

SIMONE TESSARO

ESTUDO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS METANOTRÓFICAS  
EM UMA CRONOSSEQUÊNCIA DE SOLOS DA AMAZÔNIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Vivian Helena Pellizari

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2012

## RESUMO

TESSARO, S. **Estudo da comunidade de bactérias metanotróficas em uma cronosequência de solos da Amazônia.** 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Bactérias metanotróficas são conhecidas por utilizarem o metano como única fonte de carbono e energia, e possuem importante papel na regulação do fluxo líquido de metano entre o solo e a atmosfera. O gás metano é um dos principais gases que contribuem para o efeito estufa no planeta, tendo uma ação 25 vezes maior do que a do CO<sub>2</sub>, em relação à retenção do calor. A Amazônia possui importante papel no ciclo global do carbono, possuindo um significativo reservatório desse composto. O desmatamento da floresta original para conversão a pastagem é dos principais problemas enfrentados pela Amazônia. As mudanças no uso do solo levam a alterações na comunidade microbiana, podendo alterar as suas funções. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença e a diversidade metanotrófica a partir de amostras de uma cronosequência de solos da Amazônia, onde ocorreu conversão de floresta à pastagem, e posteriormente a vegetação secundária, e verificar se tal manejo do solo influencia na estrutura da comunidade metanotrófica. Para isso técnicas de cultivo e enriquecimento, construção de bibliotecas do gene *pmoA* e a aplicação da técnica de DNA-SIP foram utilizadas. A partir de amostras de solo de floresta primária, secundária e de pastagens, foram realizados enriquecimentos com a finalidade de avaliar o consumo de metano, e realizar extração do DNA total para construir bibliotecas do gene funcional *pmoA* para o estudo da comunidade metanotrófica. Uma amostra de pastagem foi também utilizada para a aplicação da técnica de DNA-SIP <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>, resultando na análise de sequências de três bibliotecas do gene rRNA 16S. As bibliotecas do gene *pmoA* indicaram a presença de bactérias metanotróficas das Famílias Methylocystaceae e Methylococcaceae, sendo que a maioria das sequências obtidas foram agrupadas com sequências relacionadas à família Methylocystaceae e ao gênero *Methylocaldum*. Os resultados da avaliação de consumo de metano demonstram que a comunidade consumidora de metano está ativa para todas as amostras avaliadas. No experimento de DNA-SIP <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>, a recuperação do DNA marcado ocorreu após o consumo de 0,6 mmol de metano no microcosmo do tempo de incubação t<sub>2</sub>. As bibliotecas do gene rRNA 16S do DNA total do solo revelaram a presença de bactérias distribuídas por diversos Filos relacionados a solo. Nas bibliotecas construídas a partir do DNA em que foi incorporado o <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>, foram identificados micro-organismos relacionados ao ciclo do metano, como as metanotróficas pertencentes às famílias Methylocystaceae e Methylococcaceae, além de outros grupos de micro-organismos cujo papel no ciclo do metano não é totalmente conhecido, como os pertencentes à família Methylophilaceae e ao Filo Armatimonadetes (OP10). Apesar de incerto o processo de como ocorre a utilização dos metabólitos da oxidação do metano por estes micro-organismos, a presença destes no ambiente pode ser de grande importância.

**Palavras-chave:** Bactérias metanotróficas. Oxidação do metano. Uso do solo. Amazônia. Pastagem. Gene *pmoA*.

## ABSTRACT

TESSARO, S. **Study of the methanotrophic community present in chronosequence soils from Amazon.** 2012. 94 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Methanotrophic bacteria are known to utilize methane as a single source of carbon and energy, and have an important role in regulating methane flux between soil and atmosphere. Methane is a major gas contributing to global warming on Earth, taking an action 25 times greater than CO<sub>2</sub>, relative to heat retention. The Amazon forest plays an important role in the global carbon cycle, having a significant carbon reservoir. Deforestation of the original forest for the conversion to pasture is a major problem faced by the Amazon forest. Changes in land use lead to changes in soil microbial community, altering the functions of this community. The objective of this study was to investigate the presence and the diversity of methanotrophic bacteria in samples of Amazon forest chronosequence soils, where there have been a conversion of forest to pasture, and then to secondary forest, and verify if such soil management influences the structure of the methanotrophic community. Enrichment and cultivation techniques, gene libraries of *pmoA* gene and application of the DNA-SIP technique were used to achieve this goal. From primary, secondary forest and pasture soil samples, enrichments were performed in order to evaluate the consumption of methane. Functional gene *pmoA* libraries were constructed from total DNA extracted from soils in order to study the methanotrophic community. A pasture sample was used in the DNA-SIP <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> technique, resulting in three sequence analysis of 16S rRNA gene libraries. The *pmoA* gene libraries indicated the presence of methanotrophic bacteria from Families Methylocystaceae and Methylococcaceae, and most of the sequences were grouped with sequences related to Methylocystaceae Family and *Methylocaldum*. The evaluation of methane consumption showed that the methane consuming community is active for all samples. In the DNA-SIP <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> experiment, the recovery of labeled DNA occurred after 0.6 mmol of methane were consumed in the microcosm, - incubation time t<sub>2</sub>. Gene libraries of rRNA 16S from total DNA of soil, revealed the presence of bacteria over several Phyla related to soil. In gene libraries constructed from labeled DNA, methane cycle microorganisms were identified such as the Methylocystaceae, and Methylococcaceae methanotrophic Families. Other groups of microorganisms like Methylophilaceae Family and Armatimonadetes Phylum (OP10) bacteria were also found, but their role in the methane cycle is not fully understood. The knowledge about the process of metabolites from the methane oxidation by these microorganisms may be uncertain, although the presence of this microorganisms in the environment may be important.

**Keywords:** Methanotrophic bacteria. Methane oxidation. Amazon. Soil use. Pastures. *pmoA* gene.

## 1 INTRODUÇÃO

O metano é um dos principais gases que contribuem para o aquecimento do planeta, tendo uma ação 25 vezes maior do que a do CO<sub>2</sub> em relação à retenção do calor (DALTON, 2005; INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007). O protocolo de Kyoto considera de suma importância o controle das emissões deste gás para a atmosfera, intensificando-se assim as pesquisas que visam esclarecer o papel dos micro-organismos envolvidos com o ciclo do metano em diversos ambientes.

As bactérias metanotróficas formam um grupo fisiologicamente distinto pela sua habilidade em usar o metano como única fonte de carbono e energia, desenvolvendo assim um papel importante no ciclo do metano (HANSON; HANSON, 1996). Estas bactérias possuem grande potencial na redução de emissões de CH<sub>4</sub> para a atmosfera, pois podem formar uma espécie de barreira biológica no solo (VISVANATHAN et al., 1999), regulando o fluxo líquido de CH<sub>4</sub> entre o solo e a atmosfera (VERCHOT et al., 2000).

Os níveis de emissões de CH<sub>4</sub> na Amazônia estão aumentando com o passar dos anos (FEIGL et al., 2002; STEUDLER et al., 1996). Desde os anos 70, a Amazônia passa por um processo contínuo de desmatamento, sendo que, muitas destas áreas desmatadas são utilizadas na agricultura e na formação de pastagens para a pecuária (NEPSTAD et al., 2008). Muitas destas pastagens são utilizadas na criação de gado por um determinado período, sendo posteriormente abandonadas, surgindo então uma floresta secundária (FEIGL et al., 2002).

As investigações sobre a estrutura e composição das comunidades microbianas do solo da região Amazônica tem-se intensificado, assim como estudos que tentam compreender qual o impacto gerado pelas mudanças no manejo do solo para estas comunidades (JESUS et al., 2009). O entendimento de como estas comunidades microbianas respondem às perturbações ambientais é crítico para a manutenção e restauração de funções importantes do ecossistema (WU et al., 2006).

Dessa forma, buscando caracterizar a microbiota e compreender as respostas das comunidades microbianas do solo da Amazônia, frente a diferentes formas de uso, o projeto denominado - Monitoramento da Microbiota da Floresta Amazônica - (“Amazon Rainforest Microbial Observatory” - ARMO), ao qual este trabalho está integrado, reuniu pesquisadores da Universidade de São Paulo, Michigan State University, University of Massachusetts at Amherst, University of Oregon e University of Texas at Arlington.

As amostras do projeto ARMO são advindas da Fazenda Nova Vida, em Rondônia, estado este que possui uma das maiores áreas de floresta já comprometida pelo desmatamento. A

Fazenda Nova Vida também integra um dos locais de pesquisa do LBA-ECO (Large Scale Biosphere-Atmosphere Experiment in Amazonia), sendo este um dos maiores programas de investigação internacional para estudar as consequências do desmatamento nos níveis local, regional e global.

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como objetivo pesquisar a diversidade taxonômica e funcional de bactérias metanotróficas a partir de amostras de uma cronossequência de solos da Amazônia, onde ocorreu a conversão de floresta à pastagem, e posteriormente à vegetação secundária, e compreender se tal manejo do solo influencia na estrutura da comunidade metanotrófica.

Para atingir os objetivos foram empregadas as técnicas clássicas de cultivo e avaliação de consumo de  $\text{CH}_4$  *in vitro*, além de técnicas de biologia molecular como a construção de bibliotecas do gene *pmoA* e a Marcação de Ácidos Nucleicos com Isótopos Estáveis” (“DNA - Stable Isotope Probing” - DNA-SIP). A técnica de DNA-SIP tem se mostrado de grande importância para a microbiologia ambiental, pois possibilita estabelecer uma ligação entre filogenia e funcionalidade (CÉBRON et al., 2007 a,b).

## 6 CONCLUSÕES

- As amostras de pastagens (P11, P72 e P04) apresentaram um consumo de metano mais rápido, em relação às amostras de floresta (F) e floresta secundária (S);
- as sequências obtidas a partir das bibliotecas do gene *pmoA* com amostras de solo de floresta primária, floresta secundária e pastagens, foram relacionadas em sua maioria com sequências pertencentes à família Methylocystaceae;
- a técnica de DNA-SIP possibilitou identificar a comunidade metanotrófica ativa, além de outros grupos de micro-organismos, como os pertencentes à família Methylophilaceae e ao gênero *Methylocaldum*, além do Filo OP10, cujo papel no ciclo do metano ainda é incerto;
- o protocolo utilizado para a técnica de DNA-SIP com metano marcado, mostrou-se eficiente para o estudo de bactérias metanotróficas. No entanto para a amostra estudada foi verificada a importância de diminuir o tempo de incubação;

## REFERÊNCIAS \*

- ABELL, G. C. J. et al. Grazing affects methanotroph activity and diversity in an alpine meadow soil. **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 457-465, 2009.
- AMPE, F. et al. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a Fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5464-5473, 1999.
- ANTONY, C. P. et al. Active methylotrophs in the sediments of Lonar Lake, a saline and alkaline ecosystem formed by meteor impact. **The ISME Journal**, n. 4, p. 1470-1480, 2010.
- ATCC. **ATCC medium:** 1306 Nitrate mineral salts medium (NMS). Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/2554.pdf>> Acesso em: 5 mar. 2012.
- BAANI, M.; LIESACK, W. Two isozymes of particulate methane monooxygenase with different methane oxidation kinetics are found in *Methylocystis* sp. strain SC2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 29, p. 10203–10208, 2008.
- BAEK, K.H.; NUSSLEIN, K. "Land use alters the structure of methane-oxidizing", **The ISME-13**, Seattle, WA, 2010.
- BALASUBRAMANIAN, R. et al. Oxidation of methane by a biological dicopper centre. **Nature**, v. 465, p. 115-119, 2010.
- BARLAZ, M. A. et al. Evaluation of a biologically active cover for mitigation of landfill gas emissions. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 4891-4899, 2004.
- BASTOS, T. X.; DINIZ, T. D. A. S. Avaliação do clima do Estado de Rondônia para desenvolvimento agrícola. **Boletim de Pesquisa**, n. 44, p. 187-197, 2004.
- BENDER, M.; CONRAD, R. Effect of CH<sub>4</sub> concentrations and soil conditions on the induction of CH<sub>4</sub> oxidation activity. **Soil Biol. Biochem**, v. 27, p. 1515-1527, 1994.
- BENGTSON, P. et al. Links between methanotroph community composition and CH<sub>4</sub> oxidation in a pine forest soil. **FEMS Microbial Ecology**, v. 70, n. 3, p. 356-366, 2009.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 34-38, 2005.
- BODROSSY, L. et al. Analysis of 16S rRNA and methane Monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. **Archives Microbiology**, v. 168, n. 6, p. 493–503, 1997.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BORJESSON, G.; CHANTON, J.; SVENSSON, B. H. Methane oxidation in two Swedish landfill covers measured with carbon-13 to carbon-12 isotope ratios. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, n. 2, p. 369-371, 2001.

BORJESSON, G. et al. Methane oxidation in landfill cover soils, as revealed by potential oxidation measurements and phospholipid Fatty Acid Analyses. **Soil Biol. Biochem.**, v. 30, p. 1423-1433, 1997.

BOECKX, P.; VAN CLEEMPUT, O.; VILLARALVO, I. Methane Emission from a Landfill and the Methane Oxidising Capacity of its Covering Soil. **Soil Biol. Biochem.**, v. 28, p. 1397-1405, 1996.

BOSCHKER, H. T. S.; MIDDELBURG, J. J. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 1, p. 1334, 2002.

BOWMAN, J. et al. The methanotrophs - the families Methylococcaceae and Methylocystaceae. **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. 3rd ed. Singapura: Springer Science, 2006. v. 5, p. 266-289.

BOURNE, D. G.; McDONALD I. R.; MURRELL, J. C. Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3802-3809, 2001.

CÉBRON, A. et al. Nutrient amendments in soil DNA Stable Isotope Probing experiments reduce the Observed methanotroph diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 798-807, 2007a.

CÉBRON, A. et al. Identity of active methanotrophs in landfill cover soil as revealed by DNA stable isotope probing. **FEMS Microbial Ecology**, v. 62, p. 12-23, 2007b.

CERRI, C. C. et al. Carbon cycling and sequestration opportunities in South America: the case of Brazil. **Soil Use and Management**, v. 20, n. special, p. 248-254, 2004.

CERRI, C. E. P. et al. Potential of soil carbon sequestration in Amazonian Tropical Rain Forest. **Science**, v. 1, n. 1, p. 123-130, 2005.

CONRAD, R. Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. **Advances in Agronomy**, v. 96, p. 1-63, 2007.

CONRAD, R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, p. 285-292, 2009.

COSTELLO, A. M.; LIDSTROM, M. E. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5066-5074, 1999.

CHRISTOPHERSEN, M. et al. Methane oxidation at low temperature in soil exposed to landfill gas. **Journal Environment Quality**. v. 29, n. 6, p. 1989-1997, 2004.



CRISTOSERDOVA, L. Modularity of methylotrophy, revisited. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 2603-2622, 2011.

CHOW et al. Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. **FEMS Microbial Ecology**, v. 42, p. 347–357, 2002.

DALTON, H. The leeuwenhoek lecture 2000: the natural and unnatural history of methaneoxidizing bacteria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London: Series B**, v. 360, p. 1207-1222, 2005.

DAVIDSON, E. A. et al. The Amazon basin in transition. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 321-328, 2012.

DEDYSH, S. N. et al. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from northern peat wetlands. **Science**, v. 282, p. 281–284, 1998.

DEDYSH, S. N. et al. *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 955-969, 2000.

DEDYSH, S. N.; KNIEF, C.; DUNFIELD, P. F. Methylocella Species Are Facultatively Methanotrophic. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 4665-4670, 2005.

DEDYSH, S. N. et al. *Methylocystis heyeri* sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing 'signature' fatty acids of type I methanotrophs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 472-479, 2007.

DE MORAES, J. F. L. et al. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondonia, Brazil. **Geoderma**, v. 70, n. 1, p. 63-81, 1996.

DO CARMO, J. B. et al. A source of methane from upland forests in the Brazilian Amazon. **Geophysical Research Letters**, v. 33, n. 4, 2006.

DORR, N.; GLASSER, B.; KOLB, S. Methanotrophic communities in Brazilian ferralsols from naturally forested, afforested, and agricultural sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 1307–1310, 2010.

DUARTE, R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares**. 2010. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DUBILIER, N.; BERGIN, C.; LOTT, C. Symbiotic Diversity in Marine Animals: The Art of Harnessing Chemosynthesis. **Nature Rev. Microbiology**, v. 6, p. 725-740, 2008.

DUNFIELD, P. F. et al. Isolation of a *Methylocystis* strain containing a novel pmoA-like gene. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, p. 17-26, 2002.

DUNFIELD, P. F. et al. *Methylocella silvestris* sp. nov. a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol Printed in Great Britain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 1231-1239, 2003.

DUNFIELD, P. F. et al. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. **Nature**, v. 450, p. 879-882, 2007.

DUNFORD, E.A; NEUFELD, J.D. DNA stable-isotope probing (DNA-SIP). **J.Vis. Exp.**, 2010.

EINOLA, J. K. M; KETTUNEN, R. H; RINTALA, J. A. Responses of methane oxidation to temperature and water content in cover soil of a boreal landfill. **Soil Biol. Biochem.**, v. 39, p. 1156–1164, 2007.

EINOLA, J. K. M.; KARHU, A. E.; RINTALA, J. A. Mechanically-biologically treated municipal solid waste as a support medium for microbial methane oxidation to mitigate landfill greenhouse emissions. **Waste Management**, v. 28, p. 97-111, 2008.

ENCICLOPÉDIA BRITANNICA. 2010. Disponível em: <<http://www.britannica.com/global-warning>>. Acesso em: 6 jun. 2012.

ESHINIMAEV, B. T.; KHMELENINA, V. N.; TROTSSENKO, Y. N. First isolation of a Type II methanotroph from a soda lake. **Microbiology**, v. 77, p. 628-631, 2008

FEIGL, B. J.; CERRI, C. C.; BERNOUX, M. Balanço de carbono e biomassa microbiana em solos da Amazônia. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p. 423-441.

FERNANDES, S. A. P. et al. Seasonal variation of soil chemical properties and CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, v. 107, p. 227-241, 2002.

FERREIRA, L. V.; VENTICINQUE. E.; ALMEIDA. S. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. Dossiê Amazonia Barsielira I. **Estudo Avançado**, v. 19, n. 53, 2005.

FELSKE, A. et al. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis **Microbiology**, v. 62, p. 4162-4167, 1996.

FOLEY, J. A. et al. Global consequences of land use. **Science**, v. 309, p. 570-574, 2005.

FRANKENBERG, C. et al. Assessing methane emissions from global space-borne observations. **Science**, v. 308, p. 1010–1014, 2005.

GALFORD, G. L. et al. Historical carbon emissions and uptake from the agricultural frontier of the Brazilian Amazon. **Ecological Applications**, v. 21, n. 3, p. 750-763, 2011.

GRAHAM, D. W. et al. Factors affecting competition between type I and type II methanotrophs in two-organism continuous flow reactors. **Microbial Ecology**, v. 25, p. 1–17, 1993.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

