

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

Jéssica de Oliveira Lima¹; Bruno Oliveira de Carvalho²; Fábio Cardoso de Freitas³ & Irene da Silva Coelho⁴

1. Bolsista PROIC, Discente do Curso de Agronomia, IA/UFRRJ; 2. Doutor pelo programa PPGCTIA/UFRRJ; 3. Professor da UFRRJ – Instituto Três Rios; 4. Professor do DMIV/IV/UFRRJ.

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

Introdução

O Brasil é referência na produção de agroenergia. Programas como os do etanol e do biodiesel atraem a atenção do mundo por ofertar alternativas econômicas e ecologicamente viáveis à substituição dos combustíveis fósseis, entretanto, este tipo de produção de energia gera resíduos que devem ser tratados, assim como os resíduos da indústria petrolífera. A reciclagem de resíduos representa um benefício inquestionável na minimização deste problema ambiental. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da associação entre cascalho de perfuração de poços de petróleo e torta de mamona em solos cultivados com girassol e mamona na diversidade bacteriana, através da técnica molecular de Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação - DGGE. Além disso, uma análise de correlação entre as variáveis de contagem de bactérias em diferentes meios de cultura (UFC/g) e quantidade de UTOs no DGGE, pH, teores de sódio disponível, Ca e Mg foi realizada, a fim de elucidar os fatores relacionados ao aumento da diversidade bacteriana nos diferentes tratamentos.

Metodologia

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (2 x 3 x 2 x 3), composto por dois solos de texturas contrastantes, argissolo e planossolo. Nos solos foram aplicados 2 níveis de torta de mamona (0, e 10, Mg.ha⁻¹), 3 níveis de cascalho de perfuração (0, 16 e 64 Mg.ha⁻¹) e cultivados com duas oleaginosas (mamona - *Ricinus communis* L. e girassol- *Helianthus annuus*). Aos 76 dias após a semeadura foram coletadas 35 g de solos de cada tratamento. Amostras de 25 g de solo foram submetidas a diluições seriadas decimais variando de 10⁻¹ a 10⁻¹². Em seguida, alíquotas de 0,1 mL das diferentes diluições foram inoculadas em meios com distintas finalidades: meio PCA (*Plate Count Agar*), para isolamento de bactérias mesófilas; meio AGEL (Ágar Glicerol - Extrato de Levedura), para isolamento de actinomicetos; meio AC (Ágar Caseína), para isolamento de bactérias proteolíticas e meio AMVF (Ágar Manitol Vermelho de Fenol), para isolamento de bactérias halotolerantes ou halofílicas. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 a 48 horas. Após a incubação foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) totais. Foram consideradas como contáveis as placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias (Clark, 1965; Schortemeyer et al., 1996). Para a análise da diversidade bacteriana foi usada a técnica independente de cultivo, o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Após a extração do DNA total dos solos utilizando o kit PowerMax™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc), foram empregados os *primers* universais 27f ([Suzuki & Giovannoni, 1996](#)) e 1512r ([Kane et al., 1993](#)), que amplificam a região 16S do rDNA de Bacteria. Os produtos gerados na 1ª reação foram utilizados como molde para a 2ª reação de PCR utilizando os *primers* CG-338f e 518r (Ovreas et al., 1997). Os produtos de PCR foram separados em 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, no 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) determinando-se as diferenças através do coeficiente de Dicce para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*).

Resultados e Discussão

O padrão de bandeamento dos *amplicons* no gel de DGGE revelou que, comparado ao grupo controle, as amostras que receberam a associação entre torta de mamona e cascalho de perfuração apresentaram um aumento na diversidade bacteriana. O aumento do número de bandas no gel foi progressivo nas amostras em que foram cultivadas mamona, tanto para o substrato planossolo quanto argissolo. Quando cultivadas com girassol, em substrato planossolo, não houve aumento do número de bandas conforme o aumento da concentração de cascalho de perfuração. Já no substrato argissolo, houve uma relação inversa, quanto maior a concentração de cascalho de perfuração, menor o número de bandas observadas no gel. Embora o tratamento tenha gerado um aumento da diversidade bacteriana, a adição dos resíduos da indústria agroenergética não causou a seleção de populações específicas nos solos analisados. Não houve um agrupamento baseado nos tratamentos, mas a formação de três grupos distintos, mostrando que o aumento na diversidade bacteriana gerado pelos tratamentos não se deve ao favorecimento de populações específicas. Além disso, os controles dos tratamentos mantiveram-se juntos confirmando a autenticidade da técnica elaborada. Diminuindo a distância euclidiana média para um intervalo entre 0,6 e 0,7 ocorre-se o agrupamento das amostras A-10/16-G e A-0/0-M que representam respectivamente o controle do cultivo de girassol e mamona na matriz argissolo. Já o agrupamento entre as amostras P-0/0-G e P-0/0-M, representativas dos controles na matriz planossolo ocorre em torno de 0,4 da distância euclidiana média.

Foi realizada análise de correlação entre as variáveis apresentadas no experimento, a saber, quantidade de UFC/g em PCA, AGEL, AC, AMVF, quantidade de UTOs em DGGE, pH e teores de sódio disponível, Ca e Mg com objetivo de um melhor entendimento dos fatores relacionados ao aumento da diversidade bacteriana nos diferentes tratamentos. Houve correlação significativa entre o teor de magnésio no solo e a contagem de bactérias mesófilas em PCA ($r=0,58$) e no número de UTOs em DGGE ($r=0,64$). Estes resultados mostram que as variações ocorridas no teor de magnésio acompanharam a mudança na diversidade bacteriana tanto pela metodologia dependente quanto pela metodologia independente de cultivo. Yada et al. (2009), constatou que a adição de óxido de magnésio no solo gera um aumento da atividade microbiana. O magnésio é um dos minerais essenciais para o metabolismo microbiano (Bon et al., 2008).

Conclusão

A técnica de DGGE se mostra eficiente na avaliação da diversidade bacteriana por ter possibilitado detectar diferentes padrões de UTOs nos tratamentos avaliados e pela sua sensibilidade de detecção.

Pelas análises de correlação realizadas pode-se inferir sobre a influência do teor de magnésio na diversidade bacteriana.

Referencias Bibliográficas

- BON, E. P. S.; FERREIRA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia, produção e aplicação e mercado, Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. In C. A. Black et al. (ed.) Methods of soil analysis, Part 2. Agronomy 9:1460-1466. Am. Soc. of Agron., Inc., Madison, Wis, 1965.
- 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):1274-1277, 1993
- 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):625-630, 1996.
- YADA, M. M.; TEIXEIRA, É. M.; POÇAS, E.; & BALOTA, É. L. Adição de silicato e a alteração da atividade microbiana do solo. Synergismusscientifica UTFPR, (4):1, 2009.