaturantes, ureia (NH_2CONH_2) e formamida (HCONH_2), rompem as ligações não covalentes e servem para dissociar as cadeias de DNA. O princípio da técnica de DGGE é separar, a partir da eletroforese, os produtos de PCR de mesmo tamanho com base em sua composição de nucleotídeos. A separação ocorre à medida que os fragmentos de DNA migram em um gel de poliacrilamida contendo os agentes desnaturantes. Estes agentes,

distribuídos na forma de um gradiente percentual, causam o rompimento das pontes de hidrogênio que interligam as fitas de DNA (SORLIE et al., 2005).

No decorrer da eletroforese, fragmentos parcialmente desnaturados que consistem tanto em porções helicoidais quanto em dissociadas, migram com velocidades diferentes, o que permite a separação das moléculas segundo a sua composição de nucleotídeos. A desnaturação completa das fitas não ocorre devido a um domínio de alta estabilidade, criado artificialmente em uma das extremidades da molécula pela incorporação de um grampo-GC (GURTLE; GARRIE; MAYALL, 2002; MUYZER; SMALLA, 1998; MUYZER, 1999).

Quando a técnica de DGGE foi desenvolvida, a sensibilidade para separação de fragmentos era estimada em 50%. Depois, esta sensibilidade foi aumentada pela inserção de uma sequência rica em GC em uma das extremidades dos produtos de PCR (MYERS et al., 1985) chamada de grampo GC. A presença do grampo de GC aumenta a concentração de desnaturante necessária para a desnaturação da molécula e, conseqüentemente, aumenta a sensibilidade da técnica em separar dois fragmentos de DNA de conteúdo genético similar. A simples inserção de um grampo de GC em um dos *primers* utilizado na PCR permitiu o aumento de 50% para aproximadamente 100% na detecção de mutações em sequências de DNA (NAKATSUA; TORSVIK; OVREAS, 2000).

A técnica DGGE aliada à PCR (PCR-DGGE) pode ser classificada como parte da nova disciplina de ecologia microbiana molecular (ZILLI et al., 2003). Tendo em vista que a ecologia microbiana tem como objetivo estudar as interações entre micro-organismos e seu meio ambiente, envolve um estudo de longo prazo, que inclui a análise de diversas amostras e numerosos ambientes. Os métodos convencionais de hibridação, a clonagem e cultura são mais trabalhosos e não fornecem informação sobre a dinâmica das populações microbianas em ecossistemas complexos ou sobre os efeitos das mudanças ambientais sobre tais populações (AKARSUBASI et al., 2005).

Com a abordagem da PCR-DGGE não é necessário ter o conhecimento prévio das populações microbianas. Trata-se de uma abordagem de *fingerprinting* que pode gerar padrões de diversidade genética em ecossistemas microbianos complexos, como o solo, biofilmes, fontes termais e dentre outros. Ainda, permite o monitoramento espaço-temporal rápido e simples da diversidade de populações microbianas de grande número de amostras, tomando-se por base apenas padrões de bandas (SANZ; KOCHLING, 2007).

Existem algumas limitações da técnica DGGE como: detecção de espécies predominantes, baixo sucesso da análise de fragmentos maiores que 500 pb e dificuldade de análise de genes ricos em GC. Portanto, deve-se ter cautela ao determinar uma relação direta

entre a quantidade de bandas detectadas por DGGE e o número de espécies presentes na amostra (GOMES et al., 2003). No entanto, após a separação pela DGGE, é possível, tentativamente, se identificar as espécies componentes da comunidade pela excisão da banda, reamplificação e sequenciamento do fragmento de DNA (LAMBAIS et al., 2005).

Várias moléculas podem ser utilizadas como biomarcadores para identificação e estudo da diversidade microbiana como, por exemplo, o DNA ribossomal. A ampliação por PCR desse gene e a separação das diferentes sequências pela DGGE têm sido bastante utilizada para estudo de comunidades microbianas em solo (SANZ; KOCHLING, 2007; TZENEVA et al., 2008). Diversos estudos vêm sendo realizados com a utilização de *primers* para a região do 18S rDNA e DGGE para análise de diversidade microbiana. Bolhuis; Fillinger; Stal(2013) estudaram a composição da comunidade microbiana em 33 amostras colhidas a cada dez metros na costa do Mar do Norte, na Holanda, usando a técnica DGGE para fragmentos do gene rRNA e observaram a partir da análise dos perfis de DGGE três comunidades microbianas distintas, uma comunidade marinha, salobra e de água doce.

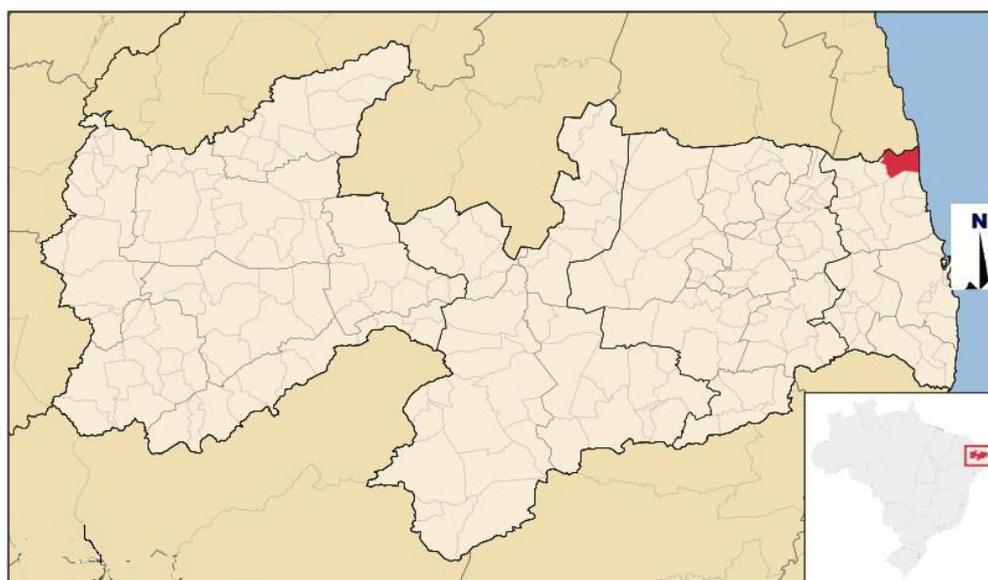
Hoshino e Morimoto (2008) utilizaram *primers* para a região 18S rDNA de fungos e DGGE para caracterizar a comunidade de fungos do solo em campos de arroz no Japão. Malosso et al. (2006), em estudo de diversidade de fungos de solos na Antártica, utilizaram *primers* específicos para a região 18S rDNA e observaram que a diversidade dos ambientes estudados é maior do que se esperava para as condições ambientais inóspitas e que muitas das espécies detectadas são de fungos cosmopolitas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

O local de estudo encontra-se no Município de Mataraca, no extremo norte do Estado da Paraíba (6°28'20"-6°30'00" S, 34°55'50"-34°57'10" W). O clima do local é tropical chuvoso (tipo Am de Köppen) com temperatura média anual de 25,5°C. A precipitação média anual alcança 1.795 mm, com 80% das chuvas concentradas nos meses de abril a agosto. O solo é do tipo Neossolo Quartzarênico, com formação geológica predominante composta por rochas sedimentares argilo-arenosas, sobrepostas por dunas fixas, onde são encontrados minerais de interesse econômico, como ilmenita (FeO TiO_2), zirconita ($\text{ZrO}_2 \text{SiO}_2$) e rutilo (TiO_2). Trata-se de uma área de exploração da mineradora Millennium Inorganic Chemicals Mining, que extrai das dunas litorâneas os minerais titaníferos ilmenita, rutilo e zirconita, que são matérias-primas na indústria de pigmento, eletrodos de solda e cerâmicas, respectivamente (CARVALHO; OLIVEIRA-FILHO, 1993; MIRANDA, 1994; SANTOS, 1996). A vegetação típica é a restinga, que reveste as dunas costeiras com tipos arbóreos, arbustivos e herbáceos que ocorrem sobre praias estreitas e sobre dunas fixas (OLIVEIRA-FILHO; CARVALHO, 2003).

Figura 1 – Mapa do estado da Paraíba com destaque para o município de Mataraca.



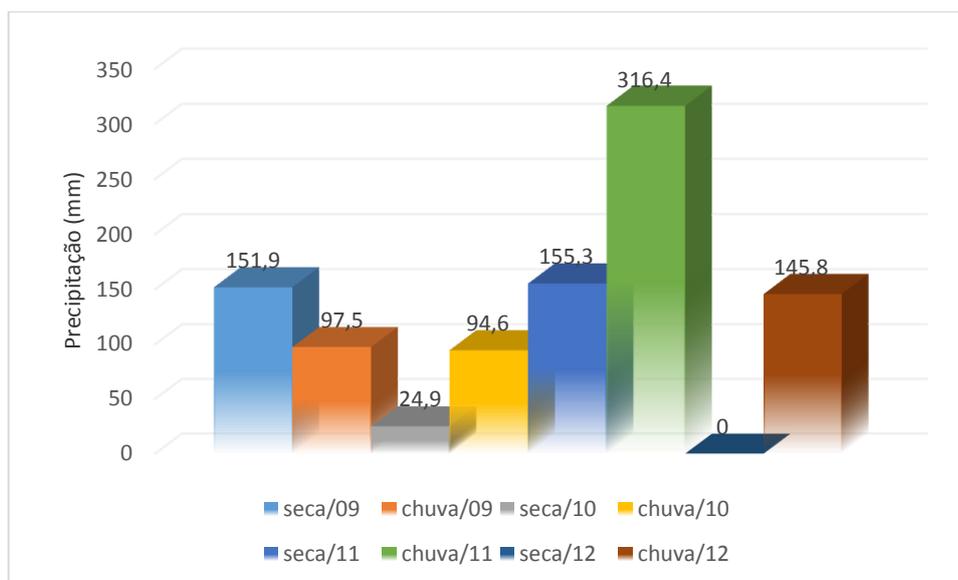
Fonte: Paraíba MesoMicroMunicip.svg, 2006.

O processo de extração dessa riqueza mineral produz rejeito, constituído basicamente por areia quartzosa, que é depositada nas áreas exploradas para, posteriormente, recompor as dunas. Após a reconstituição física, as dunas são revegetadas com mudas de plantas nativas como, por exemplo, caju (*Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae), peroba (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sandw., Bignoniaceae), juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart., Rhamnaceae) (SOUZA et al., 2010; ZEPPELINI et al., 2009).

3.2. COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

O solo foi coletado em períodos de chuva e seca em 2009, 2010, 2011 e 2012 foi mantido congelado no laboratório de Biologia Molecular no Departamento de Micologia da UFPE onde foram realizadas as análises (Figura 2).

Figura 2– Precipitação na região de Mataraca-PB.



Fonte: AESA, 2014

Para as coletas realizadas nos anos de 2010, 2011 e 2012, foram determinadas seis áreas (Tabela 1): três em dunas que passaram pelo processo de revegetação (R) em 1989, 2001 e 2009, e duas em áreas naturais, denominadas Mata Controle (MC) I e II e Restinga arbustiva(RA) (Figura 3). As áreas foram divididas em três subáreas, 20 m de distância entre si.

Tabela 1 – Anos de coletas e número de áreas nos períodos seco e chuvoso

Anos de coletas	Número de áreas	Período seco	Período chuvoso
2009	3 no período seco e 5 no chuvoso	R1989, R2001 e Mata de 2009 antes da mineração	R1989, R2001, R2009, MC e RA
2010	6 no período seco e 6 no chuvoso	R1989, R2001, R2009, MCI, MCII e RA	R1989, R2001, R2009, MCI, MCII e RA
2011	6 no período seco e 6 no chuvoso	R1989, R2001, R2009, MCI, MCII e RA	R1989, R2001, R2009, MCI, MCII e RA
2012	6 no período seco e 6 no chuvoso	R1989, R2001, R2009, MCI, MCII e RA	R1989, R2001, R2009, MCI, MCII e RA

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 3 – Aspectos da vegetação das áreas de coleta no município de Mataraca, PB.



Fonte: Danielle Karla A. da Silva, 2011.

Parte das amostras de solo da coleta de 2010, 2011 e 2012 foram enviadas ao Instituto Agrônomo de Pernambuco para caracterização química (Tabela 2, 3 e 4 respectivamente). As análises físicas mostraram textura similar e foram incluídos na classe textural de solos arenosos. O conteúdo de areia nesses solos variou de 94,3 a 96,5% e os conteúdos de silte e argila foram menores que 5,5%.

Tabela 2– Características químicas do solo da coleta de 2010 em áreas de mata controle I e II, restinga arbustiva (RA) e áreas revegetadas em 1989, 2001 e 2009.

Áreas	Fe	Cu	Zn	Mn	P	K	Na	Al	Ca	Mg	MO*
		mg/ dm ⁻³						cmol /dm ⁻³			%
MC I	11,6	0,15	2,5	26,5	4,8	0,06	0,10	0,13	2,0	1,1	2,01
MC II	72,9	0,13	1,8	30,6	5,3	0,07	0,10	0,09	2,1	1,1	2
1989	61	0,21	5,1	15,2	15,6	0,07	0,11	0,13	1,9	0,8	1,9
2001	54,8	0,09	4,5	20,4	5,8	0,03	0,09	0,04	1,9	0,7	1,68
2009	33	0,11	1,7	7,6	3,3	0,02	0,05	0,11	1,4	0,6	1,58

RA	9,4	0,06	1,7	2,1	2,6	0,04	0,10	0,06	0,9	0,7	1,04
-----------	-----	------	-----	-----	-----	------	------	------	-----	-----	------

*MO – Matéria Orgânica

Fonte: Danielle Karla A. da Silva, 2011.

Tabela 3– Características químicas do solo da coleta de 2011 em áreas de mata controle I e II, restinga arbustiva (RA) e áreas revegetadas em 1989, 2001 e 2009.

Áreas	Fe	Cu	Zn	Mn	P	K	Na	Al	Ca	Mg	MO
		mg/ dm ⁻³						cmol /dm ⁻³			%
MC I	10,4	0,11	4,1	33,3	6	0,08	0,08	0,1	2,8	0,75	2,2
MC II	47,6	0,04	3,6	29,5	5	0,08	0,09	0,1	2,4	0,46	2,4
1989	41,6	1,3	7	18,2	19	0,08	0,08	0,1	2,5	0,5	2,5
2001	44,4	0,06	4,06	15,6	9	0,03	0,07	0	1,6	0,29	1,5
2009	34,4	0,04	3,5	6,2	3	0,02	0,02	0,2	1,3	0,31	1,4
RA	10,1	0,01	2,3	1,9	3	0,05	0,07	0,03	0,8	0,31	1,1

Fonte: Danielle Karla A. da Silva, 2011.

Tabela 4– Características químicas do solo da coleta de 2012 em áreas de mata controle I e II, restinga arbustiva (RA) e áreas revegetadas em 1989, 2001 e 2009.

Áreas	Fe	Cu	Zn	Mn	P	K	Na	Al	Ca	Mg	MO
		mg/ dm ⁻³						cmol /dm ⁻³			%
MC I	10,4	0,1	4,7	35,6	7	0,07	0,09	0,1	3,01	0,76	2,1
MC II	69,1	0,05	4,6	30,4	4	0,07	0,07	0,1	2,2	0,63	1,9
1989	46,1	0	17,5	18,4	12	0,04	0,05	0,2	2,1	0,49	2
2001	90,1	0,05	8,2	21,5	8	0,02	0,07	0	1,7	0,54	1,56
2009	50,4	0	4,7	9,4	2	0,02	0,03	0,1	1,19	0,5	1,43
RA	11	0	7,1	2,7	2	0,03	0,07	0,1	0,8	0,65	1,17

Fonte: Danielle Karla A. da Silva, 2011.

Para a análise do DGGE foi utilizado os solos das coletas de 2009, 2010 e 2011. Na coleta de 2009 foram determinadas cinco áreas no período chuvoso: Mata nativa (mata controle), Restinga arbustiva, áreas revegetadas em 1989, 2001 e 2009, e foram determinadas três áreas no período seco: Revegetadas em 2001 e 2009 e mata de 2009 antes do início da mineração. Cada uma das áreas foram divididas em três subáreas, sendo estabelecidos, em cada subárea, três pontos aleatórios, totalizando nove pontos por área, o que totalizou 72 amostras de solo na coleta de 2009. Enquanto nas coletas de 2010 e 2011, as áreas estudadas foram: Mata controle I, Mata Controle II, Restinga Arbustiva, Revegetada de 1989, 2001 e 2009, cada uma dessas área foram divididas em três pontos, totalizando 36 amostras (18

amostras no período seco e 18 no período chuvoso). Um total de 144 amostras foi caracterizado pela análise molecular.

Para a análise do ergosterol foram utilizados os solos das coletas de 2010, 2011 e 2012, e as áreas estudadas foram: Mata controle I, Mata Controle II, Restinga Arbustiva, Revegetada de 1989, 2001 e 2009. Em cada área foram feitas três repetições, totalizando 108 amostras.

O solo foi coletado com auxílio de uma pá de jardinagem (aproximadamente 400 g até 20 cm de profundidade), e armazenado em saco plástico, etiquetado e transportado para o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), onde as amostras foram acondicionadas em freezer a -20°C . Parte do solo coletado foi utilizada para análise molecular e uma porção foi utilizada para análise de ergosterol.

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA METAGENÔMICO

A extração do DNA total do solo foi realizada utilizando o método descrito por GRIFFITHS et al. (2001), com algumas modificações.

Para extração do DNA, 0,5 g de solo foram colocados em tubos de plástico com tampa de rosca aos quais foram adicionados 0,5 g de glass beads (mix de 150-212 μm e 425-600 μm , lavadas com ácido, Sigma), duas esferas de 4 mm de vidro, além de 0,5 ml de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e 0,5 ml de tampão CTAB (5% em fosfato de potássio 120 mM, pH 8.0). Os tubos foram agitados em homogeneizador FastPrep (FP120 FastPrep Cell Disruptor) por 30 s à 5 m/s e centrifugados, em seguida, à 16.000G por cinco minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o extrato lavado com 0,5 ml de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e centrifugado novamente por cinco minutos. Em seguida, o DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio (3M) e 0,6 volume de isopropanol por duas horas no gelo, centrifugado a 16.000 G por 10 minutos e lavado com etanol a 70% gelado. O pellet foi seco ao ar e ressuspenso em 50 μl de água ultra pura.

3.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da extração de DNA e da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose a 1% preparado em tampão TAE 1X (TAE 50X : 242g de Tris, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0,5M e água deionizada q.s.p. 1 L, pH 8,0). Em microtubos foram misturados 4 µL do produto da extração ou da PCR com 2,0 µL de Gel Loadind Buffer GLB 3X e 2,0 µL de Gel Green (Biotium) e, então, aplicados nos poços do gel. Para a estimativa do tamanho dos fragmentos de DNA, as amostras foram analisadas ao lado do marcador de tamanho 1 kb plus. A eletroforese foi conduzida a 100V, 500 mA por 40 minutos em solução TAE 1X. Os géis foram analisados e fotografados em transiluminador de luz UV.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DO DNA TOTAL DO SOLO

A quantificação do DNA total do solo foi realizada em espectrofotômetro no Laboratório de Genética da UFPE e no Laboratório de Virologia (LaVite) do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-FIOCRUZ/PE. Esses aparelhos quantificam de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

onde **C** é a concentração de DNA em ng/µL, **Abs** é a absorvância do DNA (neste caso a 260 nm, que corresponde ao pico de absorção de UV do DNA), **e** o coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é igual a 50 ng. cm/µL) e **b** a altura da coluna criada no espectrofotômetro (que neste caso corresponde a 1cm).

3.6. AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DO rDNA 18S DE FUNGOS E 16S DE BACTÉRIAS

As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit Top Taq Master Mix (Qiagen) num volume final de 25 µL. Foram utilizados os primers FR1_(GC) e FF390 (VAINIO; HANTULA, 2000), direcionados para a região 18S do rDNA de fungos e AF1(Edwards et al., 1989) e 530R_(GC) (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993) para bactérias. A reação de PCR otimizada para fungos está apresentada na Tabela 5 e para bactérias na Tabela 6.

Tabela 5 - Protocolo para amplificação do rDNA SSU de fungos por PCR utilizando os iniciadores FR1_(GC)/FF390

Componente	Mix	Temperatura	Programa Térmico		
	µl		1x	35 x	1x
Top taq Master mix 2x	12,5	94°C	3 min.	30s.	-
FR1 _(GC) [10 pmol µl ⁻¹]	0,5	50°C	-	45s.	-
FF390 [10 pmol µl ⁻¹]	0,5	72°C	-	1min.	10 min.
DNA template [100 ng µl ⁻¹]	1				
H2O até	25				

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Tabela 6 - Protocolo para amplificação do rDNA SSU de bactérias por PCR utilizando os iniciadores AF1/530R_(GC)

Componente	Mix	Temperatura	Programa Térmico		
	µl		1x	35 x	1x
Top taq Master mix 2x	12,5	94°C	3 min.	30s.	-
530R _(GC) [10 pmol µl ⁻¹]	0,5	50°C	-	45s.	-
AF1 [10 pmol µl ⁻¹]	0,5	72°C	-	1min.	10 min.
DNA template [100 ng µl ⁻¹]	1				
H2O até	25				

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE GRADIENTE DESNATURANTE

3.7.1 DGGE de fungos

Produtos de PCR fúngico (cerca de 400 pb) foram separados em gel de acrilamida a 6% com gradiente desnaturante variando de 30% a 50%. Os géis foram preparados utilizando uma combinação de duas soluções de desnaturação. A primeira continha 3 ml de solução de acrilamida (BioRad) a 40% (v/v), 0,4 ml TAE 50x, 4 ml de solução formamida (Sigma) e 4,2 g de ureia (BDH) em água deionizada em q.s.p. 20 ml, resultando na solução de acrilamida a 6% contendo 30% de desnaturante. A segunda solução continha 3 ml de solução de acrilamida a 40% (v/v), 0,4 ml TAE 50x, 2,4 ml de solução formamida e 2,52 g de ureia em um volume final de 20 ml de água deionizada, resultando na solução de acrilamida a 6% contendo 50% de desnaturante. O gel foi preparado na vertical, entre duas placas de vidro previamente limpas e separados por dois espaçadores de 1mm e mantidos a 4°C overnight para assegurar a polimerização completa (MALOSSO, 2006).

3.7.2 DGGE de bactérias

Produtos de PCR bacterianos (cerca de 200 pb de comprimento) foram separados em gel de acrilamida a 10% (w/v) com o gradiente desnaturante variando de 30% a 60%. A primeira solução continha 5 ml de solução de acrilamida a 40% (v/v), 0,4 ml de TAE 50 x, 4,8 ml de solução formamida e 5,04 g de ureia, em volume final de 20 ml de água deionizada para obter uma solução de 10% de acrilamida contendo 60% de desnaturante. A segunda solução continha 5 ml de solução acrilamida (v/v) a 40%, 0,4 ml de TAE 50 x, 2,4 ml de solução formamida e 2,52 g de ureia em um volume de 20 ml de solução final com água deionizada para dar uma solução de acrilamida a 10% contendo 30% de desnaturante (MALOSSO, 2006).

3.7.3 Eletroforese desnaturante

Após a completa polimerização dos géis desnaturantes, eles foram montados no equipamento de eletroforese, pré-aquecidos à 60°C e, em seguida, as amostras (produtos de PCR) foram carregadas, misturadas com 7 µl de GLB 6x. O marcador de tamanho 100 pb (Fermentas) foi carregado nas duas extremidades do gel e a corrida foi realizada à 60 °C, 200 V, por aproximadamente três horas. Ao final, o equipamento foi desmontado e o gel corado com SYBR Green por 30 minutos sob leve agitação. Os géis foram visualizados em transiluminador e depois fotografados. As imagens dos géis foram exportadas para o Software Quantity One® (Bio Rad) para análise.

3.7.4 Análise das imagens dos géis de DGGE

As imagens digitalizadas dos géis foram importadas para o programa Quantity One (Quantity One Quantitation Software version 4.4.0, The Discovery Series, BioRad) para análise dos padrões de bandas. Todas as imagens foram editadas para remover manchas de fundo e otimizar o contraste antes da detecção bandas. Os dados das bandas obtidas na análise do DGGE foram gerados pelo programa Quantity One, no qual foram analisadas a presença e ausência de bandas (1 e 0, respectivamente). A matriz foi analisada pelo programa computacional NTSYS pc 2.1 (ROHLF, 2000). Para o cálculo de similaridade foi utilizado o coeficiente de Jaccard, que é utilizado para avaliar o grau de similaridade na composição taxonômica entre dois locais de estudo, em termos de presença ou ausência de espécies. Com base na matriz de similaridade gerada foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento pareado das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method

using Arithmetic Average). O ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma foi estimado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) (SOKAL & ROHLF, 1962).

3.8. EXTRAÇÃO DE ERGOSTEROL

O procedimento para a extração de ergosterol foi realizado conforme a técnica publicada por Seitz et al. (1977) com adaptações para as amostras do presente estudo. Foram pesados 10 g de solo em tubos grandes de extração e adicionados 10 ml da solução extratora (etanol absoluto + ác. Pirogálico). Os tubos foram agitados por 2 horas em agitador orbital e, em seguida, o conteúdo foi transferido para novos tubos e centrifugados a 12.000 G por 10 min a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 1 ml de KOH 60%, seguido de incubação em banho-maria a 90 °C por 30 min. Após esse tempo, foram adicionados 1 ml de água destilada e 4 ml de hexano à cada tubo, que foi agitado em vortex e deixado sobre a bancada para separação das fases. A fase hexânica foi removida para novo tubo e o processo repetido com mais 2 ml de hexano. Em seguida, foram colocados os tubos com a fase hexânica abertos, em capela, sobre placa aquecida para evaporação completa do hexano. Após secos, os tubos receberam 2 ml de metanol e foram agitados em agitador orbital (TA) por ~ 1 hora. O ergosterol eluído foi transferido para tubos escuros com tampa rosqueável e armazenados em freezer a -20°C.

3.8.1 Quantificação cromatográfica do ergosterol

O ergosterol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foram injetados 10µl da amostra no sistema cromatográfico no qual foi utilizado metanol como fase móvel a um fluxo de 1ml/min. e uma coluna cromatográfica C18 fase reversa (Kinetex- C18 – 5µm 150 x 4.6 mm, Phenomenex). O ergosterol foi identificado com detector de ultravioleta com comprimento de onda fixado em 282 nm. O tempo de retenção do ergosterol na análise em HPLC foi de aproximadamente 4 minutos. Após a leitura da curva padrão, foram feitas as análises das amostras do solo.

O conteúdo de ergosterol foi calculado a partir da curva padrão como controle, construída com as seguintes concentrações de ergosterol: 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL.

A quantificação foi realizada a partir da medida da área integrada do pico correspondente ao ergosterol contido na amostra, comparado com a área do pico correspondente ao padrão de ergosterol.

3.9 Análise Estatística

Os dados de ergosterol foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do programa Assistat 7.6 beta (2011).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA COMUNIDADE DE FUNGOS NO SOLO POR DGGE

A interpretação dos dados do coeficiente de correlação cofenética foi de acordo com a seguinte regra: valor de $r \geq 0.9$ considerado um ajuste muito bom; $0.8 \leq r < 0.9$ bom; $0.7 \leq r < 0.8$ pobre e $r < 0.7$ muito pobre (ROHLF, 2000).

Análise da comunidade de fungos dos solos estudados. Assim, na Figura 4 são mostrados os agrupamentos obtidos no período seco de 2009 entre as dunas revegetadas em 1989, 2001 e área de 2009 antes do início da mineração. Observa-se a definição de um agrupamento formado pelas amostras 1, 2 e 3 de 2009 com 100% de similaridade e a amostra 4 de 1989 com 85% de similaridade com essas amostras. Outro agrupamento é formado com 100% de similaridade entre as amostras 1,2 e 3 de 2001 e a amostra 2 de 2009, além disso, as amostras 4 de 2001 e 1 de 2009 foram separadas desse ramo apresentando 100% de similaridade entre elas. O agrupamento III também formou dois ramos, as amostras 2,4 e 5 de 2009 apresentaram 100% de similaridade e a 5 de 2001 foi separada desse ramo com 50% de similaridade.

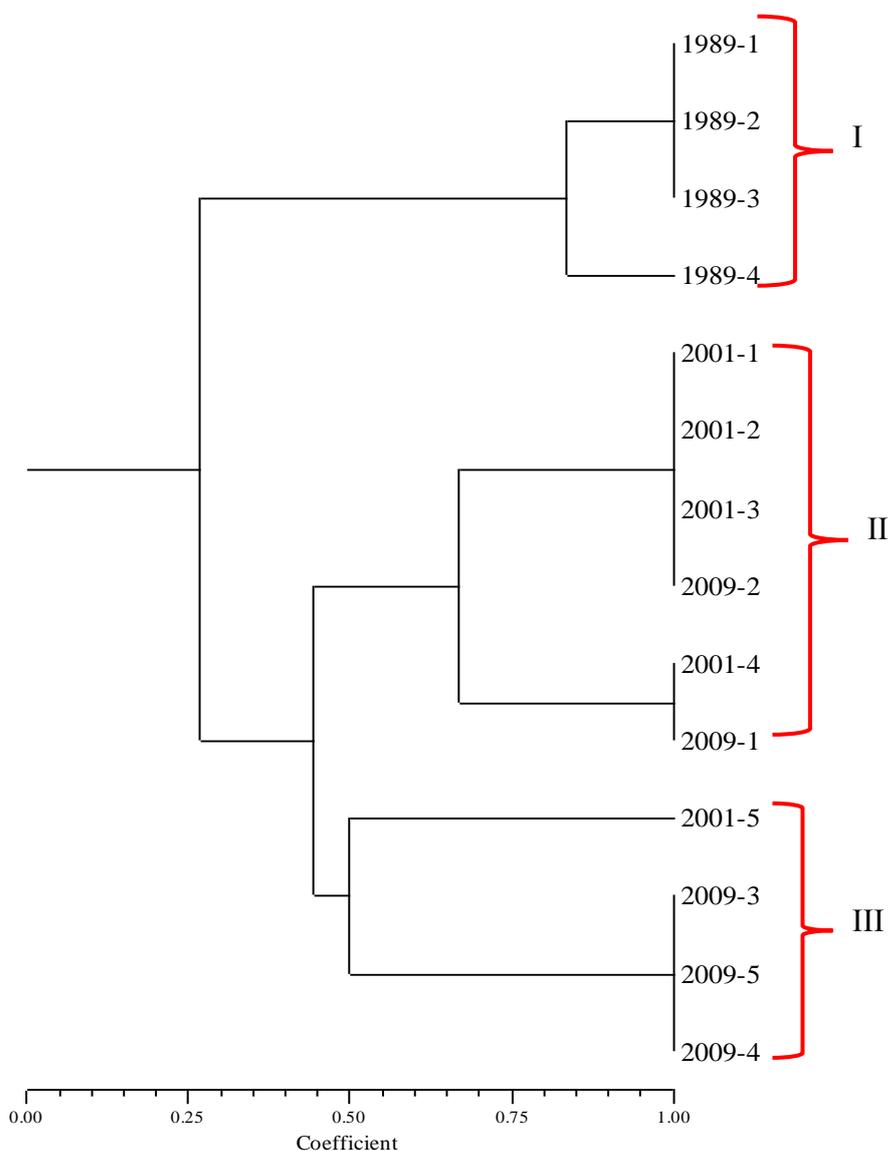
Foram detectadas 39 bandas na 1ª coleta de 2009 (Tabela 7). A área revegetada de 1989 apresentou um maior número de bandas em relação a áreas revegetada de 2001 e a área de 2009.

Tabela 7 – Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período seco de 2009.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	20	4
2001	10	5
2009	9	5
Total de bandas		39

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 4 -Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 18S do rDNA da comunidade de fungos de amostras de solo coletadas no período seco de 2009 nas áreas revegetadas em 1989 e 2001, e na área de 2009 antes do início da mineração. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.95.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

A análise da dendrograma da comunidade de fungos do período chuvoso de 2009 entre as áreas revegetadas 1989, 2001 e 2009 está representado na Figura 5. Observa-se a formação de três clusters divididos em vários subgrupos e amostras isoladas. No agrupamento I, as amostras 1 e 2 de 1989 mantiveram aproximadamente 90% de similaridade. A amostra 2 de 2009 manteve aproximadamente 85% de similaridade com a amostra 6 de 1989 e a amostra 7

de 1989 e 1 de 2001 também mantiveram em torno de 85% de similaridade. O índice de similaridade constatado nos subgrupos (**a**, **b** e **c**) do agrupamento I foi menor que 70%. O agrupamento II foi formado por um subgrupo (**d**) manteve em torno de 85% de similaridade, as duas amostras isoladas (amostras 3 e 5 de 2009) mantiveram um índice de similaridade em torno 70% e 60% respectivamente em relação ao subgrupo (**d**). O índice de similaridade do agrupamento II em relação às outras amostras foi menor que 75%. O agrupamento III foi o único que formou um subgrupo (**f**) com 100% de similaridade entre amostras de áreas diferentes. Ainda no agrupamento III pode se observar o subgrupo (**e**) formado pelas amostras 4 de 1989 e 7 de 2009 mantendo um índice de similaridade menor que 90%. A amostra 3 e 8 de 1989 formaram ramos isolados do agrupamento III. O índice de similaridade do cluster III comparado com os outros clusters foi aproximadamente 60%. A amostra 5 de 1989 e a amostra 4 de 2009 se mantiveram isoladas dos três agrupamentos.

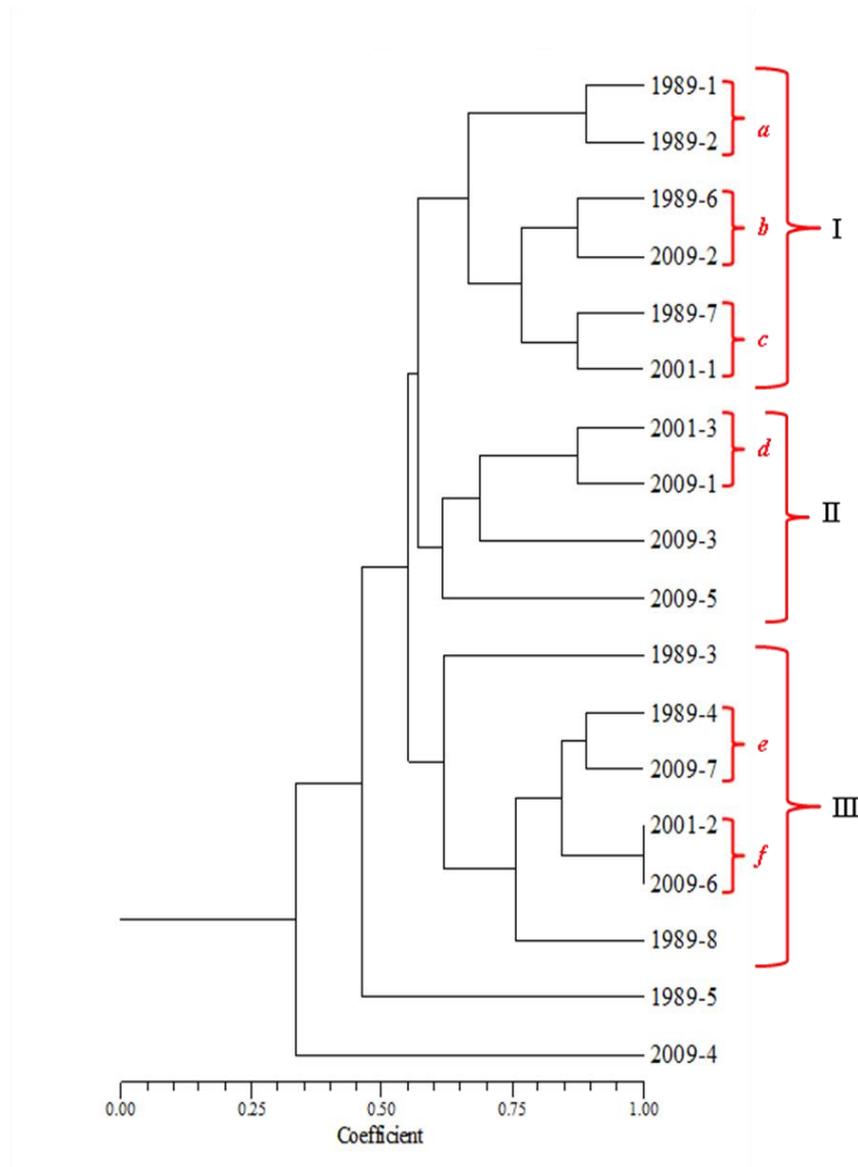
Foram detectadas 146 bandas no período chuvoso de 2009 assim como mostra a tabela 8, que é um número bem maior se comparado ao período seco de 2009. Assim como no período seco de 2009, a área revegetada de 1989 apresentou maior número de bandas no período chuvoso de 2009 quando comparada às áreas revegetadas de 2001 e 2009.

Tabela 8–Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2009.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	69	8
2001	24	3
2009	53	7
Total de bandas	146	

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 5- Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 18S do rDNA da comunidade de fungos de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2009 nas áreas revegetadas em 1989, 2001 e 2009. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.80.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Análise do dendrograma da comunidade de fungos no período chuvoso de 2009 das áreas de Mata Controle (MC) e Restinga Arbustiva (RA) está representado na Figura 6. Observa-se a definição de dois agrupamentos formados por vários subgrupos. O agrupamento I é resultante de 100% de similaridade das amostras 2, 3, 4 e 5 da MC e a amostra 1 da MC foi separada mantendo um índice de similaridade de aproximadamente 75% com as amostras

desse subgrupo. No agrupamento II as amostras 4, 6 e 7 da RA mantiveram 100% de similaridade, a amostra 1 da RA manteve quase 80% de similaridade com as amostras 6 da MC e a 2 da RA, e essas duas amostras apresentaram aproximadamente 90% de similaridade entre si. A amostra 5 da RA foi a mais divergente nesse agrupamento, com índice de similaridade menor que 30%.

Analisando os agrupamentos I e II, observa-se que o primeiro agrupamento manteve um índice de similaridade em torno de 10% com o segundo agrupamento, comprovando que as amostras 1, 2, 3, 4 e 5 da MC apresentaram maior divergência em relação ao agrupamento II.

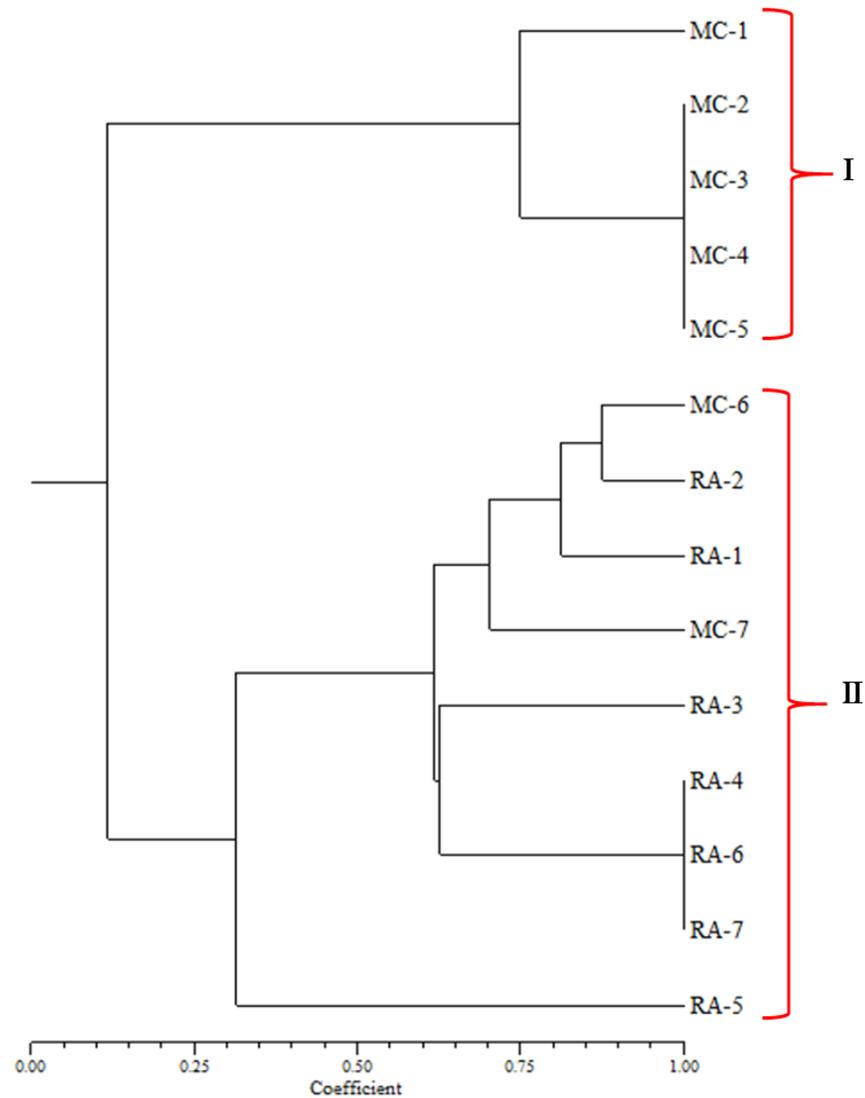
O número de bandas constatado nessas duas áreas foram 109, tabela 9. Foi possível observar que três bandas das amostras 6 e 7 da área MC foram compartilhadas com as amostras 1 e 2 da RA, o que, possivelmente, levou essas amostras a apresentarem um índice de similaridade de aproximadamente 85%.

Tabela 9 – Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2009.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
Mata Controle	57	7
Restinga Arbustiva	52	7
Total de bandas		109

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 6- Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 18S do rDNA da comunidade de fungos de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2009 nas áreas de Mata Controle e Restinga Arbustiva. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.98.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Análise da comunidade de fungos no período seco de 2010 das áreas Mata Controle I (MC I), Mata Controle II (MC II), Restinga Arbustiva (RA), áreas revegetadas em 1989, 2001 e 2009 está representada na Figura 7. Observa-se a definição de três agrupamentos formados por vários subgrupos. O agrupamento I composto por dois subgrupos (*a* e *b*), o subgrupo *a* formado pelas as amostras 1 e 2 da MCI apresentou aproximadamente 75% de similaridade, a amostra 3 da MCI foi separada desse subgrupo mantendo aproximadamente 65% de

similaridade. O subgrupo *b* formado pelas amostras 1 e 2 da MCII manteve 100% de similaridade e a amostra 3 da MCII foi separada desse subgrupo com 50% de similaridade. O agrupamento II formou dois subgrupos, no subgrupo *c* foi observado duas amostras de áreas diferentes compartilhando 100% de similaridade, e o subgrupo *d* formou 100% de similaridade. No agrupamento III é evidenciado a formação do subgrupo *e* com 100% de similaridade entre amostras de áreas diferentes e a formação do subgrupo *f* com aproximadamente 75% de similaridade entre amostras da mesma área. Ainda no agrupamento III, a amostras 3 de 1989 formou um ramo isolado compartilhando 50% de similaridade com o subgrupo *f* e a amostra 1 de 2009 que também formou um ramo isolado com aproximadamente 60% de similaridade.

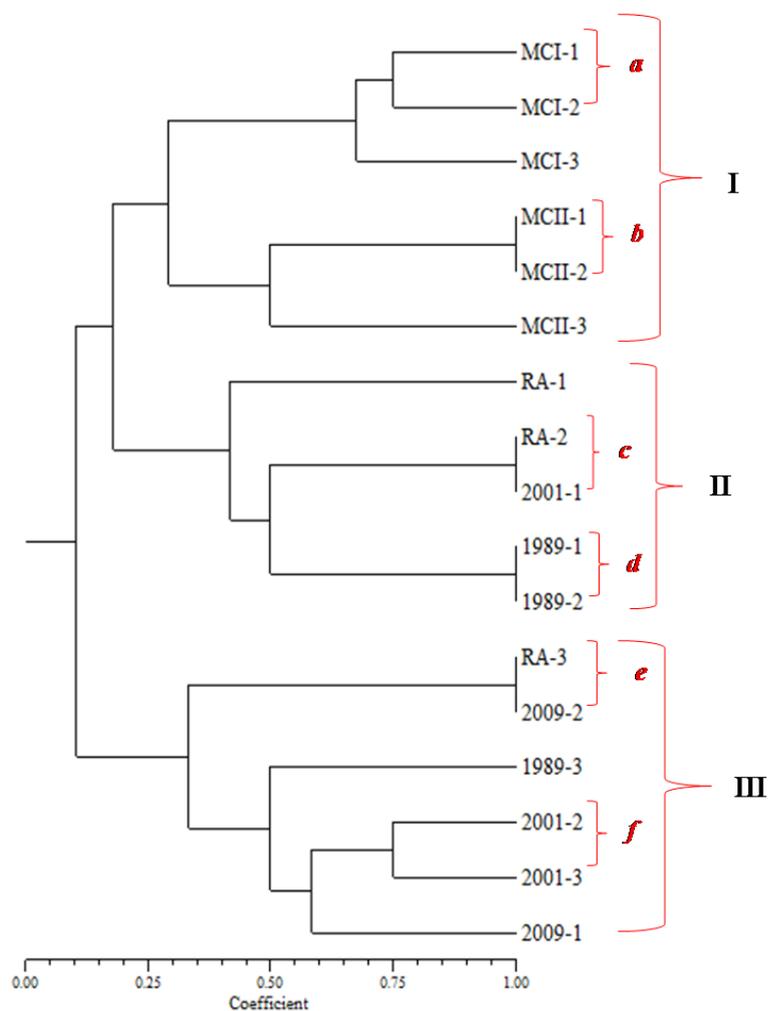
O número de bandas detectadas no período seco 2010 foi 43 bandas (Tabela 10). Foi observado um maior número de bandas na área revegetada em 1989 e na área natural Mata Controle II.

Tabela 10 –Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período seco de 2010.

<i>Áreas</i>	<i>Nº de bandas</i>	<i>Nº de amostras por área</i>
1989	5	3
2001	6	3
2009	4	2
MCI	11	3
MCII	6	3
RA	11	3
Total de bandas		43

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 7- Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 18S do rDNA da comunidade de fungos de amostras de solo coletadas no período seco de 2010 nas áreas de Mata Controle I e II, Restinga Arbustiva, Revegetada 1989, 2001 e 2009. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.83.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

O dendrograma representando a comunidade de fungos, no período chuvoso de 2010, nas áreas de estudo é mostrado na Figura 8. Observa-se a definição de um agrupamento com vários subgrupos. A amostra 1 da MC II formou um ramo separado do agrupamento II mantendo aproximadamente 5% de similaridade com as demais amostras. O agrupamento II foi formado pelos subgrupos *a*, *b*, *c* e *d*. O subgrupo *a* formado pela amostra 2 da MC II e pela amostra 1 da RA manteve aproximadamente 65% de similaridade. O subgrupo *b* manteve 100% de similaridade com uma amostra de área diferente, a amostra 3 de 2001 foi separada desse subgrupo com 75% de similaridade. O subgrupo *c* apresentou 65% de similaridade

intergrupo, a amostra 1 da MCI manteve separada dos subgrupos com aproximadamente 45% de similaridade. O subgrupo *d* apresentou aproximadamente 70% de similaridade intergrupo.

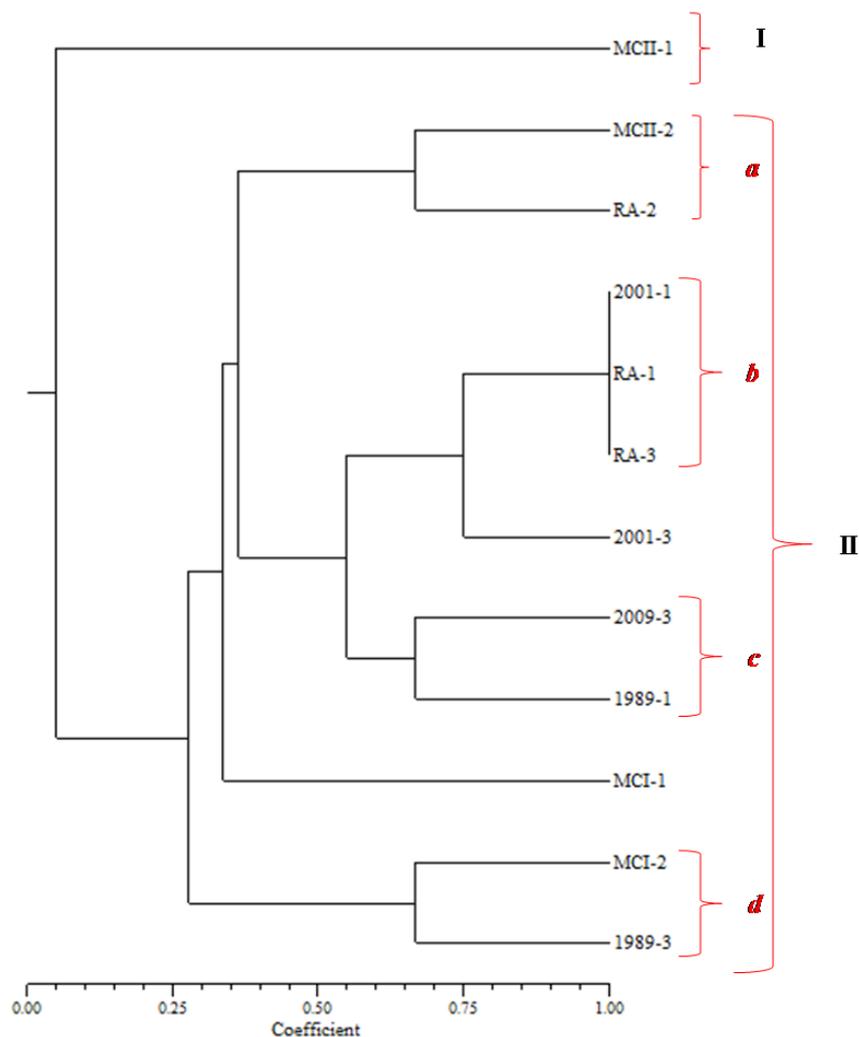
Foram detectadas 161 bandas no período chuvoso de 2010, representando um aumento de 118 bandas (ou 118 unidades taxonômicas operacionais - UTO) em relação ao período seco deste mesmo ano (Tabela 11). O número de bandas da área revegetada de 2001 foi maior e mais semelhante com as das duas áreas naturais, Mata Controle I e II.

Tabela 11 –Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2010.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	27	2
2001	25	3
2009	8	1
MCI	26	2
MCII	35	2
RA	40	3
Total de bandas		161

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 8 - Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 18S do rDNA da comunidade de fungos de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2010 nas áreas de Mata Controle I e II, Restinga Arbustiva, Revegetada 1989, 2001 e 2009. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.93.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

A análise do dendrograma da comunidade de fungos no período seco de 2011 das áreas de estudo (Figura 9) mostra dois ramos divididos em vários subgrupos e um ramo isolado. O agrupamento I, formado por dois subgrupos (*a* e *b*), tem o subgrupo *a* com as amostras 1 e 2 de 1989 com 75% de similaridade, as amostras 1 de 2009 e 2 de 2001 com 100% de similaridade e a amostra 1 de 2001 em um ramo isolado, com 40% de similaridade com as demais amostras desse subgrupo. O agrupamento II é formado pelos subgrupos *c*, *d*, *e*; o subgrupo *c* formado pela amostra 2 de 2009 e amostra 1 da RA manteve 75% de

similaridade, a amostra 3 da MCI formou um ramo separado desse subgrupo mantendo aproximadamente 55% de similaridade. O subgrupo *d* composto pelas amostras 2 da RA e 1 da MCII manteve 100% de similaridade. As amostras 1 e 2 da área MCI, pertencentes ao subgrupo *e*, mantiveram 75% de similaridade. A amostra 2 da MCII formou um ramo isolado mantendo um índice de similaridade próximo de 30% com o agrupamento II. A amostra 3 de 2001 foi a mais dissimilar, mantendo menos de 5% de similaridade com os outros grupos.

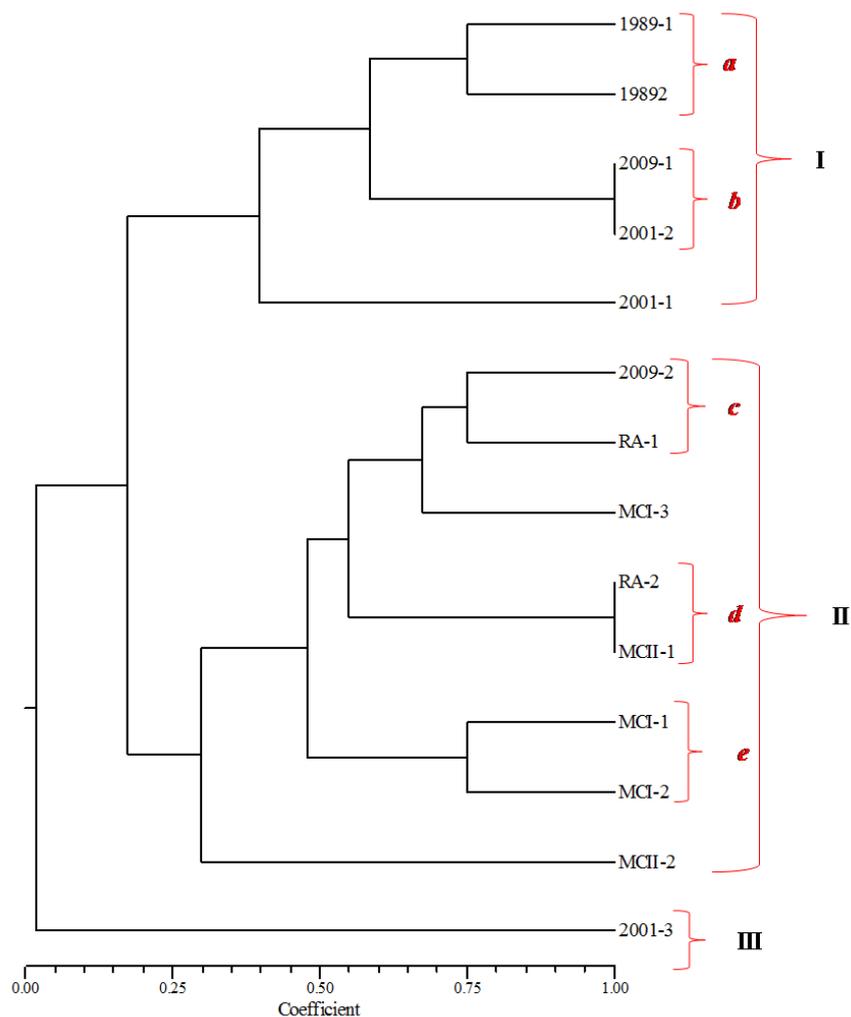
O número de bandas detectadas no período seco de 2011 foram 38 (Tabela 12). As bandas da área revegetada de 1989 foram mais semelhantes com as das áreas naturais, Mata Controle I e II.

Tabela 12 –Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período seco de 2011.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	7	2
2001	4	3
2009	5	2
MCI	11	3
MCII	4	2
RA	7	2
Total de bandas		38

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 9- Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 18S do rDNA da comunidade de fungos de amostras de solo coletadas no período seco de 2011 nas áreas de Mata Controle I e II, Restinga Arbustiva, Revegetada 1989, 2001 e 2009. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.88.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

O agrupamento dos perfis da comunidade de fungos no período chuvoso de 2011, das seis áreas amostradas (Figura 10), mostra 100% de similaridade das amostras 1 e 2 de 2001 no agrupamento I. No agrupamento II, as amostras 1 e 3 da MCII do subgrupo *a* mantiveram 87,5% de similaridade, o subgrupo *b* apresentou aproximadamente 85% de similaridade com as amostras 2 e 3 da MCI, a amostra 1 de 2009 foi separada dos subgrupos *a* e *b* com aproximadamente 65% de similaridade. O subgrupo *c* manteve 100% de similaridade, a amostra 2 de 1989 foi separada desse subgrupo com 75% de similaridade. No agrupamento

III, o subgrupo *d* manteve 100% de similaridade intragrupo e as amostras 1 de 1989 e 2 de 2009 formaram ramos isolados com 80% e 65% de similaridade respectivamente.

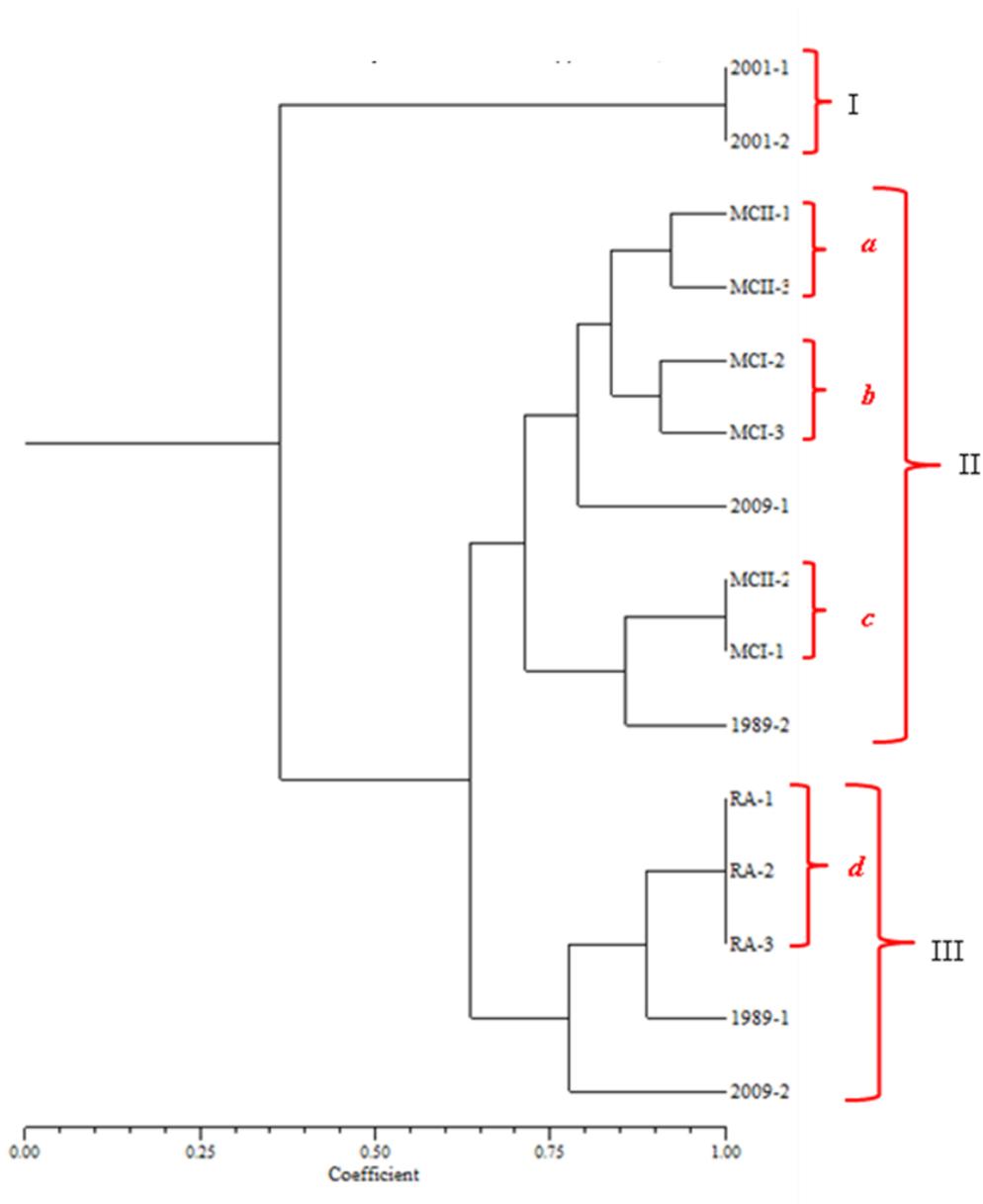
O número de bandas detectadas no período chuvoso de 2011 foram 64 (Tabela 13). As bandas da área revegetada de 1989 foram mais semelhantes com as das áreas naturais, Mata Controle I e Restinga Arbustiva.

Tabela 13 – Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2011.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	8	2
2001	2	2
2009	9	2
MCI	14	3
MCI	16	3
RA	15	3
Total de bandas		64

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 10 - Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 18S do rDNA da comunidade de fungos de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2011 nas áreas de Mata Controle I e II, Restinga Arbustiva, Revegetada 1989, 2001 e 2009. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.88.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

O perfil dos fragmentos de DNA de PCR-DGGE de fungos mostrou maior diversidade de bandas em relação ao de bactérias (Apêndice A). A comunidade de fungos na área de revegetação mais antiga (1989) apresenta maior número de bandas em relação às outras duas áreas de revegetação de 2001 e 2009. Também, foi observado em todos os géis de PCR-DGGE de fungos que a área revegetada em 1989 apresentou números de bandas semelhantes aos das áreas naturais. O gradiente desnaturante utilizado para todas as amostras de fungos foi de 20%- 50 %.

O DGGE de fungos mostrou que o tempo de revegetação e a disponibilidade de água proporcionaram um aumento da população de fungos, fato que confirma os dados de ergosterol. Comparando os anos de coleta de 2010 e 2011 do DGGE de fungos e do ergosterol, pois foram os dois anos de coleta que coincidiram nessas duas análises, na coleta de 2010 do período seco foram detectadas 43 bandas, enquanto que no período chuvoso houve um incremento de 118 bandas, já no período seco de 2011, foram detectadas 38 bandas, enquanto que no período chuvoso foram detectadas 64 bandas. Percebe-se, nesses dois anos de coleta, que no período seco o número de bandas na coleta de 2011 foi um pouco maior em relação à coleta de 2010, e os dados do ergosterol mostram que a concentração de ergosterol no período seco, foi maior no ano de 2011 comparado ao ano de 2010. No período chuvoso houve o aumento do número de bandas, mas a diferença do número de bandas não variou muito, no ano de 2010 o período chuvoso apresentou um número maior de bandas em relação a 2011, esse fato coincide com os dados do ergosterol, em que as áreas revegetada de 1989, Restinga Arbustiva e Mata Controle I apresentaram maior concentração de ergosterol em relação ao ano de 2011.

Para a região 18S do rDNA de fungos foram detectadas 600 bandas, sendo 120 bandas no período seco e 480 bandas no período chuvoso. O perfil de fungos obteve um incremento de 435 bandas em relação ao de bactérias.

4.2. ANÁLISE DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS NO SOLO POR DGGE

A análise de agrupamento dos perfis da comunidade bacteriana foi realizada segundo a mesma abordagem da análise da comunidade de fungos e está representada nos dendrogramas a seguir. Na Figura 11 estão incluídas as duas áreas revegetadas (1989 e 2001) e a área de 2009 antes do início da mineração, amostradas no período seco de 2009 (1ª coleta). Essas amostras formaram dois agrupamentos principais: o agrupamento I apresentou 100% de

similaridade entre as amostras 1, 2, 3, 5 e 6, porém, a amostra 4 ficou separada, apresentando similaridade de aproximadamente 50% em relação às demais amostras da área minerada em 2009. Nesta primeira coleta, a área de 2009 ainda consistia de uma duna nativa que seria explorada em breve, portanto, não surpreende que essas amostras apresentem comportamento diferente das demais amostras provenientes de áreas previamente exploradas e revegetadas.

As amostras das áreas revegetadas em 1989 e 2001 formaram o agrupamento II. As amostras 1, 4, 5 e 6 de 1989 e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 de 2001 apresentaram 100% de similaridade, enquanto que as amostras 2 e 3 de 1989 ficaram separadas desse grupo, representando um índice de similaridade de aproximadamente 50% em relação as outras amostras de 1989 e 2001.

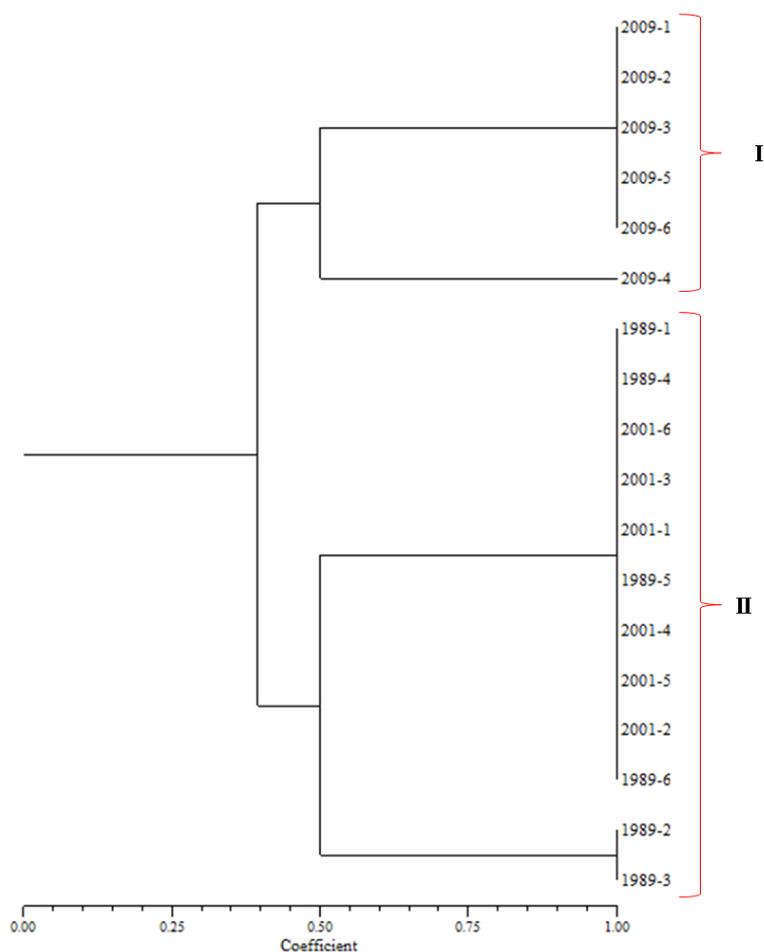
O perfil de bandas detectadas no período seco de 2009 foram 29 (Tabela 14). As bandas da área revegetada de 2001 apresentou um número um pouco maior que a área revegetada de 1989.

Tabela 14 –Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período seco de 2009.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	10	6
2001	12	6
2009	7	6
Total de bandas		29

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 11 - Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 16S do rDNA da comunidade bacteriana de amostras de solo coletadas no período seco de 2009 nas áreas revegetadas em 1989 e 2001, e na área de 2009 antes do início da mineração. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.91.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Na coleta realizada no período chuvoso de 2009, a comunidade bacteriana do solo das áreas revegetadas de 1989 e 2001 não apresentaram diferença. Entretanto, na análise da comunidade bacteriana nas dunas revegetadas em 1989 e 2001 no período chuvoso de 2009, representada no dendrograma da Figura 12, se pode observar a formação de quatro grupos divididos em vários subgrupos. Os grupos apresentam 100% de similaridade intragrupo. No entanto, o grupo I e a subamostra 4 de 1989 quase não apresentaram similaridade com as demais amostras, inclusive com as da mesma área. Esse fato pode indicar o efeito de micro-habitat, e sugerir que as subamostras de uma área se comportam como amostras independentes no que concerne a diversidade de bactérias nessas áreas.

No agrupamento II, a subamostra 5 de 1989 foi separada das demais amostras apresentando um índice de similaridade menor que 50% com as outras amostras do grupo II. A amostra 6 de 1989 se agrupou com as amostras 1, 2, 5 e 6 de 2001 e manteve 100% de similaridade. A amostra 4 de 2001 formou um ramo isolado mantendo aproximadamente 60% de similaridade com o agrupamento II. As amostras 3, 7, 8 e 9 de 2001 (grupo III) formaram um grupo separado das demais dessa mesma área e podem estar evidenciando o efeito de micro-habitat, que é comum para micro-organismos (NANNIPIERI et al., 2003), o índice de similaridade foi de 100% nesse grupo. No grupo IV as subamostras 7 e 8 de 1989 mantiveram 100% de similaridade e a amostra 9 de 1989 foi separada e manteve um índice de similaridade de 50% com as outras amostras da mesma área, nesse grupo também pode estar evidenciado o efeito de micro-habitat.

Entre duas áreas revegetadas observa-se que a duna revegetada em 1989 tem maior variabilidade, pois as amostras da duna revegetada em 2001 se agruparam melhor, formando dois subgrupos com 100% de similaridade intragrupo.

As áreas Restinga Arbustiva e revegetada de 2009 não apresentaram diferenças no período chuvoso.

O coeficiente cofenético foi alto refletindo uma boa concordância entre a construção do dendrograma e os valores de similaridade genética.

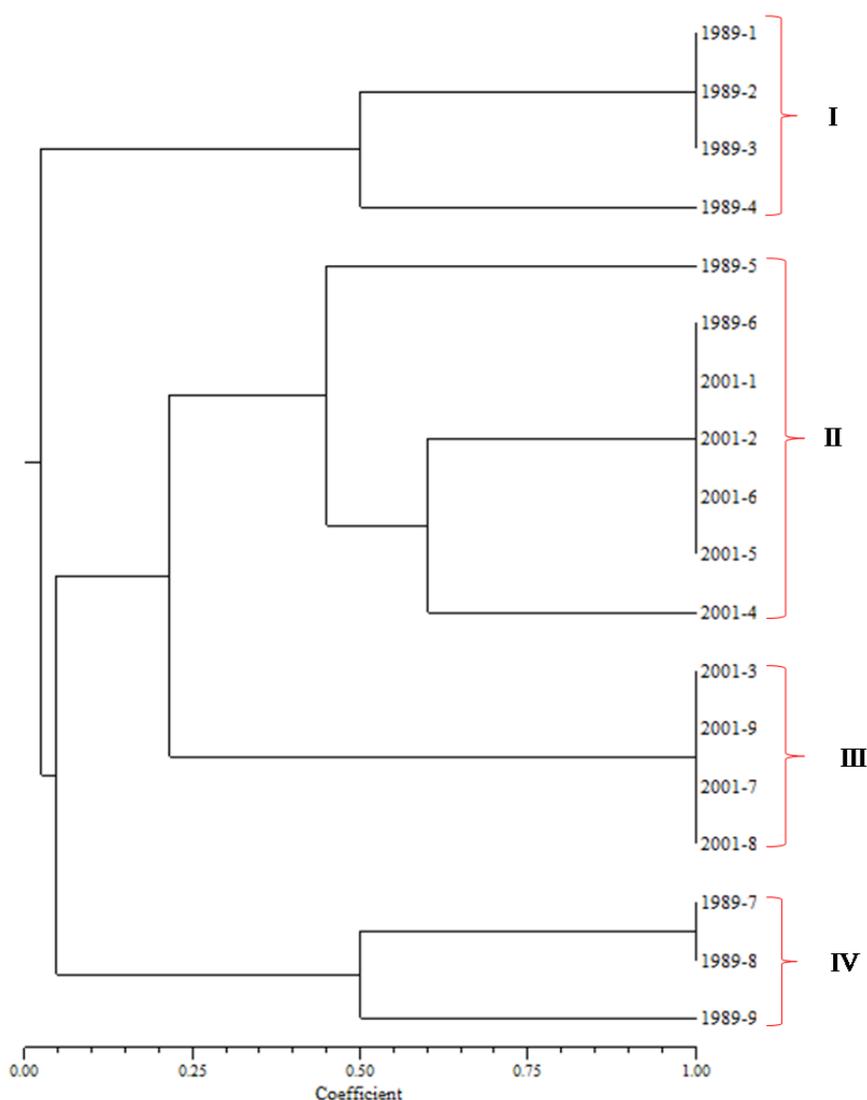
Foram detectadas 39 bandas no período chuvoso de 2009, representando (Tabela 15).

Tabela 15–Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2009.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	15	9
2001	24	9
Total de bandas	39	

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 12- Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 16S do rDNA da comunidade bacteriana de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2009 nas áreas revegetadas em 1989 e 2001. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.97.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

O agrupamento do perfil da comunidade bacteriana no período chuvoso de 2009 da área de Mata Controle I (MCI) indica diferenças internas da área natural e está representado na Figura 13. O agrupamento I manteve 100% de similaridade intragrupo no subgrupo *a* (amostras 1, 2, 3) e no subgrupo *b* (4, 5, 6), com esses dois subgrupos separados por um índice de similaridade de aproximadamente 50%. O grupo II manteve 100% de similaridade entre as amostras 7 e 8 da MC e não apresentou nenhuma similaridade com o grupo I.

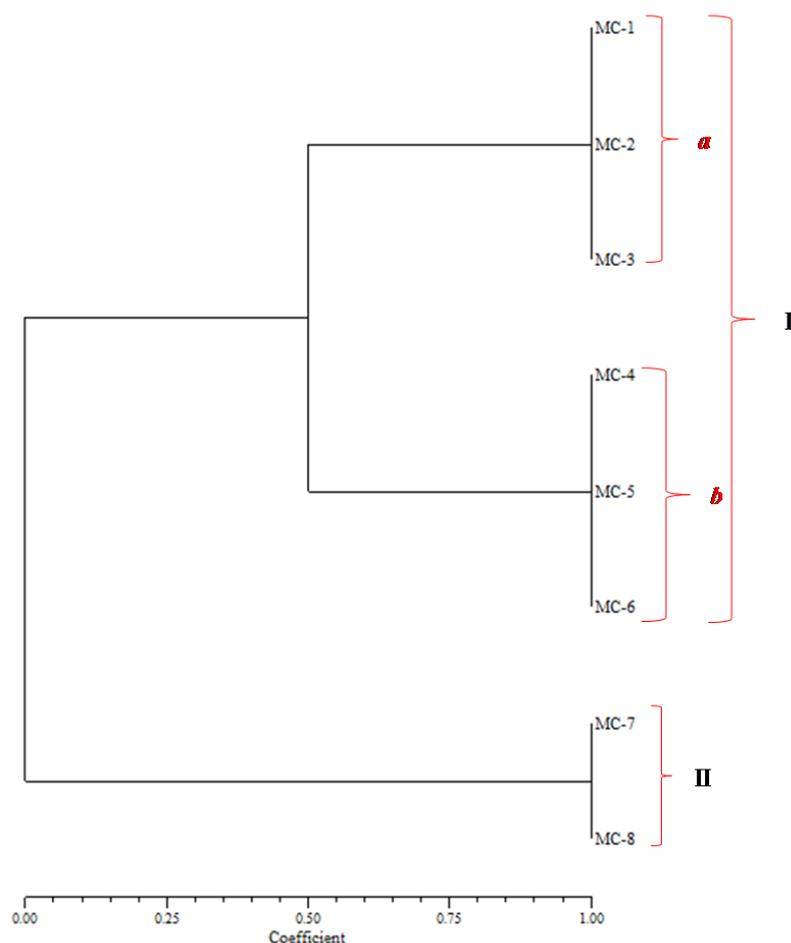
O número de bandas detectadas no período chuvoso de 2009 na área da mata controle foi 11 (Tabela 16).

Tabela 16 –Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2009.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
MC	11	8
Total de bandas	11	

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 13– Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 16S do rDNA da comunidade bacteriana de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2009 na área natural de Mata Controle I. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 1.0.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Na coleta realizada no período seco de 2010, a comunidade bacteriana do solo não apresentou nenhuma diferença entre as áreas, mas foram detectadas 15 bandas. No entanto, no período chuvoso, representado no dendrograma da Figura 14, são evidenciadas algumas diferenças. Todas as amostras mantiveram 100% de similaridade intragrupo, exceto a amostra 1 de 1989 do agrupamento II que apresentou um valor menor que 70% de similaridade com as demais amostras.

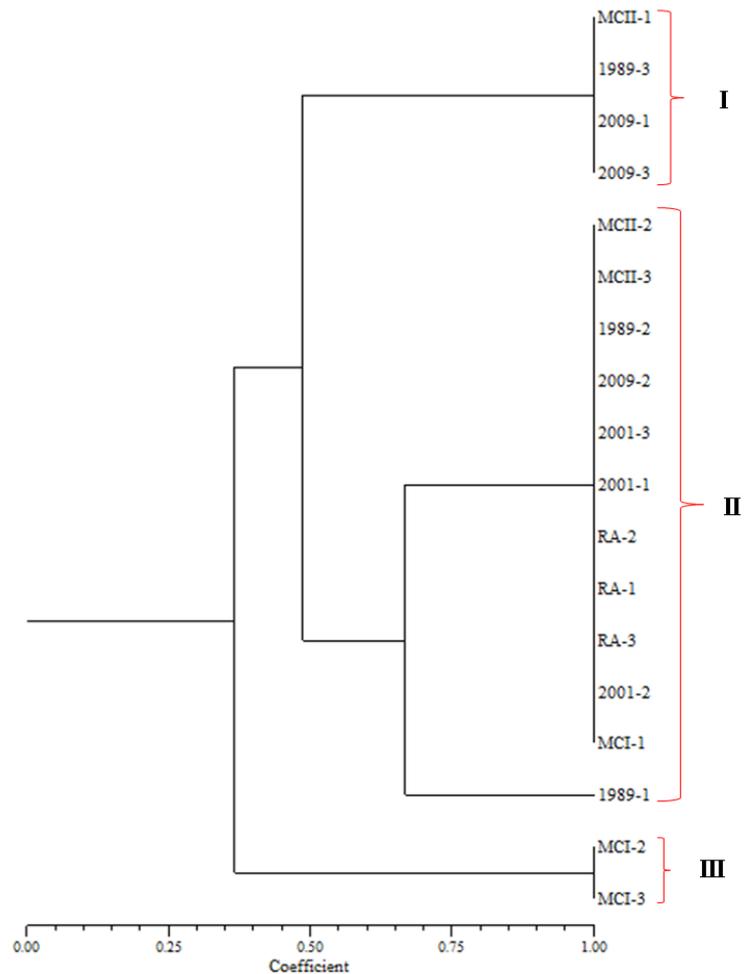
O número de bandas detectadas no período chuvoso de 2010 foram 28 (Tabela 17).

Tabela 17–Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2010.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	6	3
2001	6	3
2009	4	3
MCI	4	3
MCIH	2	1
RA	6	3
Total de bandas		28

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 14 - Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de amplificação de PCR-DGGE da região 16S do rDNA da comunidade bacteriana de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2010 nas áreas: MCII (Mata Controle II), MCI (Mata Controle I), RA (Restinga Arbustiva), Revegetada 1989, 2001 e 2009. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.93.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Na coleta realizada no período seco de 2011, a comunidade bacteriana do solo não apresentou nenhuma diferença entre as áreas, mas foram detectadas 15 bandas. No entanto, a análise do agrupamento do perfil bacteriano do período chuvoso de 2011, representada no dendrograma da Figura 15, mostrou diferenças entre todas as áreas incluídas no estudo. Este dendrograma mostrou a comunidade de bactérias das áreas naturais, Mata Controle I e II e Restinga Arbustiva, e das áreas revegetadas 1989, 2001 e 2009. O agrupamento I formado pelas amostras 3 da MC I, 1 e 3 da RA, 2 da MC II e 1 de 2009 agrupou três áreas naturais

com 100% de similaridade com uma área revegetada. A amostra 1 da MCI foi separada desse agrupamento com aproximadamente 50% de similaridade. O agrupamento II composto pelas amostras 2 da RA, 2 e 3 de 1989 e 2 de 2009 apresentou 100% de similaridade entre uma área natural e duas áreas revegetadas. O agrupamento III agrupou as áreas 2 de 2001, 3 de 2009 e 1 de 1989 com 100% de similaridade e separou a amostra 1 de 2001 com aproximadamente 45% de similaridade. A amostra 2 da MC I formou um grupo separado das demais com apenas 25% de similaridade com as demais áreas.

Analisando a similaridade dos grupos das amostras da mesma área foi possível observar que, em relação às amostras 1, 2 e 3 da Mata Controle I, o valor detectado não passa de 25%. Isso significa que essas amostras correspondentes à mesma área divergiram mais do que as amostras de áreas diferentes, como apresentado nos agrupamentos II e III. As amostras 1, 2 e 3 da Restinga Arbustiva representaram aproximadamente 35% de similaridade, assim como a área de 2009 manteve o índice de aproximadamente 35% de similaridade entre as amostras. O índice de similaridade entre as amostras da área de 2001 foi 50% e da área de 1989 foi 45%.

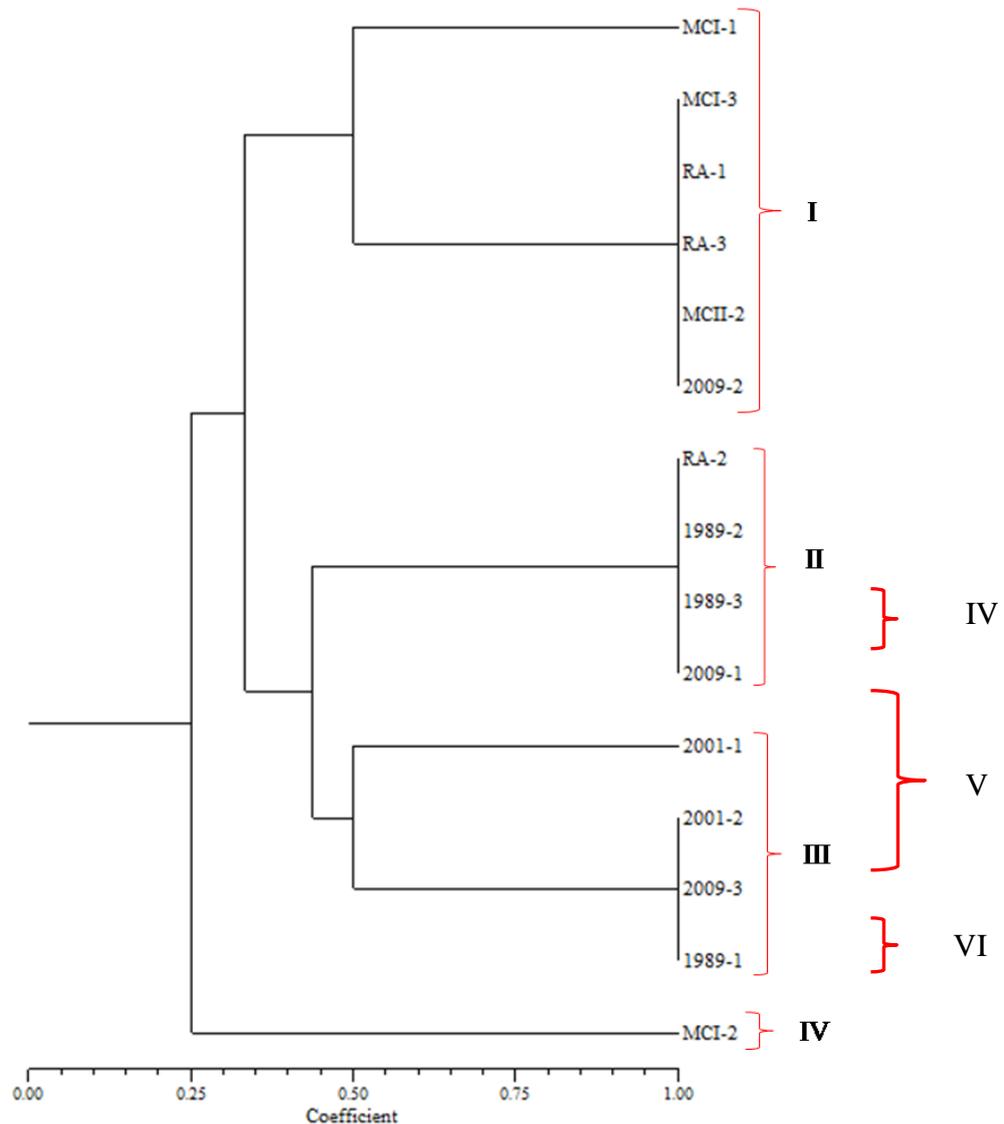
O número de bandas detectadas no período chuvoso de 2011 foram 28 (Tabela 18).

Tabela 18–Número de fragmentos de DNA de PCR-DGGE do período chuvoso de 2011.

Áreas	Nº de bandas	Nº de amostras por área
1989	4	3
2001	6	2
2009	5	3
MCI	6	3
MCH	2	1
RA	5	3
Total de bandas		28

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Figura 15 - Dendrograma de similaridade genética baseado nos perfis de fragmentos de DNA de amplificação de PCR-DGGE da região 16S do rDNA da comunidade bacteriana de amostras de solo coletadas no período chuvoso de 2011 nas áreas: MCII (Mata Controle II), MCI (Mata Controle I), RA (Restinga Arbustiva), Revegetada 1989, 2001 e 2009. Os números ao lado das áreas indicam as subáreas. Coeficiente de correlação cofenética (r) 0.89.



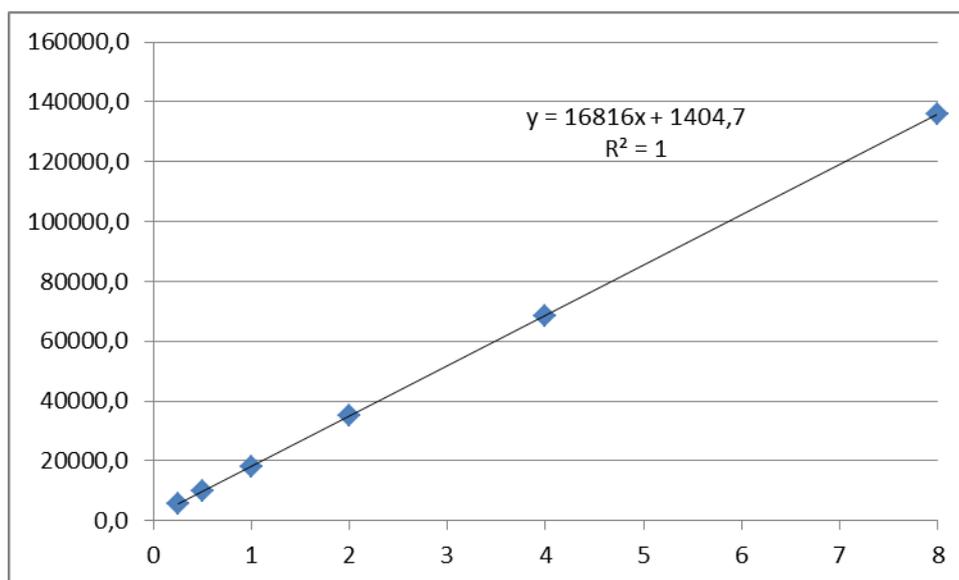
Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

O perfil dos fragmentos de DNA de PCR-DGGE de bactérias mostrou uma diversidade menor de bandas em todos os anos do período de coletas analisado (Apêndice B). O gradiente de desnaturante utilizado para todas as amostras de bactérias foi de 20 - 40 %. Para a região 16S do rDNA de bactérias foram 165 detectadas bandas, sendo 59 bandas no período seco e 106 bandas no período chuvoso.

4.3. ANÁLISE, POR ERGOSTEROL, DA BIOMASSA DA COMUNIDADE DE FUNGOS NO SOLO

A determinação do ergosterol foi utilizada para quantificação da biomassa de fungos do solo de mineração, comparando áreas naturais com áreas revegetadas. O valor de $R = 1$ indica uma forte relação entre as variáveis (Figura 16).

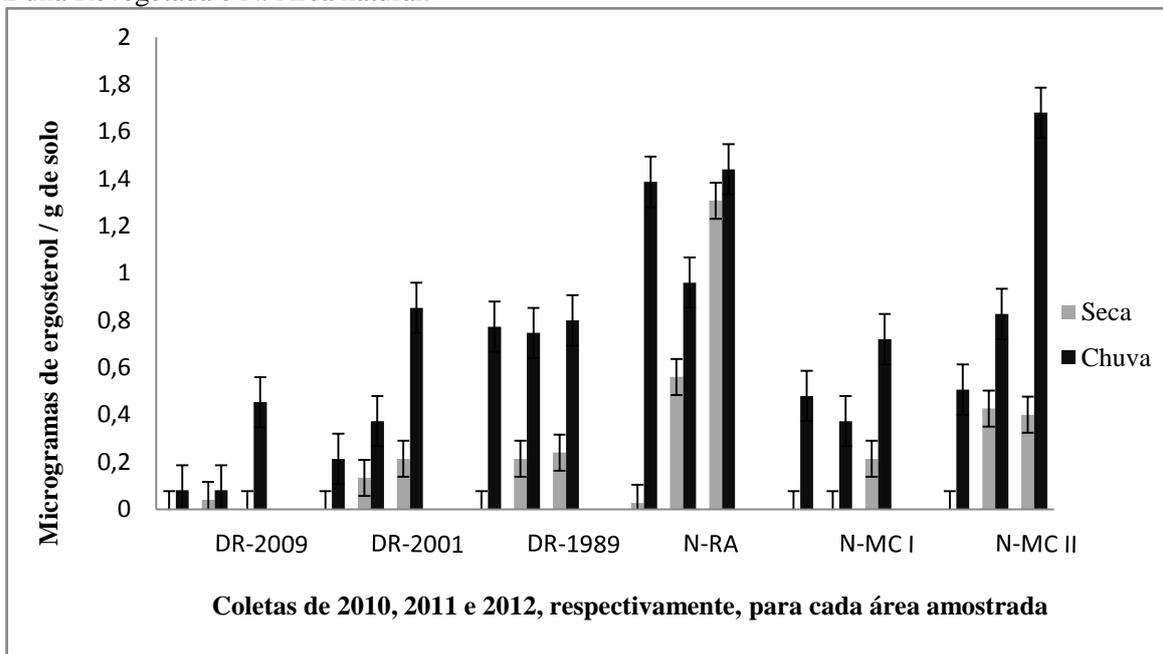
Figura 16- Curva padrão obtida a partir do Ergosterol



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

As concentrações de ergosterol no solo no período seco (março) e no período chuvoso (julho) das coletas de 2010, 2011 e 2012 estão representadas na Figura 17. Foi possível observar que as concentrações de ergosterol foram maiores no período chuvoso e na coleta de 2012. Na área revegetada em 2009, as concentrações de ergosterol foram maiores no período chuvoso na coleta de 2012. Porém, nas coletas de 2010 e 2011 não foram observadas diferenças no período chuvoso na área revegetada em 2009. Esses resultados levam a crer que não foi possível em um ano (de 2010 para 2011) ter aumentado a biomassa de fungos na área de revegetação mais jovem. Isso, porém, se modifica na coleta de 2012 em que um aumento da concentração do biomarcador se evidencia. Esse fato sugere também que o solo com pouca cobertura vegetal sofre uma influência maior dos regimes de seca e chuva (Figura 17).

Figura 17- Concentração do ergosterol no solo das áreas Revegetadas em 1989, 2001 e 2009, Mata Controle I e II e Restinga Arbustiva, nos anos de coleta 2010, 2011 e 2012, respectivamente. DR: Duna Revegetada e N: Área natural.



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

A área revegetada em 2001 apresentou um crescimento exponencial, tanto no período seco quanto no chuvoso, sendo observada na coleta de 2012, no período chuvoso, a concentração de ergosterol mais elevada em relação aos outros anos de coletas. Como se trata de uma área revegetada de idade intermediária, essa área apresenta atividade biológica semelhante à área de revegetação mais jovem e o processo de recuperação se encontra em intenso progresso. Na área revegetada em 1989 observou-se que, no período seco, a concentração de ergosterol aumentou da coleta de 2010 para a de 2011, e esta não variando com a coleta de 2012. Já no período chuvoso, a concentração de ergosterol na coleta de 2010 foi um pouco maior que em 2011, sendo mostrado uma estabilização da comunidade de fungos entre os anos de coleta, evidenciando a recuperação do funcionamento microbiano em relação à duna natural.

Na área de Restinga Arbustiva (RA) os valores de ergosterol detectados no período seco foram maiores em relação às outras áreas. Na coleta de 2012, a concentração do período seco foi bem elevada, quase equivalendo à concentração do período chuvoso. A concentração de ergosterol no período chuvoso foi alta na coleta de 2010, diminuiu em 2011 e voltou a aumentar na coleta de 2012.

Na Mata Controle I, a concentração de ergosterol no período seco nas coletas de 2010 e 2011 foi muito baixa, havendo uma maior concentração na coleta de 2012 (Figura 17). No período chuvoso foi evidenciado uma concentração maior na coleta de 2010, diminuiu em 2011 e aumentou em 2012. O mesmo fato foi observado nas áreas revegetadas de 1989 e na Restinga Arbustiva, indicando que a área revegetada de 1989 está ficando similar às áreas naturais. Os valores de ergosterol na área de Mata Controle II (MC II) no período seco foi maior na coleta de 2011. No período chuvoso, foi evidenciado um aumento exponencial, pois na coleta de 2012 houve um aumento muito maior em relação às coletas de 2010 e 2011. Foi observada característica semelhante na área revegetada em 2001.

Os valores detectados do biomarcador da biomassa de fungos em cada ano de coleta foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey para comparação das médias entre os períodos seco e chuvoso, nas áreas naturais e revegetadas.

Para a coleta de 2010, a diferença foi maior para a duna revegetada em 1989 ($p < 0,01$) e para a área de Mata Controle I ($p < 0,05$). Nas outras áreas os valores não foram significativos (Tabela 19). As concentrações de ergosterol da coleta de 2010 variaram de 0 $\mu\text{g/g}$ a 0,853 $\mu\text{g/g}$ de solo. O nível mais elevado de biomassa de fungos do solo foi obtido nas amostras de solo das áreas naturais (Mata Controle I e II e Restinga Arbustiva), a área revegetada de 1989 apresentou concentrações semelhantes as das áreas naturais no período chuvoso, isso é um indicativo de crescimento da biomassa de fungos. As áreas de Restinga Arbustiva e revegetada de 1989 e 2009 não apresentaram concentrações detectáveis de ergosterol no período seco.

Tabela 19 - Valores de p das comparações do teor de ergosterol no solo entre os períodos seco e chuvoso das coletas de 2010 para dunas naturais e revegetadas.

Área	Período seco($\mu\text{g/g}$)	Período chuvoso($\mu\text{g/g}$)	Valores de p
Mata Controle I	0,133	0,373	0,003*
Mata Controle II	0,213	0,853	0,0665ns
Restinga Arbustiva	0	0,213	0,050ns
Revegetada 2009	0	0,080	0,3738ns
Revegetada 2001	0,040	0,080	0,050ns
Revegetada 1989	0	0,453	0,001**

ns: não significativo ($p \geq 0,05$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$);

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), pelo teste de Tukey.

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Para a coleta de 2011, todas as áreas apresentaram diferenças significativas. Valores de $p < 0,01$ foram observados para as áreas revegetadas em 1989, 2001 e 2009 e na área de

Mata Controle II. A área de Mata Controle I e a área revegetadas de 2009 tiveram $p < 0,05$ (Tabela 20).

As concentrações de ergosterol da coleta de 2011 variaram de 0 $\mu\text{g/g}$ a 1,440 $\mu\text{g/g}$. As áreas naturais de Mata Controle I e II e Restinga Arbustiva apresentaram os maiores valores. Entre as áreas revegetadas, a duna de 1989 foi a que apresentou a maior valor, o que demonstra a recuperação do solo em relação ao tempo de revegetação (Tabela 20).

Tabela 20 - Valores de p das comparações do teor de ergosterol no solo entre os períodos seco e chuvoso das coletas de 2011 para dunas naturais e revegetadas.

Área	Período seco($\mu\text{g/g}$)	Período chuvoso($\mu\text{g/g}$)	Valores de p
Mata Controle I	0,560	0,960	0,0036**
Mata Controle II	1,307	1,440	0,0143*
Restinga Arbustiva	0,027	1,387	0,0179*
Revegetada 2009	0	0,773	0,0013**
Revegetada 2001	0,213	0,747	0,001**
Revegetada 1989	0,240	0,800	0,0037**

ns: não significativo ($p \geq 0,05$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$); **significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), pelo teste de Tukey.

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

A concentração de ergosterol na coleta de 2012 variou entre 0 $\mu\text{g/g}$ e 1,68 $\mu\text{g/g}$. Os menores teores foram detectados nas áreas revegetadas em 2001 e 2009 e Restinga Arbustiva no período seco e a maior concentração (1,68 $\mu\text{g/g}$) foi detectada na área natural (Mata Controle II) no período chuvoso.

A análise de variância dos dados das coletas de 2012 indicou que a biomassa de fungos em todas as áreas diferiram bastante entre os períodos chuvoso e seco. Nas áreas revegetadas em 2009 e 2001 foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$). A maior diferença foi observada nas áreas revegetada em 1989 e na Restinga Arbustiva ($p < 0,01$). No entanto, o funcionamento da comunidade de fungos não diferiu entre os períodos, seco e chuvoso, na Mata Controle I e II (Tabela 21).

Tabela 21 - Valores de p das comparações do teor de ergosterol no solo entre os períodos seco e chuvoso das coletas de 2012 para dunas naturais e revegetadas.

Área	Período seco($\mu\text{g/g}$)	Período chuvoso($\mu\text{g/g}$)	Valores de p
Mata Controle I	0,427	0,827	0,050ns
Mata Controle II	0,400	1,680	0,0834ns
Restinga Arbustiva	0	0,507	0,009**
Revegetada 2009	0	0,480	0,0171*
Revegetada 2001	0	0,373	0,0178*
Revegetada 1989	0,213	0,720	0,0039**

ns: não significativo ($p \geq 0,05$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$); **significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$), pelo teste de Tukey.

Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

Para a variável ergosterol, que indica a biomassa de fungos no solo, observou-se que quando as áreas, os anos de estudo e os períodos sazonais foram analisados separadamente, houve diferenças significativas nos teores desta substância no solo, sendo as diferenças mais marcantes detectadas entre os períodos sazonais (Figura 18).

Figura 18 - Análise de variância e interações entre fatores para dados de ergosterol de seis áreas (naturais e revegetadas) no município de Mataraca, PB, em três anos de coletas consecutivas, nos períodos de seca e chuva.

QUADRO DE ANÁLISE				
FV	GL	SQ	QM	F
Área (F1)	5	5.14164	1.02833	17.9128 **
Ano (F2)	2	3.61076	1.80538	31.4485 **
Período (F3)	1	7.07379	7.07379	123.2209 **
Int. F1xF2	10	0.62693	0.06269	1.0921 ns
Int. F1xF3	5	1.41341	0.28268	4.9241 **
Int. F2xF3	2	0.93603	0.46801	8.1525 **
Int. F1xF2xF3	10	1.15410	0.11541	2.0104 *
Tratamentos	35	19.95667	0.57019	9.9324 **
Resíduos	72	4.13333	0.05741	
Total	107	24.09000		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$);

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$);

ns não significativo ($p \geq .05$).

Fonte: Marcela Barbosa, 2013

A análise em conjunto mostrou que houve interação entre os fatores do estudo, exceto entre área e ano de coleta. Assim, o comportamento dessa variável foi diferente entre os locais de coleta (áreas), entre os anos de coleta e entre os períodos sazonais em cada ano e houve interação altamente significativa entre os períodos de coleta e as áreas e entre os períodos e os anos de estudo. Quando os três fatores foram levados em conta simultaneamente, observou-se que houve interação tripla ao nível de 5% de probabilidade.

5 DISCUSSÃO

Estrutura da comunidade de fungos analisada por PCR-DGGE

A técnica de DGGE permitiu uma análise direta do DNA genômico das amostras de solo provenientes da Mineradora Millennium Inorganic Chemicals. Como foi descrita ao longo do trabalho, esta técnica permite a separação de moléculas de DNA de mesmo tamanho, mas com sequências nucleotídicas diferentes ao longo de um gradiente de desnaturação química. A separação está baseada na decrescente mobilidade eletroforética de moléculas de DNA fita dupla parcialmente desnaturadas (DÍEZ et al., 2001; MUYZER; SMALLA, 1998). Usualmente considera-se que cada banda visualizada no gel de DGGE corresponda a uma espécie de fungo (ou de bactéria), portanto, uma banda detectada no gel pode representar mais de um genótipo, com sequências divergentes, mas com teores de G+C iguais (GOMES et al., 2003).

Assim como foi verificado nas amostras de bactérias, em fungos algumas não amplificaram, das 144 amostras analisadas, cerca de 42 amostras não amplificaram, mesmo sendo repetida a extração de DNA, não foi possível obter uma amplificação eficiente.

Além disso, algumas comunidades microbianas podem não ser detectadas pelo sistema de *primers*, de forma que as bandas analisadas no gel podem representar as espécies dominantes na amostra (SMIT et al., 1999).

Na análise por DGGE da comunidade de fungos foi possível observar um maior número de bandas em relação à análise da comunidade de bactérias. No período chuvoso foi detectado um aumento do número de bandas nos três anos de coleta. Isso comprova que, dentre os fatores que contribuíram para o aumento da comunidade microbiana, a disponibilidade de água foi um dos mais importantes.

Segundo Muzer; De Waal; Uitterlinden (1993) a DGGE é uma boa ferramenta para estudo comparativo de áreas distintas ou impactadas. Se as amostras apresentarem padrões de bandas diferentes, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças.

As imagens digitalizadas dos géis de fungos gerados a partir da DGGE demonstraram que a área revegetada mais antiga de 1989 apresentou um maior número de bandas em relação às áreas revegetadas de 2001 e 2009. A área revegetada em 1989 foi mais similar às áreas naturais, de acordo com o número das bandas. Esse fato indica o restabelecimento da

micobiota na área revegetada em 1989, quando associado esse resultado aos resultados da análise de ergosterol.

Segundo Hahn e Quideau (2013) a composição microbiana nas áreas revegetadas mais antigas tendem a ficar mais semelhante com as encontradas nas áreas naturais. Entretanto, de acordo com Jangid et al. (2010) e Huang et al. (2011), dependendo das condições e do uso do solo, a comunidade de solos restaurados pode nunca ser semelhante à comunidade microbiana encontrada em solos naturais, mesmo que essas comunidades microbianas se estabilizem.

Fazendo uma comparação entre os três anos de coletas (2009, 2010 e 2011) o maior número de bandas foi detectado na coleta de 2009, onde foi observado um aumento maior de bandas, 39 bandas detectadas no período seco para 255 detectadas no período chuvoso. Segundo a AESA (Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba), os dados pluviométricos mostraram que no ano de 2009 a quantidade de chuva foi maior em relação o ano de 2010, isso pode explicar o maior número de bandas detectadas no ano de coleta de 2009. Na coleta de 2009 no período seco, a área de 2009 foi comparada com as áreas naturais, em relação ao número de bandas, por se tratar de uma duna nativa que seria explorada em breve, no entanto, no período chuvoso de 2009, essa área passou de duna nativa para duna reconstituída, e o número de bandas comparado ao das áreas naturais foi menor. Nas coletas de 2010 e 2011 o número de bandas no período chuvoso foi maior que no período seco. As amostras das áreas revegetadas de 2001 e 2009 exibiram menor números de bandas em relação às áreas naturais, e a área de revegetação de 1989 se assemelha com essas áreas nativas. De acordo com Escobar (2013) a revegetação em áreas mineradas ocasiona a recuperação das propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos em dunas litorâneas de extração de ilmenita, rutilo e zirconita, porém, os melhoramentos nas áreas de revegetação são distinguidos de acordo com as propriedades do solo avaliadas e do tempo de recuperação das dunas.

Souto et al. (2008) estudando a redução do conteúdo de água no solo, observou que no período seco a população de fungos diminuiu e no período chuvoso da população de fungos era favorecida. Esse fato indica que a umidade do solo regula as flutuações da população de fungos, uma vez que os extremos limitam o desenvolvimento dos micro-organismos.

De acordo com Rogers e Tate (2001) o tempo de revegetação das áreas e as estratégias de recuperação são fatores importantes, uma vez que afetam a estrutura e o funcionamento da comunidade microbiana, responsáveis por intermediar eventos importantes como a ciclagem de carbono, nitrogênio e fósforo.

Os resultados do DGGE de fungos confirmam as análises do Ergosterol, em que na área de revegetação mais antiga foi detectado um maior número de bandas no DGGE e uma maior concentração de ergosterol, e que essa área encontra-se, de acordo com o número de bandas e as concentrações de ergosterol, semelhante às áreas naturais analisadas. Esse fato confirma que o tempo de revegetação favorece o restabelecimento da microbiota, aliados a fatores como a disponibilidade de água, nutrientes, temperatura e propriedades do solo.

Vários estudos de comunidades de fungos do solo associam diferentes técnicas moleculares para a obtenção de uma visão mais detalhada das espécies presentes no ambiente e das relações ecológicas desempenhadas por eles. É o caso de estudos conduzidos por He et al. (2005) que utilizaram técnicas de *fingerprinting* TGGE e SSCP associadas clonagem e sequenciamento de genes 18S rDNA para comparar comunidades de fungos em solos de florestas naturais com solos de plantação de pinheiro. Além de Malosso et al. (2006) que utilizaram técnicas moleculares de *fingerprinting* (DGGE e ARDRA), clonagem e sequenciamento para avaliar a diversidade de fungos em solos marítimos da Antártida.

O uso de perfis de DGGE tem sido revelado como uma ferramenta poderosa para avaliar as diferenças entre as estruturas das comunidades do solo, além de ser uma abordagem adequada em análises para comparação de membros dominantes das comunidades microbianas (PEIXOTO et al., 2006), assim como para análise de solo revegetado comparando com áreas naturais.

Estrutura da comunidade de bactérias avaliada por PCR-DGGE

O perfil dos fragmentos de DNA no gel de DGGE referente a comunidade de bactérias, apresentou menor diversidade quando comparado ao perfil de fungos. A análise de bandas e o agrupamento dos perfis nos períodos secos de 2010 e 2011 mostraram que não houve diferenças entre os grupos. A menor concentração de água no período seco, provavelmente, influenciou a baixa diversidade da comunidade de bactérias.

A falta de variabilidade genética detectada durante a seca pode indicar que neste período a comunidade bacteriana diminui, ficando abaixo do limite de detecção da técnica de PCR-DGGE, porém, quando há água disponível, a comunidade retoma sua atividade e aumenta em número, sendo possível detectar as diferenças na composição e diversidade entre as áreas amostradas.

O maior número de bandas na população bacteriana foi observado no período chuvoso em todas as áreas estudadas nos três anos de coleta (2010, 2011 e 2012). A disponibilidade de

água foi o fator principal para a análise da comunidade, pois no período seco as amostras das áreas analisadas (R1989, R2001, R2009, MCI, MCII e RA) apresentaram uma baixa diversidade, ou seja, menor número de perfis de fragmentos de DNA de PCR-DGGE, enquanto no período chuvoso foi verificada uma maior diversidade, ou aumento do número de perfis, devido a maior disponibilidade de água. A exposição da comunidade microbiana a vários ciclos de seca e chuva pode mudar comunidades do solo, diminuindo a diversidade funcional (SCHIMEL; BALSER; WALLENSTEIN, 2007).

Em áreas mineradas, que passaram por processo de devastação vegetal e com isso favorecem a exposição direta do solo ao sol, ventos e chuvas, acaba deixando o solo com baixos níveis de fertilidade, principalmente nas áreas de revegetação mais recente. A comunidade microbiana nestes solos é dependente da precipitação de chuva e de sua distribuição para a produção de biomassa. Com isso, além do fator da disponibilidade de água, que pode ter interferido no desenvolvimento da comunidade bacteriana, o crescimento micelial dos fungos também pode ter participado na inibição da comunidade bacteriana, pois este é mais efetivo que o de bactérias, podendo explorar melhor os substratos e muitos fungos apresentam efeitos antagônicos sobre outros micro-organismos. Isso pode ter sido um dos fatores limitantes para a redução da diversidade bacteriana nesses solos (KUNIEGA-ALONSO; ALFENAS; MAFFIA, 2005; MEIDUTE; DEMOLING; BÁÁTH., 2005).

Outra observação que pode ser realizada pela análise da comunidade bacteriana por DGGE foi o efeito de micro-habitat, pois muitas amostras de uma mesma área se comportaram como amostras independentes e, eventualmente, amostras de áreas diferentes se agruparam com alta similaridade.

Apesar de não terem analisado a comunidade bacteriana do solo por DGGE, Sales et al. (2008) estudaram a quantidade de UFC de bactérias em diferentes períodos sazonais e comprovaram que a pluviosidade tem participação fundamental no desenvolvimento bacteriano no solo, provavelmente por gerar um micro-ambiente favorável a esses micro-organismos. Neste sentido, Kennedy e Gewin (1997) dizem que condições ideais de temperatura, umidade e natureza do material em decomposição favorecem o desenvolvimento de bactérias, induzindo a dominância deste tipo microbiano. No entanto, no período seco com baixa umidade do solo há uma diminuição da população de bactérias, como também pudemos observar.

Outros fatores, além da disponibilidade de água, podem ter contribuído para essa redução da diversidade. Diversos estudos relatam as limitações relacionadas à extração de DNA a partir do solo, principalmente a co-extração de compostos contaminantes como ácidos

húmicos, polissacarídeos e tanino que podem precipitar com o DNA e RNA e prejudicar a extração e amplificação do DNA. Miller et al. (1999) verificaram que a complexidade do solo e fatores múltiplos podem afetar o desempenho de um método durante a extração de DNA, resultando assim diferentes rendimentos a partir da mesma técnica.

Durante a amplificação do DNA por PCR, várias amostras não amplificaram, mesmo após repetidas tentativas de extração do DNA. Isso indica que além da condição hídrica do solo ter sido limitante para a atividade microbiana, a composição do solo pode ter interferido nas análises, pois o solo rico em ferro, cobre, zinco, magnésio e potássio pode ter interferido na PCR.

O padrão de bandas verificados nos géis de DGGE de bactérias se mostrou semelhante em todas as amostras analisadas, mesmo sendo detectado um número maior de bandas no período chuvoso e menor no período seco, a quantidade de bandas foi pequena. Lambais et al. (2005) afirmam que mesmo que o padrão de bandas permaneça o mesmo, não é possível descartar que existam diferenças entre as amostras estudadas, porém é necessário o emprego de outras técnicas para detectá-las.

Zak et al. (1994) afirmam que as alterações que ocorrem na composição das comunidades de bactérias são acompanhadas por variações em suas características funcionais. O perfil metabólico é consequência dos efeitos ambientais, das interações ecológicas entre as diferentes comunidades e da diversidade genética presente no solo. A comunidade de bactéria dos solos analisados nesse estudo pode ter se adaptado às condições do ambiente e, dessa forma, ter atingido um novo equilíbrio com baixa diversidade tanto nas áreas revegetadas quanto nas áreas naturais.

Quando o ambiente do solo sofre alguma alteração (ação antrópica), a composição da comunidade microbiana será modificada por organismos mais adaptados às novas condições, bem como por adaptações evolutivas dos organismos pré-existentes (BALSER; KINZIG; FIRESTONE, 2002).

Os resultados das análises por DGGE para bactérias pode não ter sido suficiente para caracterização dos solos estudados, porém, a utilização conjunta desta com outras técnicas possibilite um melhor resultado sobre a diversidade de bactérias em solos minerados.

Biomassa de fungos nos solos naturais e nos solos de cobertura de áreas mineradas

Em todos os anos de coleta, nos períodos de chuva foi detectado um aumento da concentração do conteúdo de ergosterol. O ano de coleta de 2012 foi o que apresentou maior

concentração de ergosterol em todas as áreas, além disso, foi possível perceber concentrações instáveis de ergosterol (o conteúdo de ergosterol aumentou, depois diminuiu e voltou a aumentar), nas áreas naturais (Mata Controle I e Restinga Arbustiva) e na área revegetada em 1989, indicando que a área com mais tempo de revegetação apresenta comportamento semelhante ao dessas áreas naturais.

O tempo de revegetação da área afeta a estrutura e o funcionamento da comunidade microbiana. Com o aumento da idade de recuperação das áreas, a composição da comunidade microbiana se torna mais semelhante à encontrada nas áreas naturais. Porém, a recuperação das propriedades do funcionamento microbiano não acontece rapidamente. Esse é um processo lento que, especialmente em áreas que sofreram impactos por mineração, a recuperação vai depender das condições ambientais e do ecossistema em processo de revegetação (HAHN; QUIDEAU, 2013).

A disponibilidade de água foi o principal fator que contribuiu para o aumento da biomassa de fungos nos solos analisados. Quando havia limitação de água, em decorrência do período seco, houve em todas as áreas estudadas uma baixa na concentração de ergosterol. Esse fato está de acordo com a necessidade dos fungos em requerer umidade para o seu desenvolvimento e proliferação, e que pode ser evidenciado pelas altas concentrações de ergosterol no solo no período chuvoso. Os regimes de umidade do solo têm sido relatados como provável regulador na dinâmica temporal de diferentes atividades biológicas em diferentes condições de vegetação e processos de recuperação do solo (BALDRIAN *et al.*, 2010; CLAASSENS *et al.*, 2012; CRIQUET *et al.*, 2004). Além disso, a biomassa de fungos pode variar também com a fase do crescimento fúngico e entre as espécies, além dos nutrientes disponíveis (MONTGOMERY *et al.*, 2000; RUZICKA *et al.*, 2000; SEITZ *et al.*, 1979).

Foi verificado que os processos de recuperação são diferenciados em função do tempo de revegetação das dunas. A área com mais tempo de revegetação (1989) apresentou níveis de concentrações de ergosterol semelhantes aos das áreas naturais, em comparação com as dunas de revegetação mais recentes. Em estudo realizado por Escobar (2013) nas mesmas áreas foi mostrado que as áreas de revegetação mais recentes de 2001 e 2009 apresentaram um maior gasto de energia, que segundo Carneiro *et al.* (2008) é um indicativo do estresse provocado pela mineração e que para manter a comunidade microbiana há a necessidade de um gasto maior de energia, enquanto que na área revegetada de 1989 foi evidenciado um menor gasto de energia, que é característico de ecossistemas maduros e mais estáveis. Esse fato indica a

estabilidade nessa área e comprova que nessa duna mais antiga o funcionamento microbiano está ficando semelhante às áreas naturais.

Nas áreas naturais de Mata Controle e Restinga Arbustiva foi observado, no período seco em que a falta de umidade dificulta o crescimento microbiano, uma concentração de ergosterol maior em relação às outras áreas, o que pode indicar uma maior estabilidade da comunidade de fungos nessas áreas. Nas áreas naturais também foi observada menor variação entre os períodos de seca e chuva, em relação às demais áreas revegetadas, o que indica maior estabilidade destas comunidades comparadas às das áreas revegetadas, possivelmente pelo maior desenvolvimento da comunidade vegetal nas áreas naturais. Todas as áreas, no período seco da coleta de 2010, apresentaram pouca ou nenhuma concentração de ergosterol no solo. Na área revegetada em 2009, nos três anos de coleta, não foi detectado ergosterol no solo no período seco, talvez por se tratar de uma área de desmatamento recente em que o solo, com pouca cobertura vegetal, sofre uma influência maior nos períodos de seca. Comunidades microbianas amostradas de solos naturais apresentam mais resistência às mudanças ambientais quando comparadas às de solo em processo de revegetação, esse fato está relacionado a um sistema complexo e indireto de interações que acontecem entre o solo e as plantas (HAHN; QUIDEAU, 2013).

As concentrações de ergosterol do solo analisado nesta pesquisa, quando comparadas a outros estudos foram baixas, talvez pelo fato em se tratar de um solo de mineração em que houve perda de matéria orgânica e de nutrientes nas áreas revegetadas e que se encontra em processo de recuperação. Salamanca; Raubuch; Joergensen (2002) relatam que quando há concentrações baixas de ergosterol na biomassa (representando os fungos) é muito provável que esta biomassa do solo seja dominada por bactérias. Porém, a relação do conteúdo de ergosterol e a biomassa de fungos pode ser influenciada pelo metabolismo da comunidade de fungos e composição das espécies (GESSNER; NEWELL, 2002; STAHL; PARKINS, 1996).

Estudos feitos por Pasanen et al. (1999) afirmaram que o conteúdo de ergosterol para culturas microbianas de 6 fungos filamentosos, 3 espécies de leveduras e um actinomiceto, indicou mais correlação entre o conteúdo de ergosterol e os fungos filamentosos do que ergosterol com fungos viáveis totais incluindo leveduras, sustentando a alegação de que o ergosterol é um bom indicador de biomassa de fungos, particularmente para os fungos filamentosos. Bermingham; Dewey; Maltby (1995) ao estudar espécies de fungos aquáticos, perceberam que o conteúdo de ergosterol variava entre as espécies e também com a idade do micélio.

6 CONCLUSÕES

O uso do solo de cobertura de uma área onde será aberta nova lavra para completar o processo de reconstrução de uma duna que acabou de ser minerada promove a recuperação mais rápida da microbiota, embora o tempo decorrido desde o início da revegetação seja importante para que o funcionamento e a estrutura da comunidade microbiana sejam restabelecidos.

O aumento e a redução da biomassa microbiana são influenciados pelo regime de seca e chuva do local. O conteúdo reduzido de água no solo no período seco foi um dos principais fatores que contribuiu para a baixa diversidade de bactérias.

A biomassa de fungos foi um indicador eficiente da recuperação da microbiota em função do tempo de revegetação.

A análise molecular por DGGE foi eficaz para mostrar a recuperação da microbiota em função do tempo de revegetação das dunas, evidenciando não só as mudanças na estrutura da comunidade como também o aumento do número de bandas (UTO) detectadas.

As análises indicam que o método de revegetação empregado está sendo eficiente na recuperação do solo.

REFERÊNCIAS

- ABUA, M. A.; EDET, E. O. Morphological and physico-chemical characteristics of coastal plain soils of southern Cross River State-Nigeria. **The Nigerian Journal of Geography and Environment**, 5(1), 109-114, 2007.
- AKARSUBASI et al. Effect of wastewater composition on archaeal population diversity. **Water Research**, v.39, p.1576-1584, 2005.
- ALMEIDA, M. E., SERAFIM, R. C., EÇA, L. P. M. Apresentação de algumas técnicas utilizadas na biologia molecular. In: EÇA, L. P. (Eds.). 2004. **Biologia Molecular: guia prático e didático**. Revinter: Rio de Janeiro. 2004.
- ALMEIDA, R.O.P.O.; SÁNCHEZ, L.E. Revegetação de áreas de mineração: critérios de monitoramento e avaliação do desempenho. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.1, p.47-54, 2, 2005.
- ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. **Tropical Soil Biology and Fertility: A handbook of methods**. Wallingford, CAB International. 1993.
- ANDERSON, P., DAVIDSON, C. M., LITTLEJOHN, D. Extraction of ergosterol from peaty soils and determination by high performance liquid chromatography. **Talanta, Amsterdam**, v. 41, n. 5, p. 711-720, 1994.
- ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology** 6: 769-779, 2004.
- AQUINO, A. M. DE., OLIVEIRA, A. M. G., LOUREIRO, D. C. Integrando Compostagem e Vermicompostagem na Reciclagem de Resíduos Orgânicos Domésticos. Circular Técnica n. 12, **Embrapa Agrobiologia**, 4 p. 2005.
- ARAÚJO, A. S. F., MONTEIRO, R. T. R., CARVALHO, E. M. S. Effect of composted textile sludge on growth, nodulation and nitrogen fixation of soybean and cowpea. **Bioresource Technology, Londres**, v. 97, p. 1028-1032, 2007.
- ARNEZEDER, C.; W. A. HAMPEL. Influence of growth rate on the accumulation of ergosterol in yeast-cells in phosphate limited continuous culture. **Biotechnol. Lett.** 13, p. 97-100, 1991.
- ATKINS, S. D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, 45(1): 3-15. 2004.
- BALDRIAN et al. Small-scale distribution of extracellular enzymes, fungal, and bacterial biomass in *Quercus petraea* forest topsoil. **Biology Fertility of Soils** 46: 717-726, 2010.
- BALOTA et al. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, p. 641-650, 1998.

BARROS et al. Soil physical properties of high mountain fields under bauxite mining. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.37, n.5, p.419-426, 2013.

BALSER, T.C., KINZIG, A.P., FIRESTONE, M.K. **Linking soil microbial communities and ecosystem functioning**. In: KINZIG, A.P., PACALA, S.W., TILMAN, D. (Ed.). *The functional consequences of biodiversity: empirical progress and theoretical extensions*. Princeton: Princeton University, p.265-293.2002.

BARTH, R. C. Avaliação da recuperação de áreas mineradas no Brasil. **Viçosa: UFV**, 41 p. (Boletim Técnico SIF, 1).1989.

BÉCARD et al. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. **Canadian Journal of Botany** 82:1186-1197, 2004.

BENTZ, B.J., SIX, D.L. Ergosterol content of fungi associated with *Dendroctonus ponderosae* and *Dendroctonus fufipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) **Ann Entomol Soc Am.**99:189–194,2006.

BERMINGHAM, S.L.; DEWEY, F.M., MALTBY, L. A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. **Mycol Res** 99:479–484, 1995.

BEVER, J.D. Soil community feedback and the coexistence of competitors: conceptual frameworks and empirical tests. **New Phytologist**157:465-473, 2003.

BOLHUIS, H.; FILLINGER, L.; STAL, L.J. Coastal Microbial Mat Diversity along a Natural Salinity Gradient. **PLoS ONE**, v.8, n.5: e63166.2013.

BOT, A.; BENITES, J. The importance of soil organic matter, Key to drought-resistant soil and sustained food production. **FAO Soils Bulletin**, 80p. 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 2009. COELHO, M. C. N. **Impactos ambientais em áreas urbanas – teorias, conceitos e métodos de pesquisa**. In: Guerra, A. T.; Cunha, S. B. (Orgs.). *Impactos ambientais urbanos no Brasil*. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2004. p. 19 – 45.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil, London**, v.232, p.147-154,2001.

BRODIE, E., EDWARDS, S., CLIPSON, N. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**. Amsterdam, v.45, p.105-114, 2003.

CARNEIRO et al. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossquências de reabilitação após a mineração de bauxita. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:621-632, 2008.

CARNEIRO et al. Doses de fósforo e inoculação micorrízica no cultivo de estilosantes em solo sob condições naturais. **Archivos de Zootecnia**, v.59 (227), p. 415-426, 2010.

CARVALHO, D.A.; OLIVEIRA-FILHO, A.T. Avaliação da recomposição da cobertura vegetal de dunas de rejeito de mineração, em Mataraca/PB. **Acta Botanica Brasilica** 7 (2):107-117.1993.

CAVALCANTE et al. Diferentes ambientes e substratos na formação de mudas de araticum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 01, p. 235-240,2008.

CLAASSENS et al. A Comparison of microbial community function and structure in rehabilitated asbestos and coal discard sites. **Water, Air and Soil Pollution** 223 (3): 1091-1100, 2012.

COOKE, J.A.; JOHNSON, M.S. Ecological restoration of land with particular reference to the mining of metals and industrial minerals: A review of theory and practice. **Environ. Rev.** 10: 41–71, 2002.

COPLEY, J. Ecology goes underground. **Nature**, v.406, p.452-454.2000.

CRIQUET et al. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. **Soil Biol Biochem**, 36, p. 1111-1118,2004.

CRISTAL-MINA DA PARAÍBA. **Millennium Inorganic Chemicals Mineração**. 2009. Disponível em: <http://www.cristal.com/about-us/Documents/Paraiba._6_15.pdf>. Acessado em: 13 jun. 2013.

CUNHA et al. Análise multivariada da vegetação como ferramenta para avaliar a reabilitação de dunas litorâneas mineradas em Mataraca, Paraíba, Brasil. **R. Árvore**,Viçosa-MG, v.27, n.4, p.503-515, 2003.

DEACON, J. W. Structure and ultrastructure: modern mycology. **Cambridge**: [s.n.], 35 p. 1998.

DE SOUZA et al. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity in an arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.1413-1424, 2004.

DIEZ et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p.2942-2951, 2001.

DJAJAKIRANA, G., JOERGENSEN, R.G., MEYER, B. Ergosterol and microbial biomass relationship in soil. **Biol.Fertil.Soils** 22, 299–304, 1996.

DOMINGUES, A.F., BOSON, P.H.G., ALÍPAZ, S. **A gestão dos recursos hídricos e a mineração. IBRAM.** 2006. Disponível em:<http://www.em.ufop.br/ceamb/petamb/cariboost_files/gestao_20da_20agua_20na_20min eracao_20ibram.pdf>. Acesso em: 12 junho 2013.

EDWARDS et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Res**, v.17, p.7843–7853, 1989.

ESCOBAR, I.H.C. **Recuperação do solo em cronosequência de revegetação de dunas litorâneas mineradas no nordeste do Brasil**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. 14.03.2013.

FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. **Cell**. 16(1): 191-200, 1979.

FREIRE, M.S.B. Levantamento florístico do Parque Estadual das Dunas de Natal. **Acta Botanica Brasilica**. v. 4, n. 2 (Supl.), p. 41-59, 1990.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, 3:12-16, 2000.

GAMS, W. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and Conservation**, London, v.16, p.69-70, 2007.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAM ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annu Rev Phytopathol** 42, 243-270, 2004.

GEJMAN et al. The sensitivity of denaturing gradient gel electrophoresis: a blinded analysis. **Mutat. Res. Gen.** 382: 109-114, 1998.

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

GESSNER, M.O; NEWELL, S.Y. Biomass, growth rate, and production of filamentous fungi in plant litter. In: Hurst CJ, Crawford RL, McInerney M, Stetzenbach L, Knudsen G (eds) Manual of environmental microbiology, 2nd edn. **ASM Press**, Washington, DC, p 390-408, 2002.

GIL-SOTRES et al. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical parameters. **Soil Biol Biochem**, 37:877-87, 2005.

GOMES et al. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 3758-3766, 2003.

GOMES et al. Análise de componentes principais de atributos físicos, químicos e mineralógicos do bioma cerrado. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p.137-153, 2004.

GOMES, A.R.; LIMA, H.M. de; FLÔRES, J.C. do C. Análise do plano de fechamento de mina no plano de aproveitamento econômico de uma jazida - uma exigência da NRM-20. **REM: R. Esc. Minas**, Ouro Preto, 63(4): 685-690, 2010.

GOULSTON, G.; MERCER, E. I. Ergosta-5,7,24 (28)-Trien-3y^o-ol, a new intermediate in Ergosterol biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus*. **Phytochemistry**, 8, 1945-1948, 1969.

GRAYSTON et al. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biol. Biochem.** 33, p. 533-551, 2001.

GRIFFITHS et al. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and RNA-Based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology** 66, 5488-5491, 2000.

GUILHERME et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em Ciências do Solo**, v. 4, p. 345-390, 2005.

GUSMÃO, L.F.P.; MARQUES, M.F.O. Diversidade de Fungos no Semi-Árido Brasileiro. In: QUEIROZ, L.P. DE, RAPINI, A., GIULIETTI, A.M. (Eds.). 2006. **Rumo ao Amplo Conhecimento da Biodiversidade do Semi-Árido Brasileiro**. 2006.

GURTLER, V.; GARRIE, H.D.; MAYALL, B.C. Denaturing gradient gel electrophoretic multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates. **Electrophoresis**, v.23, p.3310-3320, 2002.

HAHN, A.S.; QUIDEAU, S.A. Long-term effects of organic amendments on the recovery of plant and soil microbial communities following disturbance in the Canadian boreal forest. **Plant and Soil** 363: 331-344, 2013.

HART, M.R.; BROOKES, P.C. Effects of two ergosterol-inhibiting fungicides on soil ergosterol and microbial biomass. **Soil Biol Biochem.** 28:885–892, 1996.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research** 105: 1422–1432, 2001.

HE, J. Z.; XU, Z.; HUGHES, J. Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 247, n. 12, p. 91-100, 2005.

HIRSCH, P.R.; MAUCLINE, T.H.; CLARK, I.M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.42, p.878-887, 2010.

HOORMAN, J.J.; ISLAM, R. Understanding soil microbes and nutrient recycling. **Actinomycetes** 107:40–500, 2010.

HOSHINO, Y.T.; MORIMOTO, S. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Science and Plant Nutrition** 54, p.701-710, 2008.

HOUSTON, A.P.C.; VISSER, S.; LAUTERNISCHLAGER, R.A. Microbial process and fungal community structure in soils from clear-cut and unharvested areas of two mixedwood forests. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.78, p.630-640, 1998.

HUANG, B. H.; YUNG, K. H.; CHANG, S. T. The sterol composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms. **Mycologia** 77, p.959-96, 1985.

HUANG et al. Changes in microbial-community structure with depth and time in a chronosequence of restored grassland soils on the Loess Plateau in northwest China. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174: 765-774. Islam, K.R., Weil, R.R. 2000. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. ***Agriculture, Ecosystems and Environment*** 79: 9-16, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília: 95 p, 1990.

JANGID et al. Development of soil microbial communities during tallgrass prairie restoration. ***Soil Biology and Biochemistry*** 42: 302-312, 2010.

JOLY, A. B. **Conheça a vegetação brasileira**. São Paulo: USP.1970.

KENNEDY, A. C.; V. L. GEWIN, Soil microbial diversity: present and future considerations. ***Soil Science***, 162(9):607-617, 1997.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. ***Agriculture, Ecosystems and Environment***, v.74, p.65-76, 1999.

KENNEDY, N.; CLIPSON, N. Fingerprinting the fungal community. ***Mycologist*** 17: 158-164,2003.

KIBBLEWHITE, M.G.; RITZ, K.; SWIFT, M.J. Soil health in agricultural systems.***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci***. 363(1492): 685–701,2008.

KLAMT, E.; REINERT, D.J. Ciência do solo: Evolução do conhecimento. In: **Elementos da ciência do solo**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 01-12,2003.

KLEPKA et al. Combined XRD, EPMA and X-ray absorption study of mineral ilmenite used in pigments production. ***Journal of Alloys and Compounds***, 401(1): 281-288, 2005.

KOCHARIN et al. Engineering of acetyl-CoA metabolism for the improved production in *Saccharomyces cerevisiae*. ***AMB Express***, n.2, v.52, p.1-11, 2012.

KUHLMANN, E. Vegetação. In: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Geografia do Brasil**, região Nordeste. Rio de Janeiro, p. 85-110, 1977.

KUMAH, A. Sustainability and gold mining in the developing world. ***Journal of Cleaner Production***.14(3-4): 315-323, 2006.

KUNIEGA-ALONSO, S.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. ***Fitopatologia Brasileira***, Brasília, v. 30, n. 2, p. 164-168, 2005.

LAMBAIS et al. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P., ALLEONI, L.R.F., COOPER, M., SILVA, A.P., CARDOSO, E.J. (Eds.). 2005. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v.4, p.43-84,2005.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Estimativas de biodiversidade brasileira. In: LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I.(Eds.). 2002. **Biodiversidade Brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. Contexto Acadêmica, SãoPaulo, 92p.,2002.

LIM et al. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. **Journal of Microbiology**, Seoul, v.48, n.3, p.284-289, 2010.

LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In: Novais et al. (Eds). Fertilidade do solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa-MG, p. 1-64,2007.

LOUREIRO, D. C., AQUINO, A. M., ZONTA, E. Compostagem e vermicompostagem de resíduos domiciliares com esterco bovino para a produção de insumo orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1043-1048, 2007.

MAIA, L.C., SILVEIRA, N.S.S., CAVALCANTE, U.M.T. Interaction between arbuscular fungi and root pathogens. In: RAI, M.K. Handbook of Microbial Biofertilizers. New York. **Haworth Press**. p. 325–351,2005.

MALOSSO, E. Effects of Plant Amendment on Microbial Community Structure and Fungal Biomass in Antarctic Soils.(Tese – School of Biology – Centre for Molecular Ecology).The University of Newcastle upon Tyne. **Newcastle upon Tyne**, United Kingdom, 2006.

MALOSSO et al. Fungal diversity in maritime Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques. **Polar Biol**, n.29, p.552–561, 2006.

MARIN et al. **Eletroforese**. Santa Maria, RS. 2009. Disponível em: <w3.ufsm.br/piquini/biomol09/eletroforese.doc>. Acessado em: 12 jun. 2013.

MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; HILBERT, J. L. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, n. 9, p. 1059-1064, 1990.

MEIDUTE, S., DEMOLING, F., BÁÁTH, E. Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, n.9, p.2334-2343,2005.

MELLONI, R; MELLONI, E.G.P.; ALVARENGA, M.I.N. Indicadores da qualidade do solo. **Informe Agropecuário**, 29: 17-29.2008.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D.A. **A ciência do DNA**.2ª.ed. Port Alegre: Artmed,2005.

MILLER, H.G. The influence of stand development on nutrient demand, growth and allocation. *Plant Soil*, v.168/169, p.225-232,1995.

MILLER et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. **Appl Environ Microbiol** 65, 4715–4724, 1999.

MIRANDA, R. U. **Vegetação e banco de sementes em dunas de rejeito de mineração de ilmenita, no litoral norte do estado da Paraíba.** 71 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.

MONTGOMERY et al. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol. **Soil Biology and Biochem.** 32: 1207-1217, 2000

MORAES et al. Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado. **Arq. Inst. Biol.** 70: 483-489, 2003.

MUELLER, G.; SCHMIT, J.P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation.** 16(1):1-5, 2007.

MUNIZ, D.H. DE F.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. **Universitas: Ciências da Saúde,** v.4., n.1/2, p.83-100, 2006.

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. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, p.695-700.1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek,** v.73, p.127-141, 1998.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology,** v.2, p.317-322, 1999.

MYERS et al. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research,** v.13, p. 3111-3130.1985.

NAKATSUA, C.H., TORSVIK, V., OVREAS, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 64:1382–1388.2000.

NANNIPIERI et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science** 54: 655-670, 2003.

NEWELL, S. Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. **Appl Environ Microbiol** 60, 3479–3482, 1994.

NYLUND, J.E.; WALLANDER, H. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK, editors. **Methods in Microbiology** 24. Tokyo: **Academic Press;** p. 77–88, 1992.

OADES J. M.; WATERS A. G. Aggregate hierarchy in soils. **Aust. J. Soil Res.** 29:815–828, 1991.

O'BRIEN et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.9, p.5544-5550, 2005.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; CARVALHO, D.A. Florística e fisionomia da vegetação no extremo norte do litoral da Paraíba. **Revista Brasileira de Botânica**, v.16, p.115-130,1993.

OLIVEIRA et al. O papel da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones no desenvolvimento de espécies vegetais nativas em área de dunas de restinga revegetadas no litoral do Estado da Paraíba. **Rev. bras. Bot.**, v.32, n.4, p.663-670,2009.

ONTL, T. A.;SCHULTE, L. A. Soil Carbon Storage. **Nature Education Knowledge** 3(10):35, 2012.

OPIK et al. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. **New Phytologist**, v.160, p.581-593, 2003.

PASANEN et al. Can microbial volatile metabolites cause irritation at indoor air concentrations? Pp 60-65 in (Johanning. ed.) **Bioaerosols, fungi and mycotoxins: health effects, assessment, prevention, and control**. ©Eastern New York Occupation and Environmental Health Center, Albany, NY, 1999.

PAVINATO, P. S.; ROSOLEM, C. A. Disponibilidade de nutrientes no solo - decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n.3, p. 911-920,2008.

PEIXOTO et al. Soil aggregation and bacterial community structure as affected by tillage and cover cropping in the Brazilian cerrados. **Soil and Tillage Research**, v.90, p.16-28, 2006.

PEÑA et al. Respiração microbiana como indicadores da qualidade do solo em ecossistema florestal. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 1, p. 117-126, 2005.

RANJARD, L., POLLY, F., NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research Microbiology**, v.51, p.167-177,2000.

RANJARD et al. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting of fungal and bacterial communities. **Environ Microbiol** 5: 1111-1120, 2003.

RITZ et al. Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. **Ecological Indicators** 9,1212-1221,2009.

ROGERS, B.F.; TATE, R.L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. **Soil Biology and Biochemistry** 33: 1389-1401, 2001.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. **Exeter Software**, New York, 98p, 2000.

RÖMBKE et al. Legislation and ecological quality assessment of soil: implementation of ecological indicator systems in Europe. **Ecotoxicol Environ Saf**; 62:201-10, 2005.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: **Genética e melhoramento de microrganismos**. Mello, I.S. (ed). EdUSP, São Paulo, pp.97-129,2002.

RUZICKA et al. The Utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 989-1005, 2000.

SALAMANCA, E. F., RAUBUCH, M., JOERGENSEN, R.G. Relationships between soil microbial indices in secondary tropical Forest soils. **Applied Soil Ecology**, v. 21, p. 211-219, 2002.

SALES et al. Diversidade de bactérias de solo em clareiras e floresta nativa provenientes de áreas de terra firme alteradas pela exploração de petróleo. In: Seminário de iniciação científica da Embrapa Amazônia Oriental, 12, 2008, Belém. Anais. **Belém: Embrapa**. 2008.

SANTOS, M. **Avaliação da recomposição da cobertura vegetal de dunas em recuperação e sua interrelação com as propriedades físicas, químicas, bioquímicas e microbiológicas do solo**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

SANTOS et al. Correlações entre variáveis do solo e espécies herbáceo-arbustivas de dunas em revegetação no litoral norte da Paraíba. **CERNE** 6 (1): 019-029, 2000.

SANZ, J.L.; KOCHLING, T. Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. **Process Biochemistry** 42, 119-133, 2007.

SCARANO, F. R. Structure, function and floristic relationships of plants communities in stressful habitats marginal to Brazilian Atlantic Rainforest. **Annals of Botany**, v.90, p.517-524, 2002.

SCHIEDECK, G., GONÇALVES, M. DE M., SCHWENGBER, J.E. Minhocultura e produção de húmus para a agricultura familiar. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, (Circular Técnica 57). 2006.

SCHIMEL, J. P., BALSER, T. C., WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386–1394, 2007.

SCHLOTTER, M., DILLY, O., MUNCH, J.C. Indicators for evaluating soil quality. Agriculture, **Ecosystems and Environment** 98, 255-262, 2003.

SCHNURER, J. Comparison of methods for estimating the biomass of three foodborne fungi with different growth patterns. **Appl. Environ. Microbiol.** 59, 552-555, 1993.

SCHOR, N., BOIM, M. A., SANTOS, O. F. P. dos. **Medicina celular e molecular: bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia.** v.1. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

SCHUELER, V., KUEMMERLE, T., SCHRÖDER, H. Impacts of Surface Gold Mining on Land use Systems in Western Ghana. **Ambio**, 40(5): 528-539, 2011.

SEITZ et al. Ergosterol production as an indicator of fungal invasion in grains, **Cereal Chem.** 54:1207-1217, 1977.

SEITZ et al. Ergosterol as a Measure of fungal growth. **Phytopathology, Saint Paul**, v. 69, n. 11, p. 1202-1203, 1979.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon, Berlin**, v.11, n.1, p.30-40, 1962.

SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: Esposito, E., Azevedo, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** 2ª ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.

SMIT et al. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rDNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology** 65, 2614-2621, 1999.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Fundamentos de Genética. 4.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

SORLIE et al. Mutation Screening of the TP53 Gene by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Methods Mol Biol** , 291:207-216, 2005.

SOUTO et al. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, vol. 32, no. 1, p. 151-160, 2008.

STATSOFT, STATISTIC 5.0. Oklahoma: Inc. Tulsa, 1995.

SOUZA et al. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and cattle manure in the establishment of *Tocoyena selloana* Schum. in mined dune areas. **European Journal of Soil Biology** 46:237-242, 2010.

SOUZA, F.A.; SILVA, E.R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: Siqueira, J.O. (Ed.) **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas.** Lavras. Universidade Federal de Lavras. p.255-290, 1996.

SOUZA, M. G. **Fechamento de Mina: Aspectos Legais.** 2002. Disponível em: <<http://www.brasilminingsite.com.br/artigos/artigo.php?cod=31&typ=1>>. Acessado em: 12 jun. 2013.

STAHL, P. D.; PARKINS, T. B. Relationship of soil ergosterol concentration and fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, p. 847-855, 1996.

STERFINGER, K. Fungi as geologic agents. **Geo microbiol. J.** 17, 97–124, 2000.

STÜRMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., Brussaard, L. (Eds). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford, CABI-Pub., p.206-236, 2006.

TZENEVA et al. 16S rRNA targeted DGGE fingerprinting of microbial communities. **Methods Mol Biol.**, n.410, p.335-49, 2008.

TROEH, F.R., HOBBS, J.A., DONAHUE, R.L. Soil and water conservation for productivity and environmental protection. **Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.** 1980.

VAINIO, E.J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research** 104, 927-936, 2000.

VAN ELSAS et al. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.43, p.133-151, 2000.

VIEIRA, G. D.; CASTILHOS, D.D.; CASTILHOS, R.M. V. Atributos microbianos do solo após a adição de lodo anaeróbio da estação de tratamento de efluentes de parboilização do arroz. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 35, p.543-550, 2011.

WALLANDER, H.; MASSICOTTE, H.B.; NYLUND, J.-E. Seasonal variation in protein, ergosterol and chitin in five morphotypes of *Pinus sylvestris* L. ectomycorrhizae in a mature Swedish forest. **Soil Biol. Biochem.** 29, 45-53, 1997.

WINDING, A.; HUND-RINKE, K.; RUTGERS, M. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 62, 230-248, 2005.

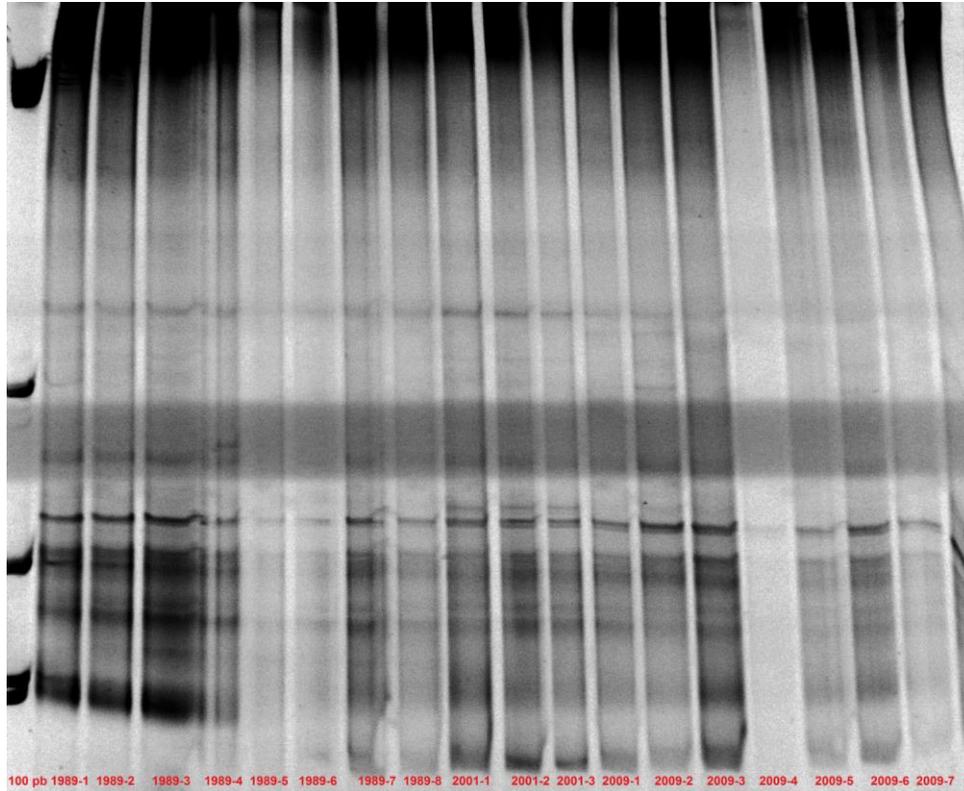
YAN, T.; YANG, L.; CAMPBELL, C.D. Microbial biomass and metabolic quotient of soils under different land use in the Three Gorges Reservoir area. **Geoderma** 115, 129-138, 2003.

ZAK et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biol. Biochem.** 26, 1101–1108, 1994.

ZEPPELINI et al. Collembola as bioindicators of restoration in mined sand dunes of Northeastern Brazil. **Biodiversity and Conservation** 18:1161–1170, 2009.

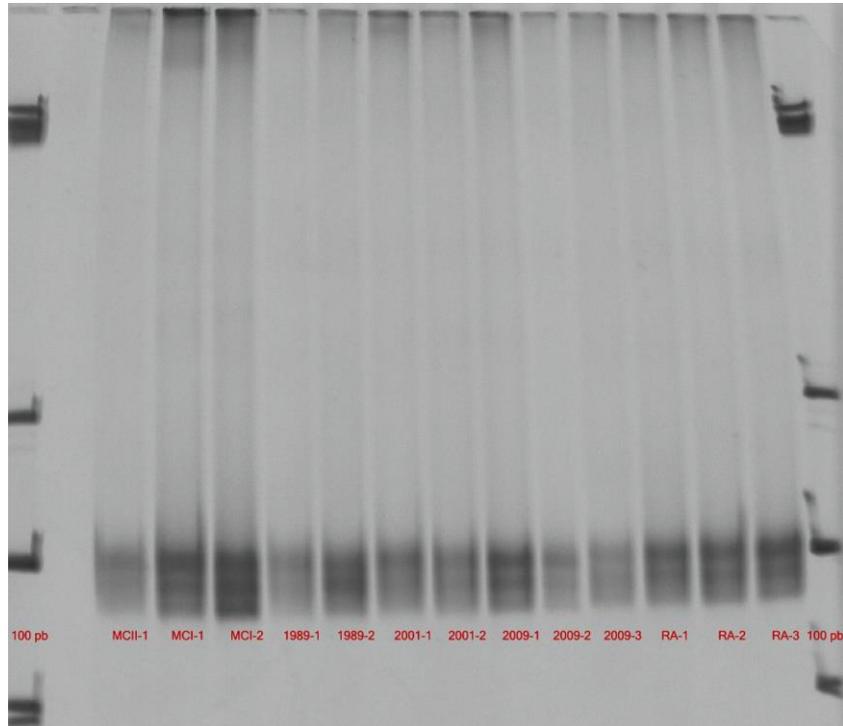
ZILLI et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

APÊNDICE A - PERFIL DOS FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DE FUNGOS DA REGIÃO DO rDNA SSU



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.

APÊNDICE B - PERFIL DOS FRAGMENTOS DE DNA DE PCR-DGGE DE BACTÉRIAS DA REGIÃO DO rDNA SSU



Fonte: Marcela Barbosa, 2013.