

ANÁLISE COMPARATIVA DA DIVERSIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE *Hydrocotyle bonariensis* LAM, 1789 COLETADA EM SOLO CONTAMINADO E SOLO CONTROLE NO MUNICÍPIO DE MOGI DAS CRUZES, SP.

Paola Lumazini de Moraes¹; Vanessa Nessner Kavamura²; Elisa Espósito³

Estudante do curso de Ciências Biológicas; e-mail: palumazini@hotmail.com¹

Mestre em Biotecnologia; e-mail: van_nessner@yahoo.com.br²

Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: elisa@umc.br³

Área de conhecimento: Microbiologia ambiental.

Palavras-chaves: Metais pesados; Fitorremediação; *Hydrocotyle bonariensis*; microrganismos

INTRODUÇÃO

O rápido desenvolvimento industrial, visando a satisfação pela oferta e procura resultou em graves problemas ambientais. Atualmente a população tornou-se mais crítica e preocupada a respeito das conseqüências da globalização, para isso, estudos vêm sendo realizados com o objetivo de recuperar ecossistemas antropizados. A poluição dos solos pode ser oriunda de derramamentos de petróleo, vazamentos de tanques de armazenamento, pesticidas utilizados na agricultura, aplicação de calcário, lodo de esgoto, fertilizantes fosfatados, aterros sanitários e resíduos industriais, ocasionando muitas vezes em acúmulo de metais pesados. Em quantidades adequadas os metais pesados são importantes em algumas funções fisiológicas e metabólicas dos seres vivos, como transporte de oxigênio e ação enzimática, porém em concentrações elevadas podem afetar a funcionalidade, a biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas (MCBRIDE, 1994). A fitorremediação envolve a utilização de plantas que apresentam potencial para remover, bioacumular e detoxificar diferentes compostos tóxicos ao ambiente. Os microrganismos rizosféricos podem intensificar o processo de descontaminação por auxiliarem a remoção destes do solo, por isso a importância do desenvolvimento de projetos que visem associar a capacidade sinérgica de plantas e microrganismos.

OBJETIVOS

Determinar o potencial de fitorremediação da planta *Hydrocotyle bonariensis* Lam, 1789 coletada em solo contaminado por metais pesados, e em solo controle e identificar os microrganismos rizosféricos associados.

METODOLOGIA

A área de estudo está localizada no Município de Mogi das Cruzes, na bacia hidrográfica do Rio Tietê. O Parque Municipal “Nagib Najjar” possui 48,4 ha e foi utilizada por mais de 40 anos como local para disposição de resíduos sólidos da Companhia Siderúrgica de Mogi das Cruzes (COSIM), especializada na produção de ferro, aço e laminação. Foram realizadas análises físico-químicas com relação aos metais presentes, como Cd, Zn, Cu, Pb, Ca, Mg, Fe, Mn, Ni e Cr em oito pontos diferentes do parque. Para comparação com os resultados obtidos foi utilizado como solo controle, próxima à Serra do Itapety (Parque Municipal Francisco Affonso de

Mello). Para obtenção das bactérias, foram retiradas amostras de 5 g de solo rizosférico de *Hydrocotyle bonariensis* e adicionadas a Erlenmeyers contendo 50 mL tampão PBS, pH 7.4. As amostras foram incubadas a 28°C, sob agitação de 150 rpm durante 1 hora. Após verificação do crescimento pelo método indireto de turbidez da cultura, cada amostra foi submetida a uma diluição seriada de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³, seguida de retirada de alíquotas de 100 µL e semeadura em placas de Petri contendo o meio *Tryptone Soya Agar* (TSA, Oxoid). As placas inoculadas foram incubadas a 28°C, durante 24 horas. Após o crescimento das bactérias, estas foram inoculadas em novas placas de Petri contendo meio TSA para a obtenção de culturas puras. Após 24 horas a 28°C, as bactérias foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB), incubados a 28°C durante 24 horas. A conservação das bactérias foi realizada em triplicatas, onde 1 mL de inóculo, foi transferido para tubos de 1,5 mL, contendo 0,6 mL de glicerol e congelados a -20°C para preservação. Para diferenciação morfológica das bactérias foi realizada coloração diferencial de Gram. Para identificação molecular foram realizadas extrações de DNA 40 amostras de bactérias, sendo 20 bactérias do solo contaminado e 20 bactérias do solo controle, seguido de amplificação do gene 16S rDNA, com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores R1387 e PO27F. As amostras amplificadas foram purificadas utilizando-se o kit *Ultra Clean – PCR Clean-Up* (MOBIO). O DNA total foi quantificado para seqüenciamento e armazenado a -20°C. Os experimentos foram realizados no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da UMC. As amostras a serem seqüenciadas foram enviadas ao setor de Seqüenciamento de DNA, localizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP). Para identificação dos isolados, as seqüências obtidas foram analisadas via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (www.ncbi.nlm.nih.gov) com o banco de dados do GenBank, que compara a seqüência submetida à base de dados. Então, foram selecionadas as seqüências que apresentaram maior similaridade para posterior análise. De modo a avaliar a similaridade dos microrganismos isolados obtidos no solo controle e no solo contaminado e as seqüências obtidas no banco de dados do GenBank, foi utilizado o programa Mega 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007). O alinhamento foi realizado através do aplicativo ClustalW e as seqüências alinhadas foram então usadas para a construção dos dendogramas, por meio do método de Neighbor-Joining, segundo o modelo de Jukes-Cantor, com um *bootstrap* de 1000 réplicas. Para análise de metais absorvidos pela planta, estas foram coletadas nos pontos 2 e 8 do Parque Najib Najar, lavadas com água de torneira para remoção de partículas de poeira e solo, enxaguadas em água deionizada e secas ao ar. Em seguida, as plantas foram separadas em raiz, caule e folhas com o auxílio de uma tesoura e cada parte foi pesada, determinando-se a massa úmida. O material foi seco em estufa a 105°C durante uma noite e deixado em dessecador por duas horas, e então foi determinada a massa seca, a qual foi moída, com o auxílio de um moedor de café até que a obtenção de pó. Então, foi realizada a digestão nítrico-perclórica do material em forno de microondas para determinação dos metais por espectrofotometria de absorção atômica pelo LAPEQ. Com base nas concentrações e produção de massa seca, foram calculadas as quantidades acumuladas dos metais nas folhas, caule e raiz. Foi calculada a porcentagem de acúmulo de metais para cada parte da planta em relação ao acúmulo total e o índice de translocação (IT) dos metais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Parque Najib Najar contém altos teores de metais pesados, principalmente em um dos pontos de coleta (ponto 8), e acima dos valores de referência indicados pela Cetesb. Há

a presença de todos os metais nos tecidos da planta *Hydrocotyle bonariensis*, principalmente Zn, Fe, Mn, Ca e Cu, contribuindo dessa forma para a remoção de metais do solo, tanto no ponto 8, quanto no ponto 2 do Parque. Segundo a tabela abaixo, a acumulação de metais pela planta é superior a maioria dos teores totais de metais presentes no ponto 8 do Parque Nagib Najar, demonstrando que através da fitoextração, a *Hydrocotyle bonariensis* diminui a concentração de metais totais presentes no solo, e que é uma planta com potencial hiperacumulador, corroborando com o trabalho de Prasad e Freitas (2003), o qual indica que o gênero em questão não somente tolera altas concentrações de metais, como auxilia na remoção destes do solo. Provavelmente a biodisponibilidade de metais no solo contaminado é baixa devido à presença dos microrganismos rizosféricos que através dos quelantes agrupam os metais.

Tabela 1. Relação entre biodisponibilidade e teores totais de Ca, Mg, Al, Mn, Fe, Cd, Zn, Ni e Cu presentes no ponto 8 e valores absorvidos no caule, raiz e folhas da planta *Hydrocotyle bonariensis* em mg.g^{-1} .

Metais	Biodisponibilidade mg.g^{-1}	total mg.g^{-1}	Absorvidos pela planta (folha, caule e raiz) mg.g^{-1}
Zn	0,014	0,522	230,9
Mn	0,0038	0,8706	72,8
Fe	0,0293	59,34	1674,2
Cd	0,0004	0,0025	5,03
Ni	0,0003	0,0511	34,5
Cu	0,0028	0,0714	32,9
Ca	2,6968	256,19	65,48
Mg	0,1677	32,5740	4,740
Al	0,0299	2,4000	1,141

A planta apresentou teores acima de 50 % de translocação da maioria dos metais nos dois pontos, apenas com exceção do Al e Fe. Apesar de acumular os metais principalmente em suas raízes, a planta é capaz de translocá-los para o caule e folhas, podendo então, ser adequada para programas de fitorremediação, já que este processo é guiado por três princípios: extração do contaminante do solo, translocação para a parte aérea da planta e seqüestro do contaminante pelas raízes para evitar que sejam lixiviados. Após verificação morfológica dos microrganismos isolados, os resultados obtidos para o solo contaminado foram 15 cocos gram negativo, 21 cocos gram positivo, 21 bacilos gram positivo, e 11 bacilos gram negativo, e no solo controle 12 bacilos gram positivo e 10 bacilos gram negativos. Com base em dendogramas obtidos foram selecionadas bactérias que apresentaram maior similaridade com seqüências do GenBank representando gêneros que são comumente observados em isolamentos de microrganismos de solos (ELLIS *et al.*, 2003). As bactérias isoladas do solo controle apresentam similaridade com *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Bacillus megaterium*, *Lysinibacillus fusiformes*, e *Sphingopyxis sp.*. As bactérias do solo contaminado apresentam similaridade com *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas moraviensis*, *Pseudomonas tessidea*, *Bacillus thuringiensis*, *Chryseobacterium sp.*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans*, *Acetobacter junni* e *Janibacter melonis*. Possivelmente os microrganismos encontrados no solo contaminado possuem resistência aos contaminantes e potencial em processos de biorremediação, principalmente com relação a diversidades de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, as quais

possuem grande tolerância, segundo, trabalhos realizados referentes ao assunto (PRASAD & FREITAS, 2003). A riqueza de espécies do solo contaminado é mais significativa do que a do solo controle. Entretanto, há controvérsias a respeito da diversidade e da funcionalidade microbiana. Segundo Anna (2008) os metais pesados podem causar uma redução na diversidade taxonomica das comunidades dos solos, porém, segundo Leys *et al* (2004) é difícil obter uma conclusão sobre a microbiota de solos contaminados devido ao pequeno número de espécies analisadas, e por existir microrganismos, como por exemplo, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e espécies de *Sphingomonas* presentes em variados tipos de solos, independente de suas propriedades químicas. Nesta discussão deveriam ser avaliados também os microrganismos não cultiváveis para resultados mais amplos sobre a comunidade microbiana da rizosfera.

CONCLUSÕES

Os metais totais (biodisponíveis+não biodisponíveis) foram eficientemente removidos do solo pela planta em estudo. *Hydrocotyle bonariensis* e sua microbiota rizosférica possuem grande potencial em processos de biorremediação, sendo portanto, importantes em projetos que visem a descontaminação de solos por metais pesados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNA, M.; NIKLINSKA, M.; LASKOWSKI, R.. Metal affect soil bacterial and fungal functional diversity differently. Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Krakow, Pol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008.

ELLIS, R.J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C. Cultivation-dependent and-independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3223-3230, 2003.

LEYS, N. M., RYNGAERT, A. BASTIAENS, L. VERSTRAETE, W., TOP, E. M. & SPRINGAEL, D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Environmental Microbiology** 70, p. 1944-1955, 2004.

MCBRIDE, M.D. **Environmental Chemistry of Soils**. New York, Oxford University, 406p, 1994.

PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. M. O. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Department of plant Sciences of India e Departamento de Botânica – Universidade de Coimbra, Portugal., 2003.**