

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

Isis Capella Soares<sup>1</sup>, Bruno Oliveira de Carvalho<sup>2</sup>; Rafael Antônio Presotto<sup>3</sup> & Irene da Silva Coelho<sup>4</sup>

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

O desenvolvimento de biocombustíveis é uma alternativa a produção de petróleo que busca minimizar os impactos ambientais, produzindo resíduos com maior potencial agrícola, além de promover o crescimento da oferta de energia. Porém, ainda há uma grande carência de informações e medidas voltadas para a utilização destes resíduos, principalmente na melhoria da qualidade dos solos com aptidão para o cultivo de oleaginosas para fins de produção de biocombustíveis. Destaca-se a falta de 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 bacteriana em solos tratados com diferentes combinações de resíduos da indústria energética - cascalho de perfuração de poços de petróleo e torta de cembre.

## Metodologia

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (3x3), composto por três combinações de torta de cembre (0, 16, 32 Mg.ha<sup>-1</sup>) e três combinações de cascalho de perfuração (0, 30, 60 Mg.ha<sup>-1</sup>) 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 o kit PowerMax™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc). Na primeira reação de PCR foram usados os *primers* 27f (Suzuki & Giovannoni, 1996) e 1512r (Kane et al., 1993). Os produtos da primeira reação, foram utilizados como molde para a segunda reação de PCR em que se usou *primers* que amplificam a região V3 do rDNA 16S, GC-338f e 518r (Ovreas et al., 1997). Os produtos da segunda reação de PCR foram separados em um gel de 8% de poliacrilamida e gradiente de concentração entre 44% e 60% definido a partir da mistura de soluções de uréia e formamida deionizada. A eletroforese foi realizada a 70 V e 60°C, por 16 horas, em um equipamento Dcode™ "Universal Mutation Detection System" (BIO-Rad, Richmond, EUA).

Os géis foram fotografados e as imagens foram analisadas com o software Bionumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem) determinandose as diferenças através do coeficiente de Dicce para a análise de grupamento foi usado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*).

Bandas representativas dos tratamentos foram selecionados e excisados do gel de poliacrilamida com a utilização de um bisturi estéril e acondicionados em microtubos com 10 uL de água ultra pura. Esses microtubos foram mantidos a temperatura de 4°C por 16 horas. Após a incubação esses foram centrifugados a 14549g por 5 min e em seguida 2 uL dessa suspensão foram amplificados por PCR utilizando os *primers* 338f /518r. Esses amplicons foram tratados com a enzima Exosap e enviados para sequenciamento. As seqüências foram submetidas ao algoritmo BLASTn, possibilitando a comparação com seqüências nucleotídicas armazenadas no banco de dados do NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e a inferência da espécie.

## Resultados e Discussão

Os *amplicons* de aproximadamente 198 pb produzidos no *Nested-PCR* foram submetidos a Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), e o padrão de bandejamento observado no gel, revelou a existência de diferentes unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de bactérias.

A partir do perfil de UTOs gerado em cada associação é possível a análise da dinâmica da diversidade bacteriana. A adição de 16 Mg ha<sup>-1</sup> ou 32 Mg ha<sup>-1</sup> de torta de crambe associada a 30 Mg ha<sup>-1</sup> de cascalho de perfuração produziu os maiores números de UTOs observados no experimento. Entretanto, as associações de torta de crambe com 60 Mg ha<sup>-1</sup> de cascalho de perfuração comprometeu a diversidade bacteriana, o que foi observado pela redução do número de UTOs.

Pressoto (2014) analisando as mesmas amostras do presente estudo, concluiu que o acúmulo de biomassa do girassol é favorecido pela aplicação de doses intermediárias de torta de crambe. Para aplicações acima de 20 Mg ha<sup>-1</sup> ocorre inversão no efeito, todavia no presente estudo a amostra com a maior diversidade bacteriana foi a que recebeu aplicação de 32 Mg ha<sup>-1</sup> de torta de crambe.

Além da observação das diferenças na quantidade de UTOs nos diferentes tratamentos do experimento, também foi avaliada a similaridade entre os perfis gerados pelo DGGE através da elaboração de um dendograma. Pela avaliação do dendograma observa-se que as amostras que receberam aplicação de 60 Mg ha<sup>-1</sup> de cascalho de perfuração pertenciam ao mesmo grupo, pois permaneceram agrupados. Este resultado indica o favorecimento de uma população bacteriana específica e corrobora com o impacto observado sobre o número de UTOs.

Das 19 bandas excisadas do gel de poliacrilamida, foi possível a identificação de apenas nove, sendo seis bandas representativas por bactérias não cultiváveis, duas pertencentes ao gênero *Paenibacillus spp.* e uma pertencente a espécie *Staphylococcus epidermidis*. Esse número de bactérias não cultiváveis detectadas no experimento mostrou a importância da utilização de técnicas independentes de cultivo para avaliar a dinâmica populacional de bactérias em ambientes que sofreram algum tipo de modificação. Um aprimoramento da técnica de recuperação bandas no gel de poliacrilamida se mostra necessário para a confirmação das espécies presentes pelos tratamentos.

## Conclusão

Tratamento com 16 Mg ha<sup>-1</sup> ou 32 Mg ha<sup>-1</sup> de torta de crambe associada a 30 Mg ha<sup>-1</sup> de cascalho de perfuração tem maiores números de UTOs, indicando maior diversidade bacteriana.

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

## Referências Bibliográficas

- COSTA, R.; GOMES, N. C. M.; MILLING, A.; SMALLA, K. An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Braz. J. Microbiol* n.35, 2004.
- ELSAS, J.D.V.; SMALLA, K. Extraction of microbial community DNA from soils. Kluwer Academic Publishers, 1995.
- KANE, D. J.; SARAFIAN, T. A.; ANTON, R.; HAHN, H.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S.; BREDESEN, D. E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 262 (5137), 1993.
- OVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 1997.
- SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 1996.