



Diversidade bacteriana em solos tratados com associação de cascalho de perfuração de poços de petróleo e torta de crambe⁽¹⁾

Isis Capella Soares⁽²⁾; Bruno Oliveira de Carvalho⁽³⁾; Rafael Antônio Presotto⁽⁴⁾; Miliane Moreira Soares de Souza⁽⁵⁾; Everaldo Zonta⁽⁵⁾ & Irene da Silva Coelho⁽⁵⁾

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos da FAPERJ – Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro.

⁽²⁾Discente do Curso de Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ; isiscapellasoares@hotmail.com; ⁽³⁾Doutor pelo programa PPGCTIA da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

⁽⁴⁾Pesquisador; Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Epagri de Abdon Batista-SC; ;

⁽⁵⁾Professor; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO: A reciclagem de resíduos da indústria de agroenergia em solos agrícolas minimiza problemas ambientais como o descarte inadequado, além de fornecer nutrientes que aumentem o conteúdo orgânico e correção da acidez do solo. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da utilização de resíduos da indústria de agroenergia – cascalho de perfuração de poços de petróleo e torta de cambre na diversidade microbiana do solo. O delineamento experimental foi do tipo fatorial, composto por três combinações de torta de crambe e três combinações de cascalho de perfuração de poços de petróleo, onde foram cultivadas as mudas de girassol, totalizando nove unidades experimentais. Após a análise independente de cultivo da diversidade bacteriana, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), constatou-se que as amostras com adição de 16 Mg ha⁻¹ ou 32 Mg ha⁻¹ de torta de crambe associada a 30 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração produziram os maiores números de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais). Das 19 bandas excisadas do gel de poliácridamida, pôde-se identificar seis bandas representadas por bactérias não cultiváveis, reforçando a importância da aplicação de técnicas independentes de cultivo na análise da diversidade microbiana.

Termo de indexação: Cascalho de perfuração de poços de petróleo, DGGE, solos, diversidade bacteriana.

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 geram 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 o impacto da utilização de resíduos da indústria energética - cascalho de perfuração e torta de cambre na diversidade microbiana do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental foi do tipo fatorial (3x3), composto por três combinações de torta de crambe e três combinações de cascalho de perfuração, onde foram cultivadas as mudas de girassol (*Helianthus annuus L.*), totalizando nove unidades experimentais (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Tratamentos utilizados no experimento em casa-de-vegetação

Tratamentos	Torta de crambe	Cascalho de perfuração
	----- Mg ha ⁻¹ -----	
0/0*	0	0
16/0	16	0
32/0	32	0
0/30	0	30
16/60	16	30
32/30	32	30
0/60	0	60
16/60	16	60
32/60	32	60

*Controle

Cada parcela foi constituída de um pote com 8 L de solo planossolo acrescido do respectivo tratamento. A mistura foi umedecida e após dez dias foi realizado o plantio das sementes de girassol.



Foram conduzidas duas plantas por parcela durante aproximadamente 60 dias. Após este período, amostras de solos foram coletadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise.

A extração do DNA total do solo foi realizada utilizando o kit PowerMax™ Soil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Inc), segundo protocolo fornecido pelo fabricante, a partir de amostras de 10 g estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para aumentar a sensibilidade, e para facilitar a análise dos fragmentos do mesmo tamanho, a técnica de *nested*-PCR foi utilizada. Na primeira reação de PCR, foram usados 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão de reação 1X, 200 μM de cada dNTP, 3,0 mM MgCl_2 e 0,5 μM dos primers 27f (Suzuki & Giovannoni, 1996) e 1512r (Kane et al., 1993). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, seguida de uma elongação final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Os produtos da primeira reação foram utilizados como molde para a segunda reação de PCR utilizando primers que amplificam a região V3 do rDNA 16S, GC-338f e 518r (Ovreas et al., 1997). As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: 5 min de desnaturação inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 ciclos de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 s, seguida de uma elongação final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min.

Os produtos da segunda reação de PCR foram avaliados segundo a técnica independente de cultivo através do DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), 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) determinando-se as diferenças através do coeficiente de Diccree para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*).

UTOs representativos dos tratamentos foram selecionados e excisados do gel de poliacrilamida com a utilização de um bisturi estéril e acondicionados em microtubos com 10 μl 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 μl 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 bandeamento observado no gel, revelou a existência de diferentes unidades taxonômicas operacionais (UTOs) de Bacteria (Figura 1).

A Tabela 2 apresenta o perfil de UTOs gerado em cada associação, permitindo a análise da dinâmica da diversidade bacteriana. A adição de 16 Mg ha^{-1} ou 32 Mg ha^{-1} de torta de crambe associada a 30 Mg ha^{-1} de cascalho de perfuração produziu os maiores números de UTOs observados no experimento. Entretanto, as associações de torta de crambe com 60 Mg ha^{-1} de cascalho de perfuração comprometeu a diversidade bacteriana, o que foi observado pela redução do número de UTOs.

Tabela 2 - Distribuição do número de UTOs reveladas pela técnica de DGGE em amostras de solos tratadas com diferentes associações de torta de crambe e cascalho de perfuração

		Cascalho de perfuração		
		0 Mg ha^{-1}	30 Mg ha^{-1}	60 Mg ha^{-1}
Torta	0 Mg ha^{-1}	18	23	26
De	16 Mg ha^{-1}	22	28	21
crambe	32 Mg ha^{-1}	24	31	24

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^{-1} ocorre inversão no efeito, todavia no presente estudo a amostra com a maior diversidade bacteriana foi a que recebeu aplicação de 32 Mg ha^{-1} 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⁻¹ de cascalho de perfuração pertenciam ao mesmo grupo (**Figura 1**), 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⁻¹ ou 32 Mg ha⁻¹ de torta de crumbe associada a 30 Mg ha⁻¹ de cascalho de perfuração tem maiores números de UTOs, indicativo de 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

COSTA R, GOMES NCM, MILLING A, SMALLA K. An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Braz. J. Microbiol.* 35:230-234. 2004.

DA COSTA, D. P., DIAS, A. C. F., DURRER, A., DE ANDRADE, P. A. M., GUMIERE, T., & ANDREOTE, F. D.. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 38(6):1694-1702, 2014.

ELSAS, J.D.V.; SMALLA, K. Extraction of microbial community DNA from soils. Kluwer Academic Publishers. 1-11, 1995.

FERREIRA, E.P.B; NUNES, M.U.C.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Perfis de PCR-DGGE de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de milho sob diferentes doses de adubação com compostos orgânicos. *Bioscience Journal*, 25(3):41-50, 2009.

GUANGHUA, W.; JUNJIE, L.; XIAONING, Q.; JIAN, J.; YANG, W.; XIAOBING, L. Effects of fertilization on bacterial community structure and function in a black soil

of Dehui region estimated by Biolog and PCR-DGGE methods. *Acta Ecologica Sinica*. p. 220–226, 2008.

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.

OVREÁS, 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):3367-3373, 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):625-630, 1996.

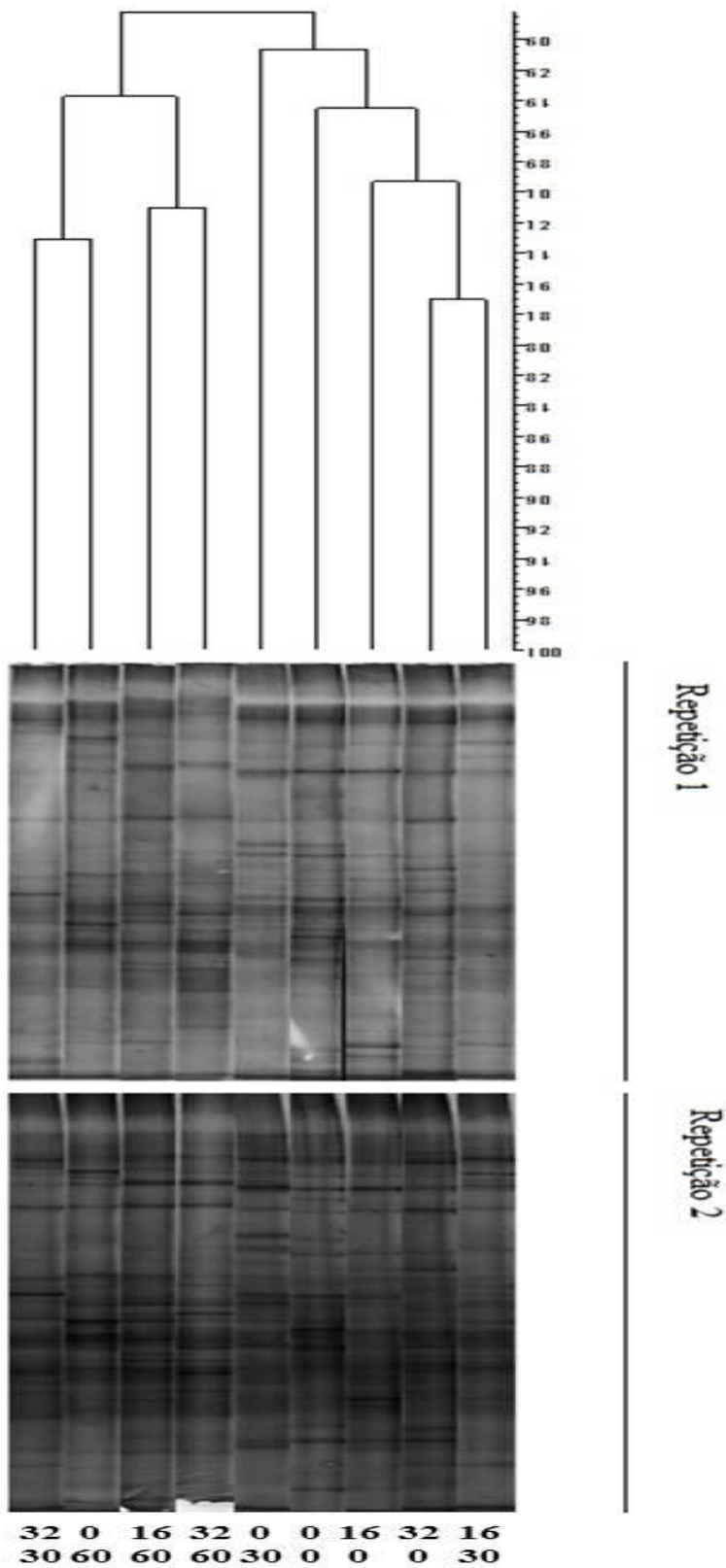


Figura 1 - Dendrograma de dissimilaridade genética do DNA total do solo após a amplificação com *primers* que amplificam a região do gene ribossomal 16S de bactérias obtido pelo método de agrupamento UPGMA.