



IMPACTO DA CONTAMINAÇÃO DE PETRÓLEO NO POTENCIAL DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E DESNITRIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO

Laís Priscila Karas¹, Salomé Urrea-Valencia¹, Rafael Mazer Etto¹, Helyemari Valentim Althaus¹, Christopher Thomas Blum², Carlos Vellozo Roderjan², Daniel Ruiz Potma Gonçalves¹, Daiane de Fátima Barreto¹, Ricardo Ayub³, Carolina Weigert Galvão¹.

RESUMO: Uma maior exploração do petróleo traz como consequência o aumento dos riscos de acidentes e de contaminação ambiental. Nesses casos, as bactérias possuem um papel fundamental no processo de recuperação da área, principalmente por possuírem a capacidade de adaptar-se à mudança das condições ambientais e degradar hidrocarbonetos. Outro fator essencial para a recuperação de áreas contaminadas é o Nitrogênio, uma vez que há a necessidade de 60 mg desse elemento para que ocorra o consumo de 1 g de hidrocarbonetos. Visto a importância de N no processo de restabelecimento do ambiente contaminado o presente trabalho quantificou por qPCR os genes responsáveis pela conversão de N₂ a NH₃ (*nifH*) e NO₂ a N₂ (*nosZ*), em uma área de várzea contaminada por petróleo. A partir dos resultados obtidos é possível sugerir que o petróleo não alterou de forma significativa a abundância de bactérias diazotróficas e desnitrificantes rizosféricas e não rizosféricas.

PALAVRAS-CHAVE: qPCR, *nosZ*, *nifH*.

INTRODUÇÃO

O maior consumo de petróleo em resposta ao crescimento populacional (Sherry et al., 2017) tem aumentado os riscos de acidentes e de contaminação ambiental nos últimos anos (Liang et al., 2009). As bactérias possuem um papel fundamental na recuperação de áreas contaminadas, devido ao seu rápido crescimento, plasticidade genética, flexibilidade metabólica e adaptação às condições ambientais a que estão expostas (Pedroti et al., 2007).

Sabendo-se que são necessários 60 mg de N, para que os microrganismos degradadores de petróleo consumam um grama de hidrocarboneto, as bactérias fixadoras de nitrogênio, exercem um papel fundamental na recuperação de áreas contaminadas com petróleo (Dashti et al., 2015). A enzima nitrogenase, codificada pelos genes *nifHDK*, catalisa a conversão do N₂ à NH₃/ NH₄⁺. Outra enzima importante no ciclo do N é a óxido nitroso redutase codificada pelo

¹Laboratório de Biologia Molecular Microbiana - LABMOM, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa. e-mail: salomeuv@gmail.com

²Laboratório de Dendrologia e Conservação da Flora, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

³Laboratório de Biotecnologia aplicada à Fruticultura. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil.



nosZ. A partir da sua atividade o N_2O é convertido a N_2 , evitando a acumulação e liberação na atmosfera de N_2O , potente gás de efeito estufa.

Diante do exposto, o trabalho teve por finalidade avaliar a abundância de bactérias diazotróficas e desnitrificantes pela técnica de qPCR em uma área de várzea contaminada por petróleo.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de amostras

O local de estudo, pertence à Refinaria Getúlio Vargas (REPAR) em Araucária, Paraná. No ano 2000 quatro milhões de litros de óleo cru vazaram com o rompimento de uma tubulação de transporte (Silva, 2014). O local afetado pelo desastre é uma área de várzea, que possui 5,5 hectares, encontra-se adjacente ao arroio Saldanha, e é influenciada pela dinâmica do rio Barigui. A vegetação local se regenerou espontaneamente, sem interferência antrópica.

A coleta do solo foi realizada no dia 23 de julho de 2018. Foram coletadas doze amostras de solo rizosférico e doze amostras de solo não rizosférico num gradiente de concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo – TPH. A concentração mínima de TPH foi de 200-500; a média de 2000-3000 e a máxima, de 4000- 6400 mg de TPH/kg de solo. O solo rizosférico foi obtido a partir da rizosfera das duas espécies dominantes de Fabaceae no local (*Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli*).

Extração do DNA total da rizosfera e quantificação por qPCR dos genes *nifH* e *nosZ*

A extração do DNA total do solo foi realizada utilizando-se o kit *UltraClean Soil DNA Kit* da MO BIO Laboratories, Inc. seguindo-se as recomendações do fabricante.

A curva padrão para cada par de *primers* foi realizada a partir da diluição seriada de uma concentração conhecida do número de cópias de cada gene, seguindo a metodologia proposta por Stephenson (2016).

As quantificações foram realizadas no termociclador Agilent® AriaMx Real-time, seguindo os parâmetros estabelecidos por Mao e colaboradores (2011), com modificação na temperatura de anelamento de 55°C e 57°C para *nifH* e *nosZ* respectivamente. Foram utilizados os *primers* PolF e PolR (Poly et al, 2001), para determinar a abundância de bactérias diazotróficas, e *nosZ-F* (Kloos et al., 2001), *nosZ-1622R* (Ruiz-Rueda et al., 2009), para determinar a abundância de bactérias desnitrificantes.

A determinação do número de cópias de cada gene foi realizada no software do equipamento, utilizando-se a curva padrão como parâmetro. As análises estatísticas, análise



de regressão e o teste de comparação de médias Tukey ($p < 0,95$) foram realizados no pacote Agricolae (de Mendiburu, 2013) no programa R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de *nifH* detectados (média de 2×10^8 cópias/g de solo; Fig. 1A) foram mais altos do que os registrados para *nosZ* (média de $8,5 \times 10^6$ cópias/g de solo; Fig. 1B) tanto no solo rizosférico quanto não rizosférico. Dias e colaboradores (2012), relataram valores de *nifH* similares ($0,9$ a $3,3 \times 10^8$) em amostras de manguezais que passaram por contaminação ambiental com petróleo. Alto número de cópias do gene *nifH* indica um alto potencial para a FBN na área contaminada e sabendo-se do alto requerimento de N para a bioremediação, também sugere alta capacidade de degradação de hidrocarbonetos (Horel et al., 2014).

Baixo número de cópias do gene *nosZ* indica que há pouca conversão de N_2O a N_2 . A estabilidade no processo de fixação de N pode estar induzindo a redução das taxas de perda por desnitrificação, mantendo assim o nitrogênio biodisponível no ecossistema (Urakawa et al., 2019). Richardson e colaboradores (2015) detectaram $2,5 \times 10^8$ cópias de *nosZ*/g de solo treze anos após a sua contaminação por hidrocarbonetos. O solo não rizosférico apresentou valores de *nifH* e *nosZ* quase seis ou três vezes maiores que o rizosférico, respectivamente.

Ao analisar a abundância dos genes *nifH* e *nosZ* ao longo do gradiente de hidrocarbonetos, não foi detectada nenhuma relação com a concentração de petróleo (Fig. 1A e 1B), indicando que a comunidade de bactérias diazotróficas e desnitrificantes não foram afetadas pela presença do hidrocarboneto ou se adaptaram a essa condição.

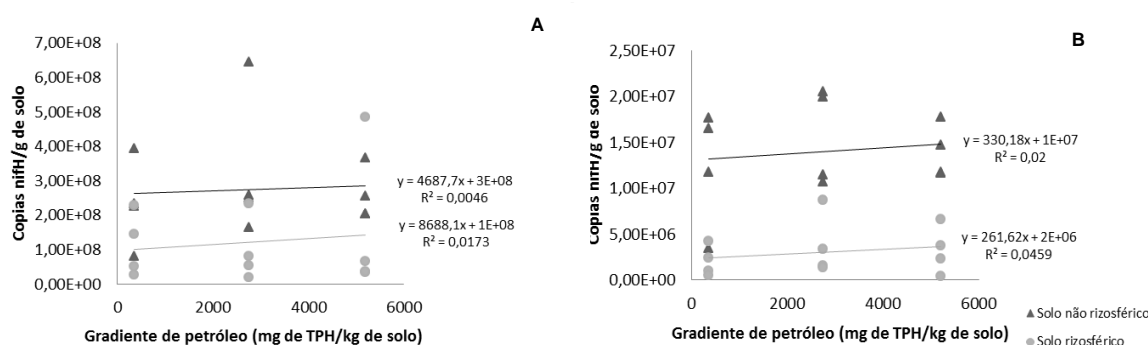


Figura 1. Número de cópias dos genes *nifH* (A) e *nosZ* (B) detectadas ao longo do gradiente de concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), presentes na Refinaria Getúlio Vargas.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos com a quantificação dos genes *nifH* e *nosZ* permitiram constatar que



VI Reunião Paranaense de Ciência do Solo-RPCS

28 A 31 DE MAIO DE 2019

PONTA GROSSA - PR

a concentração de petróleo não possui relação com o número de cópias dos genes, além disso a abundância de bactérias diazotróficas e desnitrificantes indicam que há um equilíbrio entre a fixação biológica de nitrogênio e o consumo de N direcionado à degradação de hidrocarbonetos. Isso deve ter contribuído para a recuperação da área contaminada na Refinaria de Petróleo Getúlio Vargas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à PETROBRAS, INCT, CNPq, CAPES e Fundação Araucária do estado do Paraná pelo suporte financeiro, e o LABMOM /UEPG pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

- Dashti N, Ali N, Eliyas M, Khanafer M, Sorkhoh1 N. A, Radwan S. S. Most Hydrocarbonoclastic Bacteria in the Total Environment are Diazotrophic, which Highlights Their Value in the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants. *Microbes Environ.* 2015; 30:70-75. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14090>
- Dias ACF, Silva MCA, Cotta SR, Dini-Andreote F, Jr. Soares FL, Salles JF, Azevedo JL, Elsas JD, Andreote FD. Abundance and genetic diversity of *nifH* gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78:7960-7967. <https://doi.org/10.1128/AEM.02273-12>
- Horel A, Bernard RJ, Mortazavi B. Impact of crude oil exposure on nitrogen cycling in a previously impacted *Juncus roemerianus* salt marsh in the northern Gulf of Mexico. *Environ Sci Pollut R.* 2014; 21:6982-6993. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2599-z>
- Kloos K, Mergel A, Rösch C, Bothe H. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Aust J Plant Physiol.* 2001; 28: 991-998. <https://doi.org/10.1071/PP01071>
- Liang Y, Li G, Nostrand JDV, He Z, Wu L, Deng Y, Zhang X, Zhou J. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009; 70:324-333. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.013>
- Mao Y, Yannarell AC, Mackie RI. Changes in N-transforming archaea and bacteria in soil during the establishment of bioenergy crops. *Plos One.* 2011; 6: e24750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024750>
- Mendiburu F. *Agricole: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Package Version 1.1-4*; 2013. Disponível em: [https://www.scrip.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1242678](https://www.scrip.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1242678)
- Pedrotti GI. *Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos. [Mestrado em Engenharia Ambiental]. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo: 2007.*
- Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Goubiere F, Monrozier LJ. Comparison of *nifH* gene pools in soils and microenvironments with contrasting properties. *Appl Environ Microb.* 2001; 67: 2255-2262. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2255-2262.2001>
- Richardson EL, King CK, Powell SM. The use of microbial gene abundance in the development of fuel remediation guidelines in polar soils. *Integr Environ Asses.* 2015; 11:235-241. <https://doi.org/10.1002/ieam.1580>
- Ruiz-Rueda O, Hallin S, Bañeras L. Structure and function of denitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009; 67:308-319. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00615.x>
- Silva MYB. *Florística e estrutura de uma formação pioneira com influência flúvio-lacustre 12 anos após derramamento de óleo, Araucária, Paraná. [Doutorado em Engenharia Florestal]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná: 2014.*
- Sherry A, Andrade L, Velenturf A, Christgen B, Gray ND, Head IM. How to access and exploit natural resources sustainably: petroleum biotechnology. *Microb Biotechnol.* 2017; 10:1206-12011.
- Stephenson FH. Real-Time PCR. In: *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology.* 3th ed. [s.l.]: Elsevier; 2016. p. 215-320.



VI Reunião Paranaense de Ciência do Solo-RPCS

28 A 31 DE MAIO DE 2019

PONTA GROSSA - PR

Urakawa H, Rajan S, Feeney ME, Sobecky PA, Mortazavi B. Ecological response of nitrification to oil spill and its impact on the nitrogen cycle. *Environ Microbiol.* 2019; 21:18-33. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14391>