



28 A 31 DE MAIO DE 2019

PONTA GROSSA - PR

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

Rafael Hennel Tulio [REDACTED] Kauana Brok Ferreira Pepe² [REDACTED] Krisle da Silva³ [REDACTED] Marcos Fernando Glück Rachwal³ [REDACTED] Josiléia Acordi Zanatta³ [REDACTED]

RESUMO: O metano (CH₄) 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 CH₄ 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 CH₄. 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 CH₄ 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 (CO₂), 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 CH₄ a CO₂, processo catalisado pela enzima metano monooxigenase (MMO) (Knief, 2015).

¹Estudante de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Bairro: Juvevê, Curitiba - PR, rafael.tulio@outlook.com.

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

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

Solos de florestas nativas contribuem com aproximadamente 6% para o influxo de CH₄ 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 10⁻¹. As amostras foram então diluídas (10⁻² a 10⁻¹¹) 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 CH₄.

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 μ l) sobre dNMS-ágar com auxílio da alça de Drigalski e incubadas por duas semanas em atmosfera enriquecida com 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 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 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 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).

¹Estudante de Pós Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Bairro: Juvevê, Curitiba - PR, rafael.tulio@outlook.com.

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

³Pesquisadores, 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 CH₄ 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.



FAUNA EPIEDÁFICA EM PLANTIO DE *Dendrocalamus giganteus* SUBMETIDO À DOSES DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO

Jéssica Camile da Silva¹, Ketrin Lorhayne Kubiak², Luis Felipe Wille Zarzycki², Ariane Sommer Rebolho², Dinéia Tessaro³

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade da fauna epiedáfica em plantio de *Dendrocalamus giganteus* submetido a doses de Nitrogênio, Fósforo e Potássio. Em cada parcela foram dispostas cinco armadilhas *pitfall-trap*, as quais permaneceram a campo por sete dias, sendo então removidas e seu conteúdo identificado ao menor nível taxonômico possível, com posterior análise dos dados através da análise de variância, índices ecológicos e análise de componentes principais. Entre os grupos amostrados, Collembola e Formicidae foram os mais expressivos, não observado-se diferença significativa entre os tratamentos. As doses de Nitrogênio e Fósforo apresentaram maior diversidade e riqueza de Margalef. A análise de componentes principais indicou separação das doses de Potássio, contudo com poucos grupos relacionados, indicando preferência da fauna epiedáfica pelas doses de Nitrogênio e Fósforo.

PALAVRAS-CHAVE: bambu, invertebrados, adubação, fauna do solo.

INTRODUÇÃO

O bambu da espécie *Dendrocalamus giganteus* apresenta potencial de desenvolvimento em quase todas as regiões do Brasil, apresentando rápido crescimento, versatilidade de usos e resistência mecânica (Lopes et al., 2002). No entanto, poucas são as pesquisas referentes ao manejo da adubação do bambu em condições brasileiras e, desta forma, produtores utilizam recomendações de manejos de outras culturas (Mendes, 2010).

A fauna do solo, por mostrar-se sensível as modificações ocorridas no ambiente, principalmente o manejo do solo adotado e cultivos empregados (Baretta et al., 2014), pode sofrer influência direta em sua composição de acordo com o uso de fertilizantes e acúmulo de matéria orgânica no solo (Moço et al., 2010) devido ao seu papel funcional na aceleração da decomposição e na transformação de nutrientes (Yang e Chen, 2009). Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a diversidade dos grupos taxonômicos da fauna epiedáfica

¹Mestranda, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, estrada para Boa Esperança km 4, jessika.camile5@gmail.com

²Graduando, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, estrada para Boa Esperança km 4.

³Professora, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, estrada para Boa Esperança km 4.