



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS – IG; INSTITUTO DE BIOLOGIA – IB;
INSTITUTO DE ECONOMIA – ECO; INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ; E
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL – CDS

**IMPACTO DE COBRE, ZINCO E NÍQUEL SOBRE
LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO E
REGIÕES DO ENTORNO DE SABARÁ - MG.**

VICTOR HUGO SILVA GUIMARÃES

BRASÍLIA, 2016

Victor Hugo Silva Guimarães

**IMPACTO DE COBRE, ZINCO E NÍQUEL SOBRE
LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁREAS DE MINERAÇÃO E
REGIÕES DO ENTORNO DE SABARÁ - MG.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Ambientais, da Universidade de Brasília, como requisito parcial a obtenção do título de Bacharel.

Orientador: Helson M.M. do Vale.

BRASÍLIA

2016

Agradecimentos

Agradeço a minha família de origem, aos meus irmãos, Wal e Marcelo; sobrinhos e sobrinhas, Joyce, Felipe, Biel e Rafa; tia Mônica, e mesmo aqueles que já não estão conosco, como minha avó Severina e meu pai Orly, que mesmo não podendo acompanhar esta jornada aqui da terra, teve forte influência na minha curiosidade sobre o mundo, e nas habilidades de aprender aquilo que para muitos pode parecer ser inteligível. Agraço principalmente a minha Mãe, Socorro, por ter sido a principal apoiadora dos meus sonhos e por ter orgulho deste filho, que dentre muitas indecisões e tropeços na vida, busca continuar a orgulhando.

Agradeço a mãe do meu maior tesouro, Angelina. Essa pessoa que sempre buscou me dar apoio para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

Agradeço ao meu filho Ulisses, que hoje é meu maior amigo e companheiro, e mesmo tendo apenas 1 ano, tem a resposta para todas as maiores dúvidas que eu possa ter em vida e me incentiva diariamente em todas as batalhas pessoais.

Aos amigos que, independente da distância, sempre foram uma fuga e um porto de retorno para poder suportar as dificuldades que a vida nos apresenta, além de trocar experiências, amizade e apoio por longos anos. Andrei, Leonardo, Lucas e Thiago certamente tem um lugar especial dentre estes.

Aos colegas de laboratório, que me acompanharam durante mais de 2 anos de PIBICS, e driblaram meu jeito calado e muitas vezes sisudo. Marcos, Catharine, Eugênio e principalmente agradeço à Geisianny, por todo o conhecimento transmitido, por todo o solo processado, todo arroz não germinado e as pelos géis de PCRs que não deram certo.

Aos diversos professores que tive ao decorrer desta jornada. Alguns destes excelentes e brilhantes, já outros, beirando a mediocridade e não apresentando qualquer profissionalismo. Agradeço a Universidade de Brasília por ter colocado em sua maioria, professores do primeiro tipo citado.

Dos excelentes professores que tive, cito alguns: Lilian, Dóris, Amazonas, Clóvis, Mercedes, dentre vários outros. Agradeço à professora Murta por abrir nossas mentes e ligar os pontos entre a ciência e as necessidades do mundo, certamente uma das melhores professoras que já tive em minha vida. Ao professor e coordenador Zuchi por acreditar no curso de Ciências Ambientais, sempre buscando que os alunos entendam a necessidade de dar um passo a mais e, além de tudo, ser também um grande orientador durante a jornada acadêmica, além de ter incentivado meu potencial individual.

Agradeço em especial ao professor Helson por ter me recebido em seu laboratório. Inicialmente como voluntário e posteriormente como bolsista de PIBIC por 2 anos, ganhamos juntos uma menção honrosa. Sempre ético, orientou, corrigiu e instruiu sem autoritarismo, sempre respeitando a individualidade, e hoje, como era esperado, me orienta nessa etapa final da graduação. Fica aqui meu eterno agradecimento.

Agradeço à coordenadora, professora Fátima da UFLA, pela oportunidade e por tornar possível a execução do nosso subprojeto do projeto intitulado “Diversidade de plantas e de organismos dos solos com potencial biotecnológico e indicadores de impacto ambiental, no Estado de Minas Gerais (CRA-RDP 136-10) ; a VALE S.A pela concessão do local de estudo; e a VALE S.A e FAPEMIG pelo financiamento do projeto

Por último, agradeço à criação e aos orixás, e a todas as entidades que me acompanham durante essa e outras longas jornadas.

*“Tentar não. Faça ou não faça.
Tentativa não há.”*

Mestre Yoda.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTAS DE QUADROS E TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 – INTRODUÇÃO	9
2 - REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 – Solo	11
2.2 – Ecologia do solo	12
2.3 – Solos e depósitos minerais	13
2.4 – Micro-organismos no solo	15
2.5 – Leveduras	16
2.6 – Leveduras no solo	17
2.7 – Leveduras em solo de mineração	18
2.8 – Leveduras e aplicações biotecnológicas	22
3 – JUSTIFICATIVA	24
4 – OBJETIVOS	25
4.1 – Objetivo geral	25
4.2 – Objetivos específicos	25
5 – MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 – Isolados	26
5.2 – Testes de tolerância	27
6 – RESULTADOS	29
6.1 – Zinco	29
6.2 – Cobre	30
6.3 – Níquel	31
6.4 – Alterações Morfológicas	33
7 – DISCUSSÃO	35
8 – CONCLUSÕES	38
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
GRÁFICO 1 – Propriedades físico-químicas do solo de onde foram obtidas os isolados de levedura utilizados na pesquisa	26
FIGURA 2 – Etapas do processo laboratorial	28
FIGURA 3 – Diferenças morfológicas da superfície e da coloração das leveduras 'L' e 'M' quando em meios com solução de cobre a (A)1mM (B)5mM	33
FIGURA 4 – Microscopia da Levedura 'A' em grupo controle	34
FIGURA 5 – Microscopia da Levedura 'A' em meio contendo zinco	34
GRÁFICO 2 – Média de crescimento de cada levedura, por metal	36

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – Relação das leveduras selecionadas e seu bioma, filo, número da coleção e letra atribuída	27
TABELA 1.1 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de zinco, e a média de crescimento por isolado de 'A' à 'I'	29
TABELA 1.2 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de zinco, e a média de crescimento por isolado de 'J' à 'S'	29
TABELA 2.1 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de cobre, e a média de crescimento por isolado de 'A' à 'I'	30
TABELA 2.2 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de cobre, e a média de crescimento por isolado de 'J' à 'S'	31
TABELA 3.1 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de níquel, e a média de crescimento por isolado de 'A' à 'I'.	32
TABELA 3.2 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de níquel, e a média de crescimento por isolado de 'J' à 'S'	32

RESUMO

O solo é um habitat extremamente peculiar com relação a outros habitats terrestres devido a sua natureza heterogênea complexa e dinâmica. Os micro-organismos que compõe a biota do solo são variados em relação a espécies, destes organismos podemos ressaltar as leveduras, que desempenham importantes funções em muitos ecossistemas e possuem elevado potencial de aplicação biotecnológica. Atividades como a mineração impactam de forma significativa os biosistemas encontrados no solo, através de seus resíduos e subprodutos. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi relatar como a diversidade de leveduras presentes em solos de áreas de mineração e áreas do entorno são impactadas por metais pesados, assim como estudar como a presença de níquel, cobre e zinco impactam as diversas espécies de leveduras isoladas destes solos. Dezenove isolados foram escolhidos para representar a diversidade presente em solos oriundos de áreas de mineração e entorno. As leveduras foram submetidas a cultivo em placas de petri contendo soluções de cobre, zinco ou níquel em concentrações de 1mM, 5mM, 10mM e 20mM. Foi observado que a presença de metais, de forma geral, afeta o crescimento das leveduras de forma negativa, inibindo seu crescimento. O níquel, dentre os metais estudados, foi aquele que apresentou menor toxicidade às leveduras estudadas. *Cryptocoocus podzolicus*, *Meyerozyma sp.* e *Lipomyces sp.* foram leveduras que toleraram as maiores concentrações de cobre enquanto *Pseudozyma sp.* e *Debaryomyces sp.* foram tolerantes ao zinco. Algumas leveduras apresentaram modificações morfológicas quando cultivadas em meio contendo concentrações de metais pesados. Os resultados foram interessantes para uma melhor compreensão de como a presença de metais afeta a microbiota dos habitats estudados, assim como as leveduras identificadas como tolerantes podem ter o seu potencial biotecnológico explorado frente a necessidades como recuperação de áreas degradadas.

Palavras-chave: leveduras; metais pesados; tolerância; níquel; cobre; zinco.

ABSTRACT

The soil is an extremely peculiar habitat in relation to other land habitats due to their complex heterogeneous and dynamic nature. Microorganisms of the soil biota are varied in terms of species, among these organisms, yeasts could be highlighted, and these organisms play important roles in many ecosystems and have high potential for biotechnological applications. Activities such as mining impact significantly bio-systems found in the soil through their industrial waste and by-products. In this context, the aim of this study was to report how the diversity of yeasts present in mining areas of soil and surrounding areas are impacted by heavy metals, as well as study how the presence of nickel, copper and zinc impact the various species of yeasts isolated from these soils. Nineteen isolates were chosen to represent the diversity present in soils coming from mining and surrounding areas. The yeasts were subjected to culture in petri dishes containing solutions of copper, zinc or nickel in concentrations of 1mM, 5mM, 10mM and 20mM. It was noticed that the presence of metals, in general, affects negatively the growth of yeasts, inhibiting its growth. The nickel, among the metals studied, was the one who showed less toxicity to the studied yeasts. *Cryptococcus podzolicus*, *Meyerozyma sp.* and *Lipomyces sp.* were the yeasts that tolerate the highest concentrations of copper, as *Pseudozyma sp.* and *Debaryomyces sp.* were tolerant to zinc. Some yeasts presented morphological changes when cultured in a medium containing heavy metal concentrations. The results were interesting for a better understanding of how the presence of metals affects the microbiota of the studied habitats, as well as yeasts identified as tolerant can have their biotechnological potential explored according of the needs like the recovery of degraded areas.

Keywords: yeasts; heavy metals; tolerance; nickel; copper, zinc.

1 – INTRODUÇÃO

O solo é um complexo e dinâmico sistema no que se refere às suas características bioquímicas, e é também um habitat em que há grande diversidade de micro-organismos desempenhando as mais diversas funções ecológicas. As intensas ações antrópicas, como construção de barragens, monocultura, um manejo mau realizado e mineração impactam esses habitat, e na maioria das vezes, causam efeitos deletérios, degradando a paisagem e afetando todos os ecossistemas que ali existem, seja este no campo macro ou microscópico.

É sabido que os micro-organismos, como bactérias e fungos, desempenham diversas funções no solo, muitas vezes tendo sua presença como um indicador da qualidade destes solos. As interações intraespecíficas e interespecíficas destes organismos muitas vezes ainda não é completamente compreendida, mas em diversos casos já foi observado que estes são necessários para a manutenção desses micro-habitats.

Dentro do universo destes micro-organismos, destacamos as leveduras, que são fungos unicelulares, pertencentes ao Reino Fungi, pertencentes aos filos Basidiomycota ou Ascomycota, podendo se reproduzir vegetativamente por brotamento ou fissão, não produzindo corpo de frutificação.

Atividades das indústrias de mineração geram um grande volume de sub-resíduos e rejeitos de metais pesados, que podem percolar no solo e afetar de forma negativa todos os habitats ali presentes, incluindo os micro-habitats. Os metais presentes no solo passam por processos de transformação que podem incluir absorção pelas plantas, utilização por micro-organismos com aumento da biomassa microbiana e transformação em formas livres. A biomassa microbiana pode estar envolvida no processo de mineralização deste metal ou imobilização.

As leveduras são conhecidas por desempenharem importantes funções nos ecossistemas em que habitam e já são utilizados largamente na indústria alimentícia e farmacêutica. Diante da necessidade em se recuperar paisagens e habitats degradados pela ação das mineradoras, as leveduras podem ser vistas como eficientes agentes que por meio das suas características bioquímicas, podem diminuir ou ainda reverter os efeitos negativos relacionados aos distúrbios antrópicos.

A ação dos micro-organismos, como as leveduras, sobre os metais tem sido objeto de numerosos estudos, e já vem sendo utilizadas como forma de biorremediação de paisagens degradadas. Sendo utilizadas principalmente em casos de destoxificação do solo ou reestabelecer as características normais de solos impactos por metais pesados.

Compreender como os metais pesados impactam o microbiota do solo é um importante passo para estabelecer relações entre a tolerância das leveduras a estes resíduos. Leveduras que resistem a estas situações de estresse, muito provavelmente são portadoras de algum tipo de mecanismo de defesa. Leveduras identificadas como tolerantes podem ser estudadas com a finalidade de se compreender melhor como esses mecanismos de defesa atuam, e como podem ser utilizados no processo de biorremediação de áreas degradadas.

Com base nestes fatos, o objetivo deste trabalho é estudar o impacto geral de metais pesados como níquel, zinco e cobre em leveduras isoladas de solos de mineração e áreas do entorno da mineradora VALE S.A. em Sabará – MG, assim como estudar se existe, entre estas leveduras, tolerância a algum dos metais estudados, com a finalidade de identificar aquelas que possam vir apresentar alguma função biotecnológica no campo da destoxificação e recuperação de solos degradados por resíduos de mineração.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Solo

O solo é um ambiente extremamente singular com relação a outros habitats terrestres devido a sua natureza heterogênea complexa e dinâmica. Até certo ponto podemos observá-lo apenas como um substrato mineral, composto de partículas minerais e espaços porosos, sendo caracterizado também pelas suas outras características físico-químicas como salinidade, pH, sua história geológica e pelo tipo de mineral que o compõe, dentre outros fatores.

Enquanto for considerado um substrato unicamente mineral, o solo tem sua origem em diversos intemperismos externos (ar, água, gelo) que erodem diversas rochas e transportam estes sedimentos a grandes acúmulos minerais, conhecidos como bacias sedimentares. Quando essas bacias se estabelecem em regiões planas que tenham uma condição que proporcione uma proteção geológica ou vegetal a novos intemperismos e erosões, o saprólito encontra condições favoráveis a evolução por processos pedogenéticos, originando assim o solo (Teixeira, 2003).

Para haver a transformação de saprólitos em solo é necessário que exista condições suficientes para que a biota se estabeleça, dando destaque aos vegetais superiores e aos micro-organismos autótrofos, que utilizam dos minerais ali presentes como nutrientes, em maior ou menor escala, para desempenhar suas funções vitais. (Teixeira, 2003).

O Brasil é, em sua quase totalidade, pertencente ao domínio tropical, e devido a sua história geológica é tido como um ambiente estável desde o período cretáceo, e por isso tem seus solos formados principalmente por interações climáticas. A EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) tem um vasto conhecimento sobre o solo brasileiro, com diversas publicações e constantes novos estudos sendo realizados.

A classificação do solo pode seguir diversos parâmetros e serem agrupados de formas distintas, de acordo com o método utilizado. No Brasil, a EMBRAPA utiliza uma classificação própria que divide os solos em: Neossolo, vertissolo, cambissolo, chernossolo, luvissolo, alissolo, argissolo, nitossolo, latossolo, empodossolo,

planossolo, gleissolo e organossolo; de acordo com suas propriedades biofísico-químicas. (Teixeira, 2003).

O perfil geológico de um solo é dividido horizontalmente devido às suas características biofísico-químicas, cada extrato deste solo pode ser nomeado como: Horizonte O: Solo mais superficial, contendo matéria orgânica recente, como restos vegetais ou animais; Horizonte A: Se encontra imediatamente na zona inferior ao Horizonte O. Solo muito escuro devido a sua riqueza em matéria orgânica decomposta; Horizonte B: Ainda há presença de matéria orgânica, porém em pequena escala, ainda há resíduos da rocha originária; Horizonte C: Camada que ainda sofre transformação de caráter geológico, composta de bastantes resíduos da rocha originária. A última camada sofre influência dos processos físico-químicos realizados pela microbiota e pela rizosfera; Horizonte R: Rocha originária ou Rocha-mãe, que ao ser submetida ao intemperismo, deu origem ao solo. (Brady & Weil, 2008).

Dependendo da finalidade que lhe é dada, o solo pode ser encarado com certa distinção. Enquanto para um geólogo o solo pode ser apenas um conglomerado de saprólitos provenientes de alterações das rochas na superfície, ou para um hidrólogo apenas um material poroso que dá suporte a corpos d'água subterrâneos. Aos olhos das ciências da vida, o solo é um ambiente rico em nutrientes e oportunidades para comportar diversas formas de vida. Enquanto agrônomos o observam como substrato vivo e dinâmico, fundamental para o cultivo e manutenção de vegetação, já as interações entre o solo e a microbiota ali presente podem ser o foco de estudo de outras ciências, como a biologia. (Teixeira, 2003). Para o cientista do meio ambiente, o conjunto de todas essas perspectivas partindo de um ponto de vista das demandas do homem, frente a sustentabilidade dos recursos minerais e naturais é a visão mais adequada.

2.2 – Ecologia do solo

Devido às suas características, o solo se torna um ambiente ideal para a presença de diversas formas de vida, principalmente micro-organismos e vegetais, que utilizam de seus minerais como nutrientes e geram, utilizam e reciclam a matéria orgânica presente. Este ambiente dinâmico e complexo é o habitat ideal para diversos micro-organismos, que mesmo diferentes em suas funções biológicas, vivem em

constante interação, onde as relações ecológicas são bastante estreitas, até mesmo ao ponto de a ausência da população de um organismo poder afetar ou inviabilizar a existência de outros, ou seja, grande parte das populações de organismos que vivem no solo são interdependentes. (Ogunseitan, 2005).

O micro-habitat é uma parcela do solo que devido suas características, abriga diversos micro-organismos vivos que se tornam interdependentes e que devido suas funções bioquímicas, constantemente modificam este mesmo habitat. Os micro-organismos presentes no solo também interagem com a rizosfera, muitas vezes tornando acessíveis nutrientes como nitrogênio ou fósforo, que em grande parte das vezes é encontrado no solo em forma indisponível para as raízes de vegetais superiores.

O solo e sua microbiota desempenham algumas funções indispensáveis para a manutenção das cadeias ecológicas dos ecossistemas, dentre estas: Fornecer aos vegetais superiores nutrientes que estão em formas indisponíveis, proporcionando assim condições ideais para a manutenção destes; mobilização e imobilização de nutrientes no solo, participando assim do ciclo hidrológico; Decomposição de matéria orgânica, assim tornando o solo um habitat dinâmico e com grande oferta de nutrientes; Substrato pra inúmeras formas de vida, dentre elas vegetais, animais, bactérias e fungos; Captação e liberação de diversos gases, tendo assim participação na composição da atmosfera. (Ogunseitan, 2005).

A diversidade de micro-organismos presente em um solo pode modificar suas características, assim como o tipo de matéria presentes neste pode afetar as funções bioquímicas dos organismos nele presentes, esse tipo de interdependência faz com que o solo seja visto como um sistema heterogêneo e dinâmico. Existem ainda outros fatores que também tem influência nessa dinâmica, como: clima, precipitação, atividades antropogênicas, déficit de nutrientes, entre outros. (Andreola & Fernandes, 2007).

2.3 – Solos e depósitos minerais

A expressão recursos minerais qualifica materiais rochosos que efetiva ou potencialmente possam ser usados pelo ser humano. Costumeiramente, representa

desde porções relativamente restritas até grandes massas de crosta terrestre e a própria rocha ou um mais de seus constituintes – minerais, elementos químicos específicos – despertam um interesse utilitário. (Teixeira, 2003).

Um depósito mineral é uma região onde há uma concentração de certo recurso mineral de em níveis acima do encontrado normalmente. Embora tenha sua origem nos mesmos processos ordinários que formam outros sedimentos e os solos, depósitos minerais tem grande importância econômica devido a facilidade de remoção de dado minério, e seu valor pode ser elevado dependendo da raridade, ou disponibilidade do mineral na crosta terrestre. Minério neste ponto é definido como uma rocha da qual podem ser economicamente obtidas uma ou mais substâncias úteis, os minérios ainda podem ser designados como minérios metálicos e minérios não metálicos, conforme possam ser ou não fontes de substância metálicas ou, também, tenham ou não em sua composição minerais úteis de brilho metálico. (Teixeira, 2003).

De acordo com suas características, localização, concentração e valor econômico, os minérios metálicos podem ser extraídos de um depósito, o ponto onde a extração é realizada se denomina mina. Conforme o metal é extraído são obtidos dois diferentes produtos, o minério concentrado e o rejeito. O minério concentrado é aquele em que devido suas características físicas e concentração do mineral útil está apto a ser utilizada pela indústria, tendo assim um valor econômico. O rejeito é uma parcela da extração que não é utilizada pela indústria e muitas vezes é descartada em regiões próximas as minas, esse tipo de descarte muitas vezes é relacionado com a visão de que o solo pode assimilar esse material de forma infinita. Os metais tóxicos são considerados um dos maiores poluentes de solos e águas (Jaques et al., 2007; Costa et al., 2008). Efeitos de intemperismo podem transportar esses rejeitos, o que leva a um processo de contaminação das regiões do entorno, no solo estas interações podem acontecer de diversas formas e podem se dar por reações como absorção, dessorção, complexação, dissolução, oxirredução, entre outras. (Morgan & Stumm, 1991).

Tendo em vista que o solo é um ambiente dinâmico e heterogêneo, as reações causadas pela interação com rejeitos de mineração impactam toda a estrutura física e bioquímica de um solo, afetando de forma direta toda a biota encontrada neste habitat, em maior ou menor intensidade, porém muitas vezes são impactadas de

forma negativa, o que pode acarretar em ter suas funções ecológicas afetadas ou interrompidas.

2.4 – Micro-organismos no solo

O solo, devido às suas características funciona como habitat para organismos de distintos reinos, que exercem sua função ecológica ao lado de diversos outros indivíduos das mais variadas espécies. O solo, como habitat, pode abrigar animais invertebrados, anelídeos, nematoides, além de uma infinidade de micro-organismos que desempenham as mais diversas funções nesse complexo sistema.

Um solo comum pode conter milhões de micro-organismos por cada grama, embora apenas 1% destes possam ser cultivados (Tortora et al, 2010). Devido a este fenômeno, se torna mais complicado o estudo detalhado da maioria das espécies, o que acarreta que grande parte dos micro-organismos do solo ainda não puderam ser caracterizados e identificados com precisão. (Torsvik & Ovreas, 2002).

Cinco grupos são pertencentes aos que se conhece como micro-organismos, sendo actinobactérias e bactérias, organismos procarióticos enquanto algas, fungos e protozoários organismos eucarióticos. É estimado que existam cerca de 10 mil espécies de organismos de procariotos no solo, enquanto esse número pode superar 1,5 milhões para eucariotos. (Swift et al, 2008).

O conjunto de micro-organismos que coexiste em determinada porção de solo é conhecido como microbiota, enquanto a região espacial onde estes realizam suas funções ecológicas é chamada de micro-habitat. (Moreira & Siqueira, 2006).

Os micro-organismos desempenham funções vitais para o funcionamento de um solo saudável, fazendo parte de importantes ciclos de nutrientes, como o ciclo do carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo. Bactérias fixadoras de nitrogênio se associam a raízes vegetais, disponibilizando assim esse nutriente para a planta. Fungos também exercem função similar em plantas, por meio de uma associação simbiótica conhecida como micorriza, sendo fósforo o nutriente disponibilizado em maior quantidade.

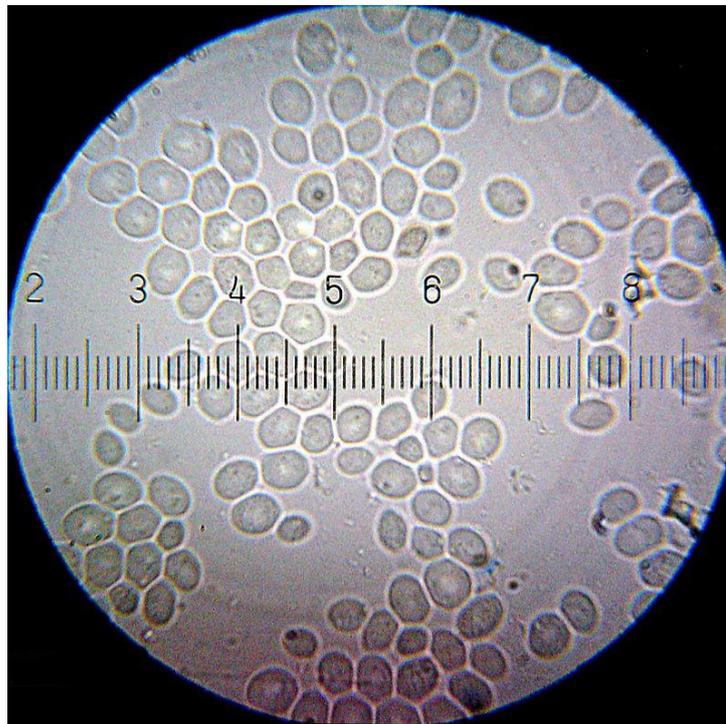
As leveduras também apresentam papel importante no solo, agindo também na decomposição e reciclagem de nutrientes. Muitas vezes, por terem um metabolismo

distinto ao de outros micro-organismos, leveduras podem sobreviver e continuar realizando suas funções ecológicas em ambientes que são hostis para bactérias. (Tortora et al, 2010).

2.5 - Leveduras

Leveduras são seres eucariotos, não filamentosos, pertencentes ao reino Fungi, são heterotróficos que se alimentam através da secreção de enzimas extracelulares capazes de digerir complexos compostos orgânicos, têm membrana celular e uma parede celular rígida formada por quitina, assim como é a característica geral dos fungos. Tipicamente têm formato esférico ou oval. Diferenciam-se de outros fungos por serem unicelulares, se reproduzem assexuadamente por brotação ou fissão binária e por não formarem corpos de frutificação (Kurtzman & Fell, 1998).

FIGURA 1 – *Saccharomyces cerevisiae*



(Fonte: Bob Blaylock, 2010. Creative Commons)

Leveduras de brotamento, como a *Saccharomyces sp.*, se dividem formando células desiguais e podem gerar mais de 24 células filhas por brotamento, quando um broto não se separa fisicamente de outro é gerada uma estrutura conhecida como

pseudo-hifa, como é o caso da *Candida albicans*. Leveduras de fissão, como é o exemplo da *Schizosaccharomyces sp.*, se dividem formando células iguais. Já a reprodução sexuada é feita por células especiais chamadas esporos. (Tortora et al, 2010).

As leveduras podem pertencer a dois diferentes filos dentro do reino fungi, Basidiomycota e Ascomycota, e sua caracterização vem do tipo de esporo que estas leveduras produzem em sua fase sexuada. Há ainda aqueles fungos que apresentam duas fases, uma fase de levedura, que se reproduz por brotamento, e uma fase filamentosa e muitas vezes a mudança de comportamento destes fungos está associada a mudanças no habitat que estão presentes, como temperatura, disponibilidade de CO₂, dentre outros. (Madigan et al, 2003).

É sabido que as leveduras exercem importante papel ecológico dentro de seus micro-habitats devido a seu modo de crescimento, que é induzido quimiostaticamente em direção a fontes de carbono disponíveis e seu sistema de biodegradação realizado por enzimas extracelulares. (Chander et al, 2004).

De acordo com Cordazzo (2000), leveduras muitas vezes realizam crescimento anaeróbico facultativo e usam outro composto orgânico ou íons inorgânicos comoceptor final de elétrons, essa característica dá a levedura uma grande capacidade adaptativa e é um dos principais processos que tornam a biodegradação de alguns xenobióticos e metais. Ao secretarem estas enzimas são iniciadas reações de oxirredução para que assim as leveduras possam absorver os íons necessários para o seu desenvolvimento.

2.6 – Leveduras no solo

O solo funciona como substrato onde leveduras podem encontrar todos os nutrientes e condições necessárias para o seu desenvolvimento, realizando assim suas funções ecológicas ao interagir com outras formas de vidas que, de forma direta ou indireta, façam uso dos recursos disponíveis no habitat colonizado por estes micro-organismos.

Em um grama de solo podem existir nenhuma como milhares de células de leveduras. Muitas vezes as espécies existentes na superfície, sejam associadas e

plantas ou outras formas de vida, podem também serem encontradas no solo, porém algumas espécies são endêmicas deste micro-habitat. (Sláviková & Vadkertiová, 2003).

Solo saudáveis como solos tropicais ou ainda aqueles que são usados para cultivos de espécies vegetais, podem apresentar um número de células de leveduras superiores a 100 mil por grama de solo (Dias & Schwan, 2010). Como a maior atividade microbiana acontece nas regiões mais superiores do solo, onde há grande oferta de nutrientes provenientes de matéria orgânica, esta é a região onde há maior concentração de células de leveduras, porém estas podem ser encontradas em menor quantidade em regiões mais profundas, devido ao fluxo de água, que pode transportar os nutrientes necessários para a manutenção destas colônias. (Madigan et al, 2003).

É constatado que existe uma relação direta entre a disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e carbono e a quantidade de células de leveduras presentes no solo. Leveduras também podem agir promovendo o crescimento vegetal ao colonizarem a rizosfera e interagirem de forma direta ou indireta com as plantas. Leveduras também podem proteger a superfície das plantas, frutas ou folhas, colonizando-as e agindo como defensivos a fitopatógenos. (Botha, 2011).

As colônias de leveduras presentes no solo, apesar de apresentarem uma resistência superior quando comparadas a outros organismos, como alguns procariontes, é bastante sensível a variação de alguns fatores como: umidade, disponibilidade de nutrientes, pH, clima, ou ainda de uma possível contaminação que possa afetar as características físico-químicas do solo. No entanto estes organismos desenvolveram diferentes estratégias para sobreviver nestes ambientes tóxicos, muitas vezes contaminados por metais pesados. (Ogunseitan, 2005).

2.7 – Leveduras em solos de mineração

A diversidade de leveduras pode alterar de forma expressiva a composição do solo da mesma forma que a os materiais que constituem o solo podem afetar as funções bioquímicas das leveduras ali presentes. A ação antrópica frequentemente é a principal razão na qual diversos poluentes são encontrados no solo, esses

xenobióticos muitas vezes são ricos em metais pesados, proveniente de rejeitos da indústria mineradora.

Alguns metais são considerados como micronutrientes do solo, este nome se refere às pequenas quantidades utilizadas para realizarem suas funções metabólicas. Micronutrientes podem ser classificados como essenciais, como é o caso do zinco, cobre, ferro e outros e como benéficos, como é o caso do níquel, silício e cobalto. (Giracca & Nunes, 2016).

É estimado que pelo menos um terço de todas as proteínas presentes na biosfera são metaloproteínas e vários metais são comumente encontrados associados a fisiologia de micro-organismos em pequenas concentrações. Embora cálcio, fósforo, sódio, ferro, molibdênio, manganês, magnésio, cobre, zinco, cobalto, níquel, tungstênio e alumínio sejam conhecidos como micronutrientes do solo, altas concentrações destes se tornam tóxicos, pois muitas vezes a proteína a qual se ligam não funciona adequadamente. (Ogunseitan, 2005).

Para cada ligação benéfica, há pelo menos 2 outros metais que podem realizar a mesma ligação ao custo de inviabilizar o funcionamento adequado da proteína. Leveduras e bactérias evoluíram em meio a necessidade de proteger o interior de suas células e ainda desenvolveram modos de desintoxicar metais que não podem ser mantidos externamente. Estas células evoluíram a ponto de conseguir realizar uma homeostase dos metais, a ponto de manter apenas quantidades vestigiais em seu interior, suficientes para realizar suas funções metabólicas ao mesmo tempo que evitam a saturação de algum elemento que possa ser tóxico em maiores quantidades. (Ogunseitan, 2005).

Segundo Mariano da Silva et al (2007), mesmo em condições não tóxicas, leveduras que crescem em ambientes ricos em metais, tendem a ter uma concentração superior destes elementos em seu interior, quando comparadas a outras células.

É sabido que o acúmulo de metais no interior dos vacúolos pode desequilibrar o metabolismo da célula, que perde alguns íons essenciais, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} para o meio extracelular. Outro efeito conhecido de altas concentrações de metais pesados é a inibição do transporte de açúcar no interior da célula. (Blackweel, 1999).

O zinco é o 30º elemento da tabela periódica, é sabido que este metal, quando em pequenas quantidades, é um micronutriente essencial para o solo e participa de diversas funções enzimáticas importantes, no entanto, como é a regra geral para metais, altas concentrações desse metal podem competir por ligações com proteínas no interior das células de leveduras e alterar o seu metabolismo.

Akihito Kamizono (1989) conseguiu identificar e isolar um fragmento de gene(ZRC1) da levedura *S. cerevisiae* que confere às proteínas do tipo Metalotioneína (MT's) presentes no citosol de células eucarióticas uma defesa natural contra os metais zinco e cádmio. Foi verificado que leveduras que tiveram esse fragmento alterado se tornaram sensíveis a estes metais enquanto aquelas que o tinham sobreviveram a concentração de 40mM de Zn^{2+} , concentração letal às células alteradas.

O cobre, metal de transição e 29º elemento da tabela periódica, é também um micronutriente essencial do solo e necessário para realizar funções enzimáticas essenciais para a celular de levedura.

Cobbet e Goldsbrough (2002) também relacionaram à tolerância de leveduras *S. cerevisiae* a ação de MT's presentes no citosol, essas proteínas são capaz de regular o transporte e manter em níveis aceitáveis a concentração de íons de cobre no interior das células, não causando assim uma alteração prejudicial no metabolismo destas leveduras.

Fitoquelatinas, assim como as MT's, são substâncias que se ligam a íons metálicos e os transportam no interior da célula de levedura até o complexo de golgi, onde proteínas que carecem de cobre tem acesso a esse íon e podem realizar sua função assim evitando que estes íons livres se bioacumulem em vacúolos. Há uma relação direta entre a presença destes compostos realizarem ligações aos íons de metais pesados e a tolerância que algumas plantas e leveduras apresentarem aos mesmos. (Cobbet & Goldsbrough, 2002).

O níquel é um 28º elemento da tabela periódica, este metal frequentemente é encontrado no solo por consequência de resíduos de atividades mineradoras ou industriais. A concentração média de níquel em um solo comum varia de 20 a 40ppm, porém concentrações acima de 127ppm já foram encontradas em terras roxas, no estado de São Paulo. (Mariano-da-Silva, 2007).

A absorção do níquel pelas leveduras depende de açúcares e de um metabolismo ativo. As moléculas de metal são levadas por proteínas transportadoras de cátions através do citosol das células de leveduras até serem ligadas a metaloproteínas em seus vacúolos. (Brady & Duncan, 1994).

A levedura *S. cerevisiae*, quando em presença de níquel, acumula grandes concentrações deste metal em seu interior, afetando assim o equilíbrio de outros nutrientes, isto acontece devido à ausência de algum mecanismo que possa manter esse metal no exterior de sua célula. Há uma relação direta entre concentrações de níquel e o crescimento e viabilidade de células de leveduras presentes no solo sendo que estas células mostram grande grau de perturbação de seus metabolismos na presença deste metal. (Mariano-da-Silva, 2007).

Segundo Fomina et al (2000), fungos podem apresentar, em sua morfologia, mudanças induzidas por altas concentrações de metais pesados no solo, como é caso das espécies *Geotrichum candidum*, *Gliocadium roseum*, *Humicola grisea* e *Trichoderma viride* que apresentam mudanças morfológicas quando crescem na presença de cádmio e cobre. Leveduras *Cryptococcus* sp. apresentaram mudança como distorção de sua parede celular e também o encolhimento da mesma, na presença de cádmio enquanto zinco e chumbo provocaram depressões em sua parede celular. (Singh et al, 2013)

De acordo com Melo e Azevedo (2008) uma forma que fungos e leveduras desenvolveram para resistir a ambientes com altas concentrações de metais é pela adsorção destes metais na superfície de sua parede celular, processo este conhecido como biossorção. Outra forma também de lidar com os metais que não podem ser mantidos no exterior das células é bioacumulá-los em organelas ou ligá-los a outras proteínas do seu interior celular.

O fungo *Phanerochaete chrysosporium*, também conhecido como fungo da podridão branca, é reconhecido pelo seu papel no ciclo do carbono, este organismo também está ligado a degradação dióxido de carbono e lignina. Devido à similaridade molecular entre a lignina e alguns poluentes, como bifenilas e diésteres, o sistema enzimático destes organismos tem sido estudado devido a sua capacidade de degradar outros compostos tóxicos. (Balan & Monteiro, 2001). O fungo *Phanerochaete*

chryso sporium, foi o primeiro organismo conhecido capaz de biodegradar a resina fenol-formaldeído. (Gusse et al, 2006).

De acordo com Sayer e Gadd (2011) e Zinkevich et al (1996), micro-organismos como fungos produzem uma série de compostos como ácidos orgânicos simples, álcoois, macromoléculas, polissacarídeos e ácido fúlvico, mucopolissacarídeos e proteínas, e esses compostos atuam como ligantes a metais. Devido a essas características os fungos têm sido amplamente usados como removedores de metais de águas e solos.

2.8 – Leveduras e aplicações biotecnológicas

Por mais que o interesse em verificar os efeitos deletérios e pensar em soluções para descontaminação dos solos agredidos por rejeitos de mineração seja algo relativamente novo, algumas soluções já são conhecidas, e algumas delas necessitam do conhecimento da diversidade de micro-organismos no solo, e de como essa microbiota se relaciona com este habitat.

Micro-organismos desempenham importantes funções na manutenção de seus habitats. No solo muitas vezes são de extrema importância para a presença de organismos mais complexos, como plantas superiores. Fungos são conhecidos largamente pelas funções de transformar e disponibilizar nutrientes, principalmente fósforo, para outros organismos que coexistam em seus habitats, outra importante função de fungos é degradar matéria orgânica e disponibilizar seus produtos como nutrientes. Uma função menos conhecida, porém de grande importância para seu uso biotecnológico é a interação destes fungos com metais pesados, absorvendo ou complexando-os, tornando assim seus efeitos menos danosos ao solo.

O processo conhecido como mineralização, funciona com a substituição ou a modificação de um grupo funcional, ou pela destruição da molécula, e tem como produto final sais inorgânicos, além de CO₂ e água, este processo também acontece durante o processo de biodegradação de contaminantes. (Buratini 2008),

Leveduras isoladas de água e solo tem apresentado resultados positivos quanto a sua capacidade em tolerar diferentes concentrações dos metais pesados: Zinco, cobre, níquel e cádmio, gerando expectativas otimistas no que sugere o uso

destas na biorremediação de áreas afetadas extração de minérios. (Vadkertiová & Sláviková, 2006).

De acordo com Fidalgo (2011) algumas leveduras do gênero *Cryptococcus*, isoladas de ambientes ricos em enxofre, apresentam certa resistência e sobrevivência em ambientes ricos em metais pesados como arsênio, cádmio, cobre e zinco. Os mecanismos de defesa podem variar dependendo da espécie e estirpe analisada.

Rejeito da destilação fracionada do caldo-de-cana fermentado na produção de etanol, a vinhaça é rica em compostos minerais tais como cálcio, zinco e enxofre e apresenta um efeito protetor sobre a espécie *S. cerevisiae*, diminuindo os efeitos negativos quando cultivada na presença de cádmio (Mariano-da-Silva & Basso, 2004).

Algumas técnicas de biorremediação de solos também carecem da presença de leveduras, dentre estas as mais conhecidas sendo a bioestimulação e a bioaugmentação. Bioestimulação é o processo onde nutrientes orgânicos e inorgânicos são adicionados ao solo contaminado, com a finalidade de se estimular a atividade de micro-organismos degradadores. (Jaques et al., 2007). Nitrogênio e fósforo são os mais importantes nutrientes associados a degradação de metais por fontes microbianas. (Baptista et al., 2003). É sabido que esses nutrientes tem forte relação com bactérias e fungos, respectivamente.

Bioaugmentação é a técnica que usa a inoculação de micro-organismos, que tem suas funções de degradação de materiais poluentes em solos contaminados. Os micro-organismos podem ter sido amplamente estudados e selecionados para se desenvolverem em altas concentrações de determinados nutrientes, com a finalidade de metabolizar distintos produtos. (Tortora et al, 2010).

Devido a sua maior resistência a metais tóxicos em comparação a outros micro-organismos, fator que colabora para o seu crescimento e desenvolvimento nessas regiões hostis, fungos tem proporcionado resultados satisfatórios na remoção de metais que contaminam o meio ambiente. (Collins & Stotzky, 1992).

Ter um conhecimento de como as leveduras se relacionam com o habitat, e como reagem na presença de uma grande concentração de um metal é um fator necessário para que novas tecnologias possam ser desenvolvidas com a finalidade de recuperar solos degradados. Um amplo conhecimento da diversidade destes

organismos e quais são suas interações para cada tipo de poluente se faz necessário para que a espécie mais eficiente para determinada situação possa ser utilizada.

3 - JUSTIFICATIVA

Atividades mineradoras tem impactado o solo e sua biota por séculos, no entanto seus efeitos ainda não são totalmente compreendidos, principalmente no que refere a micro-organismos. Além disso, desastres como o ocorrido com a mineradora Samarco, na barragem de Mariana - MG, em 2015, nos apontam ainda mais a urgência de se compreender como os subprodutos da mineração interferem na biota do solo, como estes organismos reagem a essa interferência e a importância da busca de soluções para estas questões que impactam não só o ambiente, mas a economia e a sociedade.

Conhecer a diversidade de leveduras presente nestas regiões é um primeiro passo dado rumo a compreensão de como micro-organismos ali presentes reagem na presença de concentrações anormais de metais pesados, como ferro, níquel, cobre e zinco. Ao se compreender como a diversidade de um habitat interage com os diversos elementos presentes no solo podemos estudar as características e funções destes organismos e enfim explorar as possíveis utilizações biotecnológicas que estas leveduras possam apresentar, inclusive as que mitiguem e recuperem solos degradados por consequência de atividade mineradora.

Assim se justifica o presente estudo, com a necessidade de se conhecer a diversidade das leveduras dos solos de mineração e áreas de entorno para se compreender a função destes importantes micro-organismos e assim explorar o seu potencial biotecnológico frente a questões ambientais.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

-Apresentar literatura que crie um arcabouço teórico para compreender a importância do presente estudo.

-Analisar o impacto dos metais níquel, cobre e zinco em leveduras isoladas de solos áreas de mineração e entorno.

4.2 - Objetivos específicos.

-Observar como a presença dos metais estudados afeta leveduras isoladas de solos de áreas de mineração e entorno, de modo geral.

-Observar, em placas de petri, como a presença de níquel, cobre ou zinco pode impactar o crescimento destas leveduras.

-Analisar se há alguma modificação morfológica nas leveduras estudadas, quando estas são cultivadas em meio contendo cobre, níquel ou zinco.

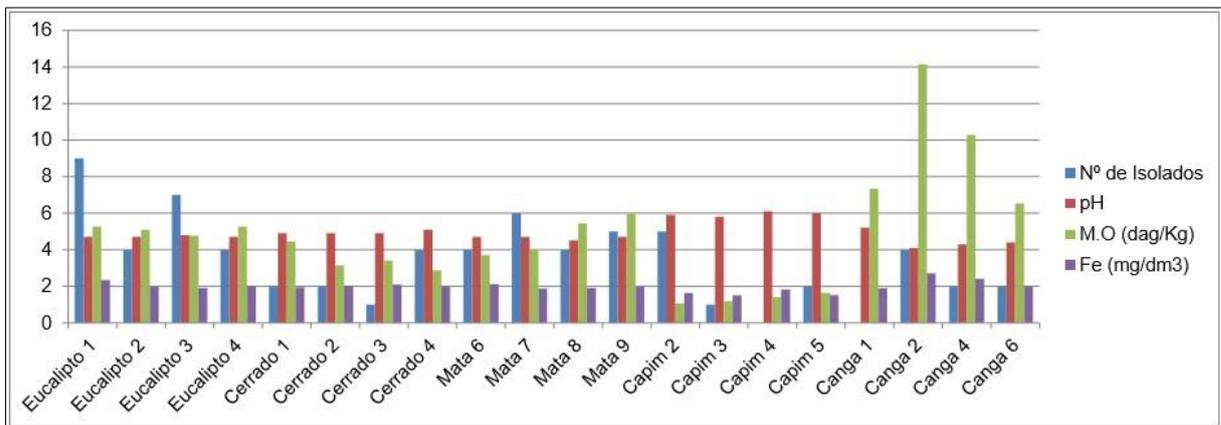
-Identificar possíveis leveduras capazes de tolerar em placas de petri, em diversas concentrações, a presença de níquel, cobre ou zinco.

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Isolados

Os isolados foram recuperados de solo de área de mineração da Vale S.A. e do entorno, em Sabará, Minas Gerais, foram amostrados em 20 pontos diferentes, distribuídos em 5 biosistemas (Cerrado, Canga, Capim, Mata e Eucalipto). O método de isolamento assim como os pontos de coletas referenciados geograficamente são descritos por Moreira (2015). As características físico-químicas desses solos amostrados são apresentadas no gráfico abaixo.

GRÁFICO 1 – Propriedades físico-químicas do solo de onde foram obtidas os isolados de levedura utilizados na pesquisa



(Fonte: Moreira, 2015)

Com a finalidade de abarcar a maior quantidade de táxons possíveis e evitar redundâncias em excesso, foram selecionados 19 isolados para os testes de tolerância a metais. Para facilitar a manipulação laboratorial, as amostras foram organizadas e nomeadas de A à S, e referenciadas pelo habitat em que foi encontrar e numeradas de acordo com seu registro na coleção.

Os 19 isolados utilizados neste estudo foram identificados por Moreira (2015), conforme o quadro a seguir:

QUADRO 1 – Relação das leveduras selecionadas e seu bioma, filo, número da coleção e letra atribuída.

LETRA	NÚMERO	LEVEDURA	FILO	BIOMA
A	CE 4.4	<i>Cryptocoocus podzolicus</i>	Basidiomycota	Cerrado
B	M 6.1	<i>Cryptocoocus podzolicus</i>	Basidiomycota	Mata
C	E 4.4	<i>Cryptocoocus podzolicus</i>	Basidiomycota	Eucalipto
D	CG 4.1	<i>Cryptocoocus podzolicus</i>	Basidiomycota	Canga
E	E 3.8	<i>Cryptocoocus podzolicus</i>	Basidiomycota	Eucalipto
F	M 8.4	<i>Cryptocoocus podzolicus</i>	Basidiomycota	Mata
G	E 3.3	<i>Cryptocoocus podzolicus</i>	Basidiomycota	Eucalipto
H	B 1.2	<i>Cryptocoocus flavescens</i>	Basidiomycota	Água
I	CA 3.1	<i>Pseudozuma sp.</i>	Basidiomycota	Capim
J	B 2.1	<i>Pseudozuma sp.</i>	Basidiomycota	Água
K	CE 4.1	<i>Meyerozyma sp.</i>	Ascomycota	Cerrado
L	CA 2.5	<i>Meyerozyma sp.</i>	Ascomycota	Capim
M	CA 2.1	<i>Meyerozyma sp.</i>	Ascomycota	Capim
N	CG 2.4	<i>Meyerozyma sp.</i>	Ascomycota	Canga
O	M 8.2	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	Ascomycota	Mata
P	E 2.4	<i>Debaryomyces sp.</i>	Ascomycota	Eucalipto
Q	M 9.2	<i>Lipomyces sp.</i>	Ascomycota	Mata
R	B 2.2	<i>Aureobasidium sp</i>	Ascomycota	Água
S	CA 5.1	<i>Aureobasidium sp</i>	Ascomycota	Capim

(Fonte: Autor)

Estas leveduras foram armazenadas em uma coleção e foram mantidas em meio de cultura MYGP no freezer a -80 C.

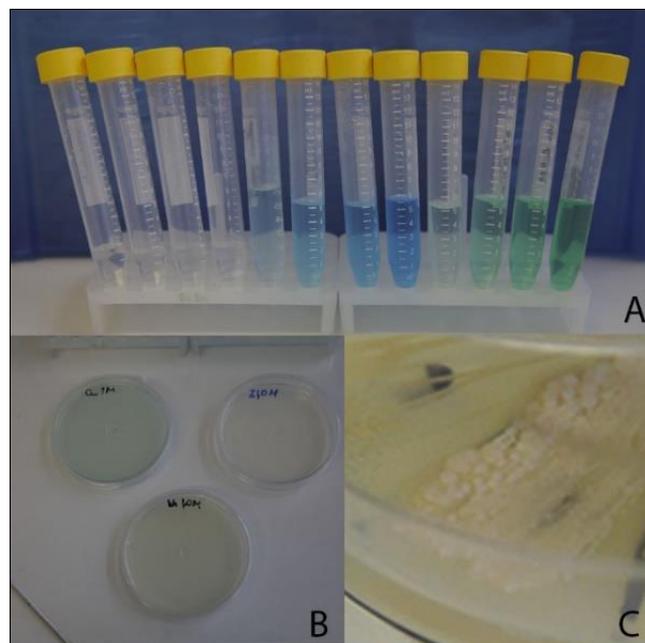
5.2 – Testes de tolerância

Estas leveduras foram reativadas em meio de cultura MYGP e cresceram dentro de BOD a uma temperatura constante de 27° por um período de 5 dias. Os isolados de leveduras foram testados quanto a tolerância a metais pesados pelo co-cultivo da levedura com a solução de metal a ser testada em diferentes concentrações. (Vadkertiová & Sláviková 2006). A solução aquosa foi composta de sais do metal estudado diluídos em água MilliQ, até resultar a molaridade pretendida. Para realização dos testes foi usado 9,5mL de Meio de Cultura (1% (NH₄)₂SO₄; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% MgSO₄; 2% glucose; 0,3% extrato de levedura), e 0,3mL da solução de metal (Cobre, Zinco, Níquel) em diferentes concentrações (0,05M; 0,25M; 0,50M e

1,00M), com a finalidade obtermos uma concentração final do metal estudado no meio de cultura de 1mM, 5mM, 10mM e 20mM.

Todas as 19 leveduras selecionadas foram plaqueadas em 3 repetições para cada concentração de cada metal estudado, gerando 648 eventos que foram caracterizados como 1 para leveduras que apresentaram crescimento e 0 para aquelas que não cresceram. Também foi gerado um grupo controle para observar se estas leveduras crescem de forma normal sem a presença dos metais propostos, hipótese essa que foi confirmada.

FIGURA 2 – (A) Soluções contendo os metais pesados em 4 concentrações diferentes. (B) Meio de cultura com adição de uma da soluções. (C) Levedura crescendo em meio de cultura com adição de solução de metal.



(Fonte: Autor)

As leveduras foram caracterizadas como tipo 1 quando foi observado crescimento e tipo 0 quando este não foi observado. Os dados foram submetidos a uma média simples e foram organizados e analisados com auxílio do software Microsoft Excel.

6 – RESULTADOS

6.1 - Zinco

Dentre os 3 metais propostos observamos que zinco foi o metal que apresentou uma menor toxicidade para os isolados analisados, sendo que a maioria destas obteve um crescimento adequado em todas as concentrações, como podemos observar nas tabela a seguir.

TABELA 1.1 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de zinco, e a média de crescimento por isolado de ‘A’ à ‘I’.

Concentração	A	B	C	D	E	F	G	H	I
R1 0,05	1	0	1	1	1	1	1	1	1
R2 0,05	1	1	1	1	1	1	1	1	0
R3 0,05	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R1 0,25	1	1	1	1	0	1	1	1	1
R2 0,25	1	0	1	1	1	1	1	1	0
R3 0,25	1	0	1	1	1	1	1	1	1
R1 0,50	1	1	0	1	1	1	1	0	1
R2 0,50	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R3 0,50	1	0	0	1	1	1	1	0	0
R1 1,00	1	1	1	1	1	1	1	0	0
R2 1,00	1	0	0	1	1	1	1	0	1
R3 1,00	1	0	0	1	1	1	1	0	1
TOTAL (%)	100,00%	50,00%	66,67%	100,00%	91,67%	100,00%	100,00%	58,33%	66,67%

(Fonte: Autor)

TABELA 1.2 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de zinco, e a média de crescimento por isolado de ‘J’ à ‘S’.

Concentração	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
R1 0,05	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
R2 0,05	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R3 0,05	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R1 0,25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R2 0,25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R3 0,25	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
R1 0,50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R2 0,50	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
R3 0,50	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
R1 1,00	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
R2 1,00	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
R3 1,00	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
TOTAL (%)	83,33%	58,33%	100,00%	100,00%	50,00%	75,00%	100,00%	100,00%	75,00%	83,33%

(Fonte: Autor)

As amostras A; D; E; F; G; L; M; P; Q; R e S cresceram em todos os experimentos, superando a média de 82% de crescimento nesta etapa.

O alto índice de crescimento das amostras em relação a este metal mostra que para estes isolados, o zinco apresenta baixa toxicidade podendo este ser utilizado em funções metabólicas por estes micro-organismos. As leveduras que apresentaram uma baixa média de crescimento podem ter uma menor tolerância a este metal, mas devido à falta de padronização da inoculação realizada com alça de repicagem, estas amostras carecem de mais repetições, já que o seu crescimento diferiu bastante das demais.

6.2 - Cobre

Quando comparado ao Zinco observamos que se trata de um metal de maior toxicidade para as leveduras estudadas. Ao analisarmos todas as leveduras e concentrações propostas obtivemos uma média de 49% de crescimento, o que torna o Cobre um metal de maior interesse para o experimento realizado.

Das 19 amostras observamos que em 3 isolados (B; E e J) não houve crescimento algum e apenas em uma repetição do isolado I foi encontrado algum crescimento, caso excepcional que talvez tenha ocorrido por algum erro experimental.

TABELA 2.1 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de cobre, e a média de crescimento por isolado de ‘A’ à ‘I’.

Concentração	A	B	C	D	E	F	G	H	I
R1 0,05	1	0	1	1	0	1	1	0	0
R2 0,05	1	0	1	1	0	1	1	1	0
R3 0,05	1	0	1	1	0	1	1	1	1
R1 0,25	1	0	1	1	0	1	1	1	0
R2 0,25	1	0	1	1	0	1	1	1	0
R3 0,25	1	0	1	1	0	1	1	1	0
R1 0,50	1	0	1	1	0	1	1	1	0
R2 0,50	1	0	0	1	0	1	1	1	0
R3 0,50	1	0	1	1	0	1	1	0	0
R1 1,00	1	0	0	1	0	0	0	0	0
R2 1,00	1	0	0	1	0	0	0	0	0
R3 1,00	1	0	0	1	0	0	0	0	0
TOTAL (%)	100,00%	0,00%	66,67%	100,00%	0,00%	75,00%	75,00%	58,33%	8,33%

(Fonte: Autor)

TABELA 2.2 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de cobre, e a média de crescimento por isolado de ‘J’ à ‘S’.

Concentração	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
R1 0,05	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R2 0,05	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R3 0,05	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R1 0,25	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
R2 0,25	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
R3 0,25	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
R1 0,50	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
R2 0,50	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
R3 0,50	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
R1 1,00	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
R2 1,00	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
R3 1,00	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
TOTAL (%)	0,00%	25,00%	75,00%	100,00%	25,00%	25,00%	50,00%	100,00%	25,00%	25,00%

(Fonte: Autor)

Para este metal obtivemos apenas 4 isolados que cresceram normalmente na concentração máxima (1,00M). A tabela 3 ilustra que o crescimento diminui conforme a concentração de cobre na solução aumenta. Tendo em vista tal situação, constatamos que os isolados A; D; M e Q apresentam algum nível de tolerância ao cobre, pois não só cresceram na concentração máxima como em 100% das repetições as quais foram submetidos.

6.3 - Níquel

Dentre os 3 metais propostos, o níquel apresentou a maior toxicidade para todos os isolados, com baixos níveis de crescimento nos meios contendo maiores concentrações deste metal em suas soluções. O Níquel teve uma média de crescimento de 41% aproximadamente mas difere dos outros meios pois não apresenta nenhuma cepa que tenha obtido êxito em crescer na concentração de 1,00M como vemos nas tabelas 3.1 e 3.2.

TABELA 3.1 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de níquel, e a média de crescimento por isolado de ‘A’ à ‘I’.

Concentração	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
R1 0,05	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
R2 0,05	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
R3 0,05	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0
R1 0,25	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
R2 0,25	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
R3 0,25	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
R1 0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
R2 0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
R3 0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R1 1,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R2 1,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3 1,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL (%)	50,00%	41,67%	41,67%	50,00%	0,00%	41,67%	41,67%	50,00%	66,67%	33,33%

(Fonte: Autor)

TABELA 3.2 – Resultado das análises de crescimento das leveduras em meio contendo solução de níquel, e a média de crescimento por isolado de ‘J’ à ‘S’.

Concentração	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
R1 0,05	0	1	1	1	1	1	1	1	1
R2 0,05	0	1	1	1	1	1	1	1	0
R3 0,05	0	1	1	1	1	1	1	1	1
R1 0,25	0	1	1	1	1	1	1	1	0
R2 0,25	0	1	1	1	1	1	1	1	0
R3 0,25	0	1	1	1	0	1	1	0	0
R1 0,50	0	0	0	0	0	1	0	0	0
R2 0,50	0	0	0	0	0	1	0	0	0
R3 0,50	0	0	0	0	0	1	0	0	0
R1 1,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R2 1,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3 1,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL (%)	0,00%	50,00%	50,00%	50,00%	41,67%	75,00%	50,00%	41,67%	16,67%

(Fonte: Autor)

Na concentração de 0,50M houveram 7 leveduras que apresentaram um crescimento normal, porém em 10mM temos apenas 2 leveduras (I e P) que puderam tolerar esta concentração de níquel em seu meio de cultura, atingindo assim um valor máximo para este metal.

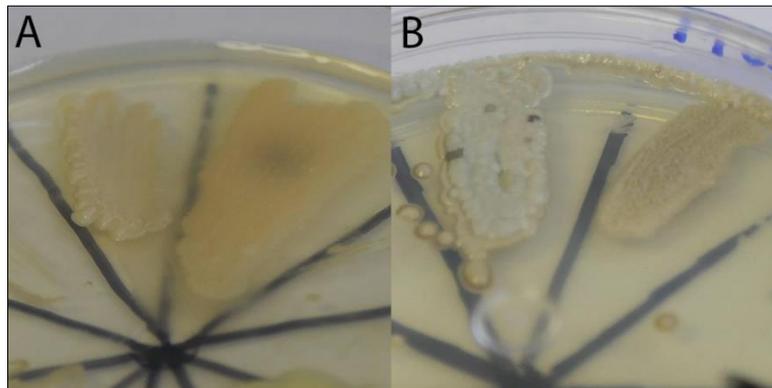
Os dois isolados de leveduras que apresentaram um crescimento superior nos experimentos realizados indicam uma capacidade de suportar maiores concentrações de níquel, esta característica deve ser estudada frente a possibilidade do uso destes micro-organismos em áreas de degradação ambiental em função de atividade

mineradora para mitigação de impactos e recuperação de solos contaminados por níquel.

6.4 – Alterações Morfológicas

Alguns isolados apresentaram uma morfologia distinta nas concentrações de 5mM e 10mM no meio contendo cobre onde apresentaram coloração acinzentada, diferente do bege leitoso apresentado em todas as amostras. Na figura 3 podemos perceber como as leveduras L e M tiveram uma mudança na coloração superficial e como as bordas destas colônias apresentaram diferenciação sendo mais espessas no em (B) onde a concentração do metal pesado é maior.

FIGURA 3 – Diferenças morfológicas da superfície e da coloração das leveduras ‘L’ e ‘M’ quando em meios com solução de cobre a (A)1mM (B)5mM

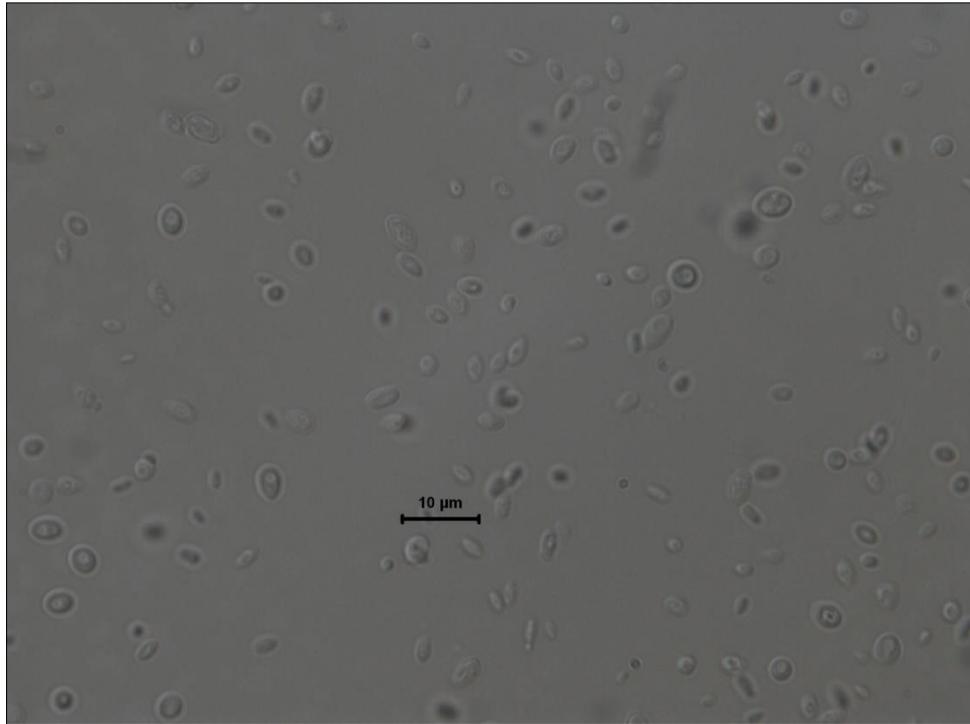


(Fonte: Autor)

A levedura A (*Cryptococcus podzolicus*) foi submetida a microscopia com o uso do Microscópio ótico Leica DFC 490 tendo as imagens capturadas pelo *software* Leica Qwin V3. e teve suas alterações morfológicas observadas mais minuciosamente. Esta levedura foi cultivada nas concentrações de 20mM em meio contendo zinco e também em um grupo controle sem a presença deste metal.

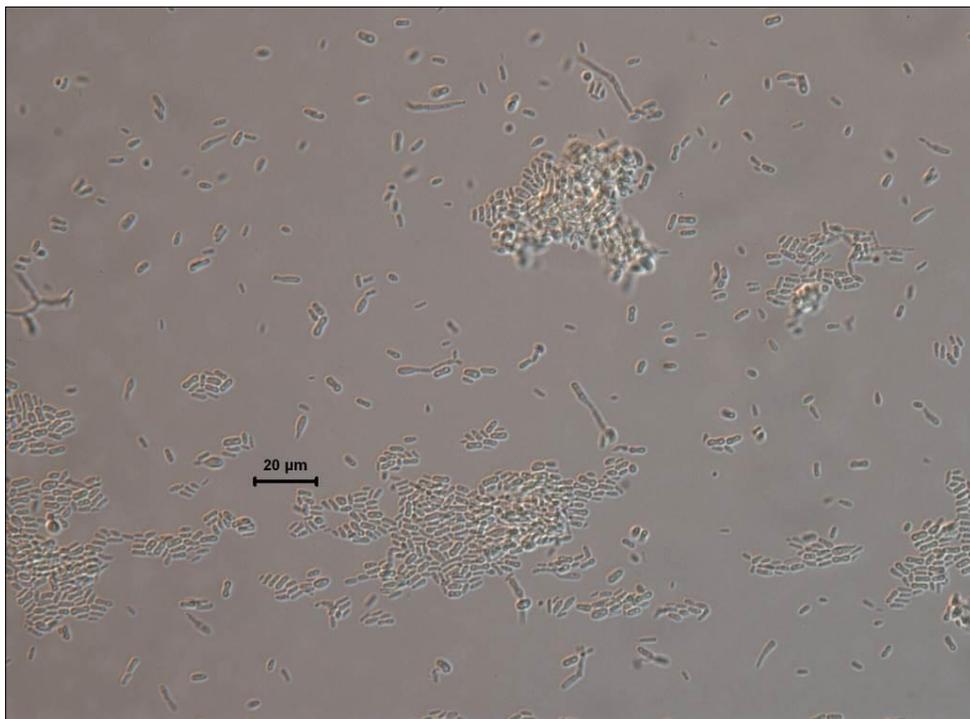
Ao serem comparadas ao grupo controle, foi observado uma mudança no formato das células das leveduras que crescerem junto a algum metal, também é possível perceber o aumento do tamanho celular e mudança na forma destas células. A presença destes metais influenciou a formação de pseudohifas, alterando de forma impactante a morfologia dos isolados.

FIGURA 4 – Microscopia da Levedura 'A' (*Cryptococcus podzolicus*) em grupo controle.



(Foto: Moreira, 2015)

FIGURA 5 – Microscopia da Levedura 'A' (*Cryptococcus podzolicus*) em meio contendo zinco.



(Foto: Moreira, 2015)

7 - DISCUSSÃO

Foi observado que os solos de áreas de mineração e entorno apresentam uma diversidade menor de leveduras quando comparado com solos que não pertençam a este grupo, como é observado em outros trabalhos, isso se explica devido às altas concentrações testadas, os metais usados deixam de funcionar apenas como micronutrientes e se tornam tóxicos. Diversos mecanismos podem ser a causa deste efeito, como por exemplo, a elevação de íons livres destes metais, gerando competição por ligações em metaloproteínas, onde muitas vezes uma proteína essencial deixa de ser produzida, afetando assim o metabolismo da célula. O acúmulo destes íons em vacúolos em grandes quantidades muitas vezes leva a levedura a uma morte celular. O fato é que a presença de metais afetou negativamente o crescimento das leveduras estudadas, sendo um primeiro indício que concentrações elevadas de metais pesados prejudicam as funções metabólicas destas células.

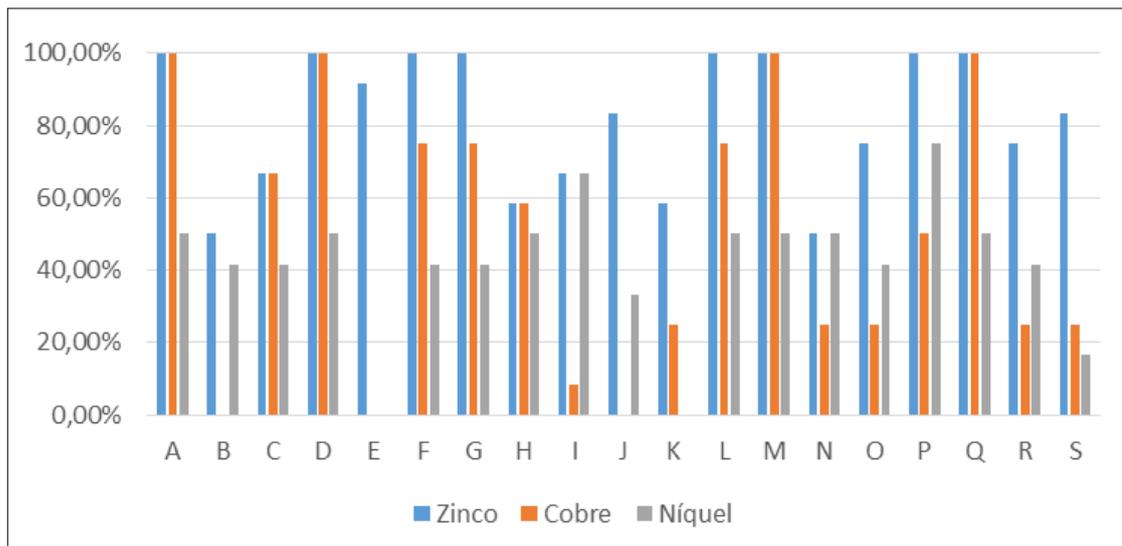
A regra geral que pôde ser observada é que conforme se aumenta a concentração destes minérios se tem uma diminuição do crescimento normal das leveduras, salvo algumas exceções que apresentaram um comportamento idêntico ao controle em todos os experimentos. É sabido que zinco, cobre e níquel são micronutrientes importantes em um solo saudável, porém concentrações acima do normal implicam em efeitos deletérios. Um aumento descontrolado destes metais podem também ameaçar outros tipos de organismos que dependam da função destas leveduras.

Foi observado que existe nestes micro-organismos um mecanismo que reage quando na presença de concentrações maiores dos metais estudados. No caso dos isolados de leveduras **L** e **M** que mudaram sua morfologia ao serem co-cultivadas junto a uma dada concentração de cobre, o fato de apenas a levedura **M** ter sido tolerante a concentração de 20mM faz com que esse efeito esteja mais associado com condição de estresse do que a tolerância destas leveduras. A levedura **A** teve seu crescimento normal nos meios contendo cobre e zinco também na concentração de 20mM, as mudanças morfológicas observadas em lâmina podem estar associadas a como estes micro-organismos lidam com o excesso destes micronutrientes no

interior de suas células, podendo estar associadas com a síntese proteica ou com o acúmulo do excesso de íons livres dentro de seus vacúolos.

Foi possível perceber que os três metais estudados tiveram um impacto diferente em cada levedura, porém foi notado que o níquel é aquele que apresenta maior toxicidade para os micro-organismos, como vemos no gráfico 2. Este fenômeno pode ocorrer devido à falta de um mecanismo de defesa que possa manter esse metal no exterior da celular de levedura e também pelo baixo consumo de níquel pelas células. Já que o níquel não é tido como um micronutriente essencial, a maior toxicidade do elemento pode estar associada a disponibilidade em excesso frente a não utilização do mesmo.

GRÁFICO 2 – Média de crescimento de cada levedura, por metal.



(Fonte: Autor)

Não foi observada nenhuma relação entre os isolados estudados, o habitat de que foram isoladas e aos metais a que foram submetidas, cada levedura se comportou de uma maneira única, mesmo indivíduos do mesmo gênero ou espécie apresentaram crescimentos distintos ao serem submetidos à dada concentração de um metal. Isso pode ocorrer devido a diversidade intraespecífica das espécies. Cada gênero de leveduras pode apresentar um mecanismo de defesa distinto, ou ainda, não apresentar nenhum, porém este fenômeno carece de mais estudo.

Um outro aspecto a ser observado é quais leveduras puderam tolerar maiores concentrações destes metais. Para níquel e cobre pudemos observar que há um limite para o crescimento da maioria das leveduras e apenas alguns isolados foram capazes de crescer normalmente após este ponto (A; D; M e Q para cobre e I e P para níquel). As leveduras que apresentaram um crescimento normal em concentrações em que outras não atingiram mostraram algum nível de tolerância. Por terem apresentado tolerância, as leveduras em questão podem ser dotadas de algum mecanismo de defesa que mantenha a homeostase destes metais de forma a não comprometer o metabolismo da célula, a quantidade e a forma como esses nutrientes são utilizados na síntese proteica também podem influenciar o comportamento destas células em meios com concentrações de metal acima dos normais.

Os resultados obtidos podem ser interessantes, pois demonstram como, na maioria dos casos, a presença de metais pesados afeta negativamente o solo, e logo, os micro-organismos que desempenham importantes funções ecológicas; também poderão nortear estudos dos possíveis usos biotecnológicos destas leveduras com a finalidade de recuperação de áreas degradadas. É interessante ainda a possibilidade dessas leveduras estarem relacionadas ao crescimento vegetal e estudos nessa área também são de grande importância biotecnológica e ambiental.

8 - CONCLUSÕES

Após os estudos de tolerância a metais pesados foi possível observar que, de maneira geral, a presença destes metais em concentrações acima do normal tendem a influenciar o crescimento das leveduras estudadas de forma negativa, salvo pontualidades.

Algumas leveduras tiveram seus resultados divergentes das demais, e apresentaram um crescimento normal em concentrações de metal que não foi observado em outras, como foi o caso de *Cryptococcus podzolicus*, *Meyerozyma sp.* e *Lipomyces sp.* no meio contendo cobre e *Pseudozuma sp.* e *Debaryomyces sp.* no meio contendo níquel. As concentrações estudadas de zinco se mostraram pouco tóxicas para as leveduras.

Leveduras apresentam alterações morfológicas quando cultivadas junto a concentrações elevadas de metais pesados, esse fenômeno pode ser visto como uma resposta a situações de estresse e não necessariamente está vinculado a mecanismos de defesa.

Os resultados obtidos mostram que existe um certo nível de tolerância dos isolados frente aos metais propostos, mais análises devem ser feita para comprovar a real capacidade destes micro-organismos, verificar de forma precisa quais mecanismos de defesa são utilizados e quais são as demandas individuais de cada espécie. Há ainda de se contemplar a possibilidade da aplicação destas leveduras em áreas contaminadas por metais com a finalidade de mitigar ou recuperar danos causados ao solo oriundos de atividade mineradora.

O trabalho realizado poderá referenciar futuros que estudos que possam se utilizar destes dados como ponto de partida, sejam eles relativos a tolerância destas leveduras ou ao nível de toxicidade dos metais estudados.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-HAFEZ, A. E.; SHEHATA, S. F. *Field evaluation of yeasts as a biofertilizer for some vegetable crops*. Arab Univ J Agric Sci, 9:169– 182. 2001
- AMPRAYN, K.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H. T.; KENNEDY, I. R. *Plant growth promoting characteristics of soil yeast (Candida tropicalis HY) and its effectiveness for promoting rice growth*. Applied Soil Ecology, v.61, p.295-299. 2012
- ANDREOLA, F.; FERNANDES, S. A. P. *A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo de culturas*. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas. Instituto Agronômico. 2007
- BALAN, D. S. L.; MONTEIRO, R. T. R. *Decolorization of textile índigo dye by ligninolytic fungi*. Journal of Biotechnology, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 141-145, Aug. 2001
- BAPTISTA, S. J.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D. C. *Avaliação da bioestimulação em solos argilosos contaminados com petróleo*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO & GÁS,2. 2003, Rio de Janeiro Anais... Rio de Janeiro: UFRJ, 2003.
- BARNETT, J.A; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeast, Characteristics and Identification*. 4ª edição. Editora. Cambridge: Cambridge University Press, 811p. 2000.
- BLACKWHEEL, K. J; TOBIN, J. M. *Cadmium accumulation and its effects on intracellular ion pools in a brewing strain of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 23, n. 3, p. 204-208, 1999.
- BOTHA, A. *The importance and ecology of yeasts in soil*. Soil Biology and Biochemistry, 43(1), 1–8, 2011.
- BRADY, D.; DUNCAN, J. R. *Bioacumulation of metal cations by Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 41, n. 1, p. 149-159, 1994.
- BRADY, N. C. & WEIL, R. R. *Elementos da natureza e propriedades dos solos*. Bookman, 3ª edição. 2013
- BURATINI, S. V. *Biodegradação*. In: ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática, princípios e aplicações. 2ª edição. São Carlos: RiMa, p. 89-116, 2008.
- CHANDER, M.; ARORA, D. S.; BATH, H. K. *Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire, v. 31, n. 2, p. 94-97, 2004
- COBBETT CS. *Phytochelatin and their role in heavy metal detoxification*. Plant Physiol. 123:825–3. 2000

- COBBETT, christopher; GOLDSBROUGH, peter. *PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis*. Rev Plant Biology. 53:159-82. 2002
- COLLINS, Y. E; STOTZKY, G. *Heavy metal alter the electrokinetic properties of bacteria, yeast and clay minerals*. Applied and Environmental Microbiology, New York, v. 58, n. 5, p. 1592-1600, May 1992.
- CORDAZZO, J. *Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas*. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2000
- COSTA, S. T. E. et al. *Subproduto da indústria de alumínio como amenizante de solos contaminados com cádmio e chumbo*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 2533-2546, 2008.
- DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. *Isolamento e identificação de leveduras*. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras – MG: Editora UFLA. 2010
- FIDALGO, C. I. A. *Heavy metal resistance in extremophilic yeasts: a molecular and physiological approach*. Dissertação (Mestrado). - Universidade de Lisboa – Portugal, 2011.
- FOMINA, M.; RITZ, K.; GADD, G. M. *Negative fungal chemotropism to toxic metals*. FEMS Microbiology Letters, 193: 207-211, 2000
- GIRACCA, maria nunes; NUNES, José Luís da Silva. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_micronutrientes>. Acesso em 02/02/2016
- GUSSE AC; Miller PD; Volk TJ. *White-rot fungi demonstrate first biodegradation of phenolic resin*. Environmental Science and Technology. 2006
- JACQUES, R. J. S. et al. O. *Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos*. Ciência Rural, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.
- KAMIZONO, A. et al. *Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. 1989.
- KURTZMAN, C. P. & FELL, J. W. *The Yeasts, a taxonomic study*. Elsevier, 4ª edição. 1998.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts: a taxonomic study*. 5ª edição. Editora Elsevier. 2011
- LINS, C. E. L.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. de S. B. *Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de Leucaena*

leucocephala (LAM.) de WIT. em solos de Caatinga sob impacto de mineração de cobre. Revista Árvore, v.31, n.2, p.355-363. 2007.

MADIGAN, michael t. *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre. 12ª Edição. Editora Artmed. 2010

MARIANO-DA-SILVA, S.; BASSO, L. C. *Efeitos do Cádmio sobre o crescimento das leveduras Saccharomyces cerevisiae PE-2 e Saccharomyces cerevisiae IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24(1): 1622. 2004.*

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia ambiental*. 2. ed. rev. e ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do solo*. .2ª edição. Lavras: Editora UFLA. 729p. 2006.

MOREIRA, G.A.M; *Diversidade genética e funcional de leveduras presentes em solos de mineração e áreas do entorno*. Brasília. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – UnB. 2015

MORGAN, J. J., & STUMM, W., Chemical processes in the environment, relevance of chemical speciation. In: Merien, (Ed.), *Metals and Their Compounds in the Environment*. 1991.

OGUNSEITAN, O. *Microbial Diversity, Form and Function in Prokaryotes*. 1ª edição. Editora Blackwell. 1998

SAYER, J. A.; GADD, G. M. *Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of Aspergillus niger grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. Mycological Research, Cambridge, v. 105, p.1261– 1267, Nov. 2001.*

SCHENBERG, A.C.G. *Biotechnologia e Desenvolvimento Sustentável. Estudos Avançados. 24(70)*. 2010

SCHWAN, R.F.; Campos, C.R.; Dias, D.R. *Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros*. In: Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brussaard, L. *Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros*. Lavras: Ed. Ufla, 768p. 2008

SINGH, P.; RAGHUKUMAR, C.; PARVATKAR, R. R.; MASCARENHAS-PEREIRA, M. B. L. *Heavy metal tolerance in the psychrotolerant Cryptococcus sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin. Yeast, 30: 93-101, 2013.*

SPERANDIO, E. M. *Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do Cerrado*. Brasília. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – UnB. 2012

SWIFT, M. J.; BIGNELL, D. E.; MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J. *The inventory of soil biological diversity: concepts and general guidelines*. In: MOREIRA, F. M. S.;

- HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. A handbook of Tropical Soil Biology: Sampling and characterization of below-ground biodiversity. London: Earthscan, pg.1, 2008.
- TEIXEIRA, W et al. *Decifrando a Terra*. 2ª edição. São Paulo. Editora IBEP. 2003
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. *Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems*. Current Opinion in Microbiology, 5: 240-245. 2002.
- TORTORA, G et al. *Microbiologia*. 10ª edição. Porto Alegre. Editora Artmed. 2012
- VADKERTIOVÁ, R.; SLÁVIKOVÁ, E. *Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments*. Journal of basic Microbiology, v.46, n.2, p.145-152. 2006
- VALE, H. M. M. *Diversidade de leveduras endofíticas e epifíticas em frutos de café cereja (Coffea arabica L.) e sucessão durante a seca natural*. Tese (Doutorado). Viçosa: UFV. Universidade Federal de Viçosa. 2009
- VULLO, D. L. *Microorganismos y metales pesados: una interaccion em beneficio del medio ambiente*. Revista Química Viva, n.3. 2003
- ZINKEVICH, V. et al. *Characterization of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria*. International Biodeterioration Biodegradation, Barking, v. 37, n. 3-4, p. 163–172, 1996