



## **DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA O ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS METANOTRÓFICAS ORIUNDAS DE SOLOS FLORESTAIS**

Rafael Hennel Tulio<sup>1</sup>(06816130928), Kauana Brok Ferreira Pepe<sup>2</sup> (04922817930), Krisle da Silva<sup>3</sup>(03749811911), Marcos Fernando Glück Rachwal<sup>3</sup> (50434233900), Josiléia Acordi Zanatta<sup>3</sup> (02708098993)

**Tema 2: Processos e Propriedades do Solo:** - Biologia do solo;

**RESUMO:** O metano (CH<sub>4</sub>) é considerado um dos gases de efeito estufa (GEE) responsáveis pelo aquecimento global. Mitigar suas emissões é primordial para reduzir o impacto do aumento de temperatura mundial. Uma alternativa para isto seria criar tecnologias para aumentar o consumo de metano via a utilização de bactérias metanotróficas, que oxidam o CH<sub>4</sub> reduzindo sua concentração na atmosfera. Todavia, esse grupo microbiano apresenta algumas limitações no cultivo que exige tempo e muitas repicagens para se obter o isolado puro, impossibilitando avanços tecnológicos no sentido de contribuir para mitigação do CH<sub>4</sub>. Este estudo objetivou testar duas técnicas para o isolamento das bactérias metanotróficas em solos florestais: por diluição até a extinção e por plaqueamento direto. A primeira técnica mostrou-se trabalhosa e demorada, entretanto o crescimento das bactérias em meio dNMS enriquecido com metano em dessecador foi positivo. A segunda técnica foi prática e rápida, o teste colorimétrico revela de maneira eficiente os metanotróficos para purificação, agilizando o processo inicialmente. A caracterização de bactérias eficientes em solos requer a otimização dos métodos de isolamento testados o que requer a continuidade dos estudos.

**PALAVRAS-CHAVE:** gases de efeito estufa, metano, aquecimento global.

### **INTRODUÇÃO**

A concentração de CH<sub>4</sub> na atmosfera permaneceu em 0,700 ppm (partes por milhão), durante milhares de anos. Dados obtidos até o ano de dois mil e quinze mostram elevação para 1,800 ppm. Este hidrocarboneto apresenta o segundo maior potencial de aquecimento global, seu efeito é vinte cinco vezes maior que do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), sendo responsável por aproximadamente 16% do aquecimento atmosférico. Onde atividades antrópicas contribuem com 60% das emissões (Silva et al., 2014).

O metano pode ser utilizado como única fonte de carbono e energia por organismos denominados metanotróficos, classificados em três grupos filogenéticos: tipo I, tipo II e tipo X. Estes, oxidam CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub>, processo catalisado pela enzima metano monooxigenase (MMO) (Knief, 2015).

<sup>1</sup>Estudante de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Bairro: Juvevê, Curitiba - PR, [rafael.tulio@outlook.com](mailto:rafael.tulio@outlook.com).

<sup>2</sup>Estudante, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, R. Imac. Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba - PR.

<sup>3</sup>Pesquisadores, Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111 - Bairro Guaraituba- Colombo - PR.

Solos de florestas nativas contribuem com aproximadamente 6% para o influxo de CH<sub>4</sub> atmosférico global, mas a conversão para agricultura e florestas comerciais, pode impactar essa contribuição. Apesar do consumo de metano atmosférico por solos de florestas nativas e também plantadas, sua concentração na atmosfera é superior a capacidade dos fluxos biogeoquímicos florestais e outras alternativas devem ser investigadas. Desta forma, os estudos com as bactérias metanotróficas como via de mitigação é de extrema importância, todavia, pesquisas sobre isolamento destes microrganismos são escassos em solos no Brasil (Livesley et al., 2009).

O objetivo do trabalho é avaliar, adaptar e padronizar metodologia de isolamento de bactérias metanotróficas oriundas de solo cultivado com *Eucalyptus benthamii*, *Pinus taeda* e solo sob Floresta Ombrófila Mista.

## MATERIAL E MÉTODOS

No método de isolamento por diluição até a extinção o solo foi coletado sob plantio experimental de *Eucalyptus benthamii*, na sede da Embrapa Florestas, localizada no município de Colombo (PR). No método de isolamento por plaqueamento direto o solo foi coletado sob plantio comercial de *Pinus taeda* e sob Floresta Ombrófila Mista, no Município de Rio Negrinho (SC). EM ambas as áreas o solo foi classificado como Cambissolo Húmico Amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0-5 e 5-10 cm e homogeneizadas em peneira de 2,00 mm e armazenadas em geladeira.

O método para isolamento por diluição até extinção de bactérias metanotróficas foi proposto por Hoefman et al. (2012). Amostras de 3 g de solos foram inoculadas em 27 mL do meio dNMS líquido (sais de minerais de nitrato diluído), representando a diluição 10<sup>-1</sup>. As amostras foram então diluídas (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-11</sup>) em tubos contendo meio dNMS. Os tubos foram vedados e injetou-se metano (20%, v/v). As diluições foram incubadas durante cinco semanas a 28 °C. O ensaio foi realizado em triplicatas. Amostras dos tubos que apresentaram maior turbidez (crescimento bacteriano), foram diluídas em microplacas e incubadas por duas semanas em atmosfera enriquecida com metano em dessecador.

Após este período, as maiores diluições, onde houve crescimento bacteriano, foram inoculadas em meio dNMS sólido para o isolamento de metanotróficos. Após obter os isolados puros, estes foram cultivados em meio dNMS e incubados em atmosfera sem CH<sub>4</sub>.

No método de isolamento por plaqueamento direto foi realizado o teste colorimétrico para identificar a atividade da enzima MMO. Amostras de 5 g de solo de mata nativa e de *Pinus taeda* foram transferidas para Erlenmeyers, contendo 45 ml de solução salina. As amostras



foram diluídas ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ). As diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$  foram inoculadas (100  $\mu$ l) sobre dNMS-ágar com auxílio da alça de Drigalski e incubadas por duas semanas em atmosfera enriquecida com  $\text{CH}_4$  em dessecador a 28 °C.

O teste colorimétrico foi realizado utilizando o método descrito por Graham *et al.*, (1992). As bactérias do tipo II oxidam a naftalina em naftol através da enzima MMO. As placas com crescimento bacteriano foram abertas e na tampa foi colocado naftalina, então foram fechadas e incubadas em temperatura ambiente. Posteriormente sobre as colônias borrifou-se o corante Fast Blue B e aguardou-se para o corante reagir com o naftol. A coloração das colônias em roxo ou vermelho indica a atividade da MMO e conseqüentemente a presença de bactérias metanotróficas. Para a obtenção de culturas puras as colônias com a coloração mencionada acima, foram submetidas ao processo de purificação e incubadas por uma semana com  $\text{CH}_4$  (20% v/v). Posterior ao tempo de incubação as placas foram repicadas novamente até obtenção de colônias isoladas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O método de isolamento por diluição até extinção mostrou crescimento de duzentas e sessenta e oito bactérias isoladas, entretanto, estas colônias incubadas em atmosfera sem  $\text{CH}_4$  apresentaram crescimento. Indicando não ser metanotróficas.

O método de isolamento por plaqueamento direto mostrou-se eficiente para identificar colônias metanotróficas presentes no meio dNMS - ágar. Através do método colorimétrico com incubação de duas semanas, trinta e duas colônias bacterianas foram indicadas como metanotróficas, destas uma ficou com a coloração avermelhada e as outras ficaram roxas. Quando a incubação foi feita por seis semanas quinze colônias bacterianas foram indicadas como metanotróficas, sendo quatro com coloração avermelhada e as outras púrpuras. Após o tempo de incubação em dessecador, foi realizado o teste colorimétrico novamente. Foram obtidas vinte e duas colônias bacterianas indicadas como metanotróficas, destas onze colônias exibiram cor avermelhada, uma colônia ficou amarela e as outras ficaram roxas.

Existe amplo interesse nas bactérias metanotróficas pela sua capacidade de oxidar  $\text{CH}_4$  e assim, reduzir suas concentrações na atmosfera, entretanto o principal problema advém das dificuldades de isolamento e cultivo destas bactérias. Não existe ainda um método universal para o isolamento e purificação destes microrganismos (Brindha & Vasudevan, 2017).

<sup>1</sup>Estudante de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Bairro: Juvevê, Curitiba - PR, [rafael.tulio@outlook.com](mailto:rafael.tulio@outlook.com).

<sup>2</sup>Estudante, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, R. Imac. Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba - PR.

<sup>3</sup>Pesquisadores, Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111 - Bairro Guaraituba- Colombo - PR.

A maior parte dos estudos foi realizada com solos localizados em áreas temperadas (Ojima *et al.*, 1993). Até o momento não há estudos para padronizar o isolamento de bactérias metanotróficas em solos de florestas tropicais e subtropicais do hemisfério Sul.

O isolamento por diluição até extinção mostrou-se trabalhoso e demorado, exigiu mais de uma etapa de enriquecimento, seguido de diluição em série e extensa purificação. Contudo, a incubação e crescimento de bactérias em atmosfera enriquecida com CH<sub>4</sub> em dessecador mostrou-se promissor.

O isolamento por plaqueamento direto foi eficiente, prático e rápido. Este método não precisa de extensa purificação para obter colônias isoladas, o contato da naftalina com as colônias presentes em meio dNMS- ágar e o corante Fast Blue B indicam as colônias metanotróficas pela sua mudança de coloração, e mostrou-se promissor.

## CONCLUSÕES

A técnica apresentada no método de isolamento por diluição até extinção apresenta potencial para a obtenção de metanotróficos, entretanto, neste estudo, apresentou grande crescimento de contaminantes. Assim, são necessários avaliar alguns parâmetros do processo, como tempo de incubação, temperatura e adição de dióxido de carbono. O método de isolamento por plaqueamento direto mostrou-se eficiente para identificar bactérias metanotróficas. No entanto, esta técnica é voltada para as bactérias do tipo II, sendo necessário o uso de outros métodos para isolar os outros grupos metanotróficos.

## REFERÊNCIAS

- Brindha, R. K., & Vasudevan, N. (2017). Methane oxidation capacity of methanotrophs isolated from different soil ecosystems. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15(9), 1931-1940.
- Graham DW, Korich DG, LeBlanc RP, Sinclair NA, Arnold RG (1992) Application of a colorimetric plate assay for soluble methane monooxygenase activity. *Appl Environ Microbiol* 58:2231–2236.
- Hoefman, S., Ha, D. V., Vos, P. D., Boon, N., & Heylen, K. (2012). Miniaturized extinction culturing is the preferred strategy for rapid isolation of fast-growing methane-oxidizing bacteria. *Microbial Biotechnology*, 5(3), 368-378.
- Knief, C. (2015). Diversity and Habitat Preferences of Cultivated and Uncultivated Aerobic Methanotrophic Bacteria Evaluated Based on pmoA as Molecular Marker. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Livesley, S. J., Kiese, R., Miehle, P., Weston, C. J., Butterbach-Bahl, K., & Arndt, S. K. (2009). Soil-atmosphere exchange of greenhouse gases in a Eucalyptus marginata woodland, a clover-grass pasture, and Pinus radiata and Eucalyptus globulus plantations. *Global Change Biology*, 15(2), 425-440.
- Ojima, D., Valentine, D., Mosier, A., Parton, W., & Schimel, D. (1993). Effect of land use change on methane oxidation in temperate forest and grassland soils. *Chemosphere*, 26(1-4), 675-685.
- Silva, N. S., Guzmán, Y. S., Dendooven, L., & Guido, M. S., (2014). Methanogenesis and Methanotrophy in Soil: A Review. *Pedosphere*, 24(3), 291-307.