

DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SOLOS TRATADOS COM ASSOCIAÇÃO DE CASCALHO DE PERFURAÇÃO DE POÇOS DE PETRÓLEO E TORTA DE CRAMBE

Isis Capella Soares¹, Bruno Oliveira de Carvalho²; Rafael Antônio Presotto³ & Irene da Silva Coelho⁴

1. Bolsista de Iniciação Científica FAPERJ, Discente do Curso de Agronomia, IA/UFRRJ; 2. Doutor pelo programa PPGCTIA/UFRRJ; 3. Pesquisador; Epagri de Abdon Batista-SC; 4. Professora do DMIV/IV/UFRRJ.

Palavras-chave: DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), métodos independentes do cultivo, resíduos da indústria energética.

Introdução

A exploração e produção de petróleo são atividades de reconhecido impacto ambiental que geram a necessidade do equilíbrio entre a necessidade de preservação do meio ambiente e a promoção do crescimento da oferta de energia. Associado a esta linha está atualmente a produção de biocombustíveis, que também gera resíduos, porém com maior potencial para o uso agrícola. Em ambos os casos há uma grande carência de informações e urgência de ações que culminem na geração de medidas voltadas para a utilização destes resíduos, principalmente na melhoria da qualidade dos solos com aptidão para a implantação do sistema de produção de oleaginosas para fins de produção de biocombustíveis. Entretanto, não há informação sobre o impacto destes resíduos nas características do solo, o que impossibilita a otimização da dose a ser aplicada. Uma vez que a diversidade microbiana pode ser utilizada como um dos indicadores de qualidade de solos, o objetivo do presente trabalho é avaliar a diversidade de fungos em planossolos tratados com resíduos da indústria energética - cascalho de perfuração de poços de petróleo e torta de crambe e cultivados com girassol. Nossa meta é incrementar a eficiência da ciclagem de subprodutos da indústria de energia, visando à adoção de técnicas que diminuam os impactos ambientais e, ao mesmo tempo, minimizem o uso de fertilizantes minerais na produção das espécies oleaginosas e melhoria da qualidade do solo.

Metodologia

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (3x3), composto por três combinações de torta de crambe (0, 16, 32 Mg.ha⁻¹) e três combinações de cascalho de perfuração (0, 30, 60 Mg.ha⁻¹) em um planossolo, onde foram cultivadas mudas de girassol (*Helianthus annuus L.*), totalizando nove unidades experimentais. Foram conduzidas duas plantas por parcela durante aproximadamente 60 dias.

A extração do DNA total do solo foi realizada utilizando-se o kit PowerMax™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc) segundo instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a amplificação da região 18S rDNA de fungos pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), usando os *primers* NS1 (White et al., 1990) e GCfung (May et al., 2001). Para as reações de PCR foram utilizados 1 U de Taq DNA polimerase, tampão de reação 1X, 200 µM de dNTP, 2,4 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer* e 20 ng de DNA total. As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 50 s, 72 °C por 1 min, seguida de uma elongação final a 72 °C por 7 min. Com o intuito de aumentar o rendimento das amplificações e facilitar a análise dos fragmentos de mesmo tamanho, os produtos da primeira reação foram utilizados como molde em um segundo PCR utilizando os mesmos *primers* e as mesmas condições utilizadas na primeira reação. Os produtos de PCR foram separados em um gel de 8% de poliácridamida e gradiente de concentração entre 25% e 45% definido a partir da mistura de soluções de uréia e formamida deionizada. A eletroforese foi realizada a 70V e 60 °C, por 16 h, em um equipamento Dcode™ “Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad, Richmond, EUA).

Resultados & Discussão

Para avaliar a especificidade dos *primers* para amplificação da região 18S rDNA de fungos e para otimizar as condições de amplificação, foram utilizados o DNA total de isolados de fungos filamentosos pertencentes a espécie *Aspergillus fumigatus* e de leveduras isoladas em nosso laboratório. Após a eletroforese em gel de agarose 1,5% foi observado um fragmento de aproximadamente 450 pb. Após a otimização da amplificação da região 18S de fungos, estes DNAs foram utilizados como controles positivos nas reações de amplificação do DNA total extraído dos solos.

Os perfis eletroforéticos do gel de DGGE das amostras evidenciam que o método detectou diferenças na comunidade de fungos ocasionadas pelo uso de diferentes combinações de torta de crambe e cascalho de perfuração. As amostras tratadas com 30 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração apresentaram maiores números de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais), o que evidencia um aumento na diversidade e fungos. Já nos solos tratados com associações de torta de crambe com 60 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração foi observada uma redução no número de UTOs, mostrando que a diversidade fúngica ficou comprometida quando esta concentração de cascalho foi utilizada. O entendimento dos efeitos desses rejeitos na dinâmica microbiana do solo irá contribuir para criação de planos de manejo e gerenciamento do cascalho de perfuração e torta de crambe.

Conclusão

A aplicação de 30 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração associado a 0, 16 e 32 Mg.ha⁻¹ de torta de crambe em planossolos, promove aumento diversidade de fungos.

A aplicação de 60 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração associado a 0, 16 e 32 Mg.ha⁻¹ de torta de crambe em planossolos compromete a diversidade de fungos do solo.

A técnica de DGGE é adequada ao tipo de análise proposta, pois foi eficiente na avaliação da diversidade de fungos do solo ao possibilitar a detecção de diferentes padrões de UTOs nos diferentes tratamentos avaliados.

Referências Bibliográficas

- EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1997.
- MAY, L. A.; SMILEY, B.; SCHMIDT, M. G. 2001: Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. Can. J. Microbiol., n.47.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J.D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, n.65, 1999.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990: Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Eds MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky and TJ White, Academic Press, New York.