



COMUNICADO
TÉCNICO

457

Colombo, PR
Outubro, 2020



Bactérias metanotróficas obtidas de solos florestais utilizando diferentes metodologias para o isolamento

Krisle da Silva
Kauanna Brok Ferreira Pepe
Rafael Hennel Túlio
Letícia Corrêa Marcondes
Marcos Fernando Glück Rachwal
Josiléia Acordi Zanatta

Bactérias metanotróficas obtidas de solos florestais utilizando diferentes metodologias para o isolamento

Krisle da Silva, Engenheira-agrônoma, doutora em Microbiologia Agrícola, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Kauanna Brok Ferreira Pepe**, Acadêmica de Agronomia na PUC, Curitiba, PR; **Rafael Hennel Túlio**, Biólogo, mestrando em Ciência do Solo na UFPR, Curitiba, PR; **Leticia Corrêa Marcondes**, Acadêmica de Biologia na PUC, Curitiba, PR; **Marcos Fernando Glück Rachwal**, Engenheiro-agrônomo, doutor em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Josiléia Acordi Zanatta**, Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR

Os microrganismos do solo são responsáveis por diversos processos essenciais para a manutenção dos ecossistemas. Dependendo das condições, os solos podem emitir ou absorver óxido nitroso (N_2O) e metano (CH_4) e reduzir as emissões de dióxido de carbono (CO_2), (Serrano-Silva et al., 2014), que são gases responsáveis pelo aumento de temperatura global, conhecidos como gases de efeito estufa (GEE). Entre os GEEs, o CO_2 é o mais abundante gás na atmosfera, seguido pelo CH_4 , no entanto, este último possui potencial de eficiência radiativa 26 vezes maior que o CO_2 (Stocker, 2013), sendo responsável por aproximadamente 16% do aquecimento atmosférico (Aydin et al., 2010; Serrano-Silva et al., 2014). Fontes naturais de emissão de metano representam 40%, enquanto as antrópicas representam 60%, incluindo conversão do uso do solo, agricultura, fermentação entérica, resíduos, energia, indústria e aterros sanitários (Bogner; Matthews, 2003; Serrano-Silva et al.,

2014; Jhala et al., 2016). A principal forma de remoção de CH_4 é a oxidação por radicais de hidroxilas (OH) que é produzida fotoquimicamente na atmosfera (Wuebbles; Hayhoe, 2002), no entanto, o solo também é uma alternativa de remoção, sendo responsável por aproximadamente 5% da remoção deste gás, devido à atividade de bactérias metanotróficas (Stocker, 2013).

Bactérias metanotróficas são bactérias aeróbias que utilizam o CH_4 como única fonte de carbono para o seu crescimento (Dedysh; Dunfield, 2014). Estas fazem parte de um subgrupo de bactérias denominadas bactérias metilotróficas que utilizam, como única fonte de carbono e energia para o seu crescimento, compostos que não contenham ligações carbono-carbono e assimilam carbono na forma de fomaldeídos ou uma mistura de formaldeído e CO_2 (Hanson; Hanson, 1996; Chistoserdova et al., 2009). As bactérias metanotróficas constituem uma importante ferramenta biológica para a mitigação de CH_4 , com

papel fundamental na redução deste gás na atmosfera e, conseqüentemente, no aquecimento global (Schnyder et al., 2018).

As bactérias metanotróficas têm sido classificadas em dois tipos dentro do filo bacteriano Proteobacteria (Bowman, 2006), sendo a rota de assimilação de carbono (formaldeído) a principal característica que distingue os dois grupos (Knief, 2015). O tipo I emprega a via monofosfato ribulose para a assimilação de formaldeído e são pertencentes à classe Gammaproteobacteria, enquanto o tipo II emprega a via da serina para a assimilação de formaldeído e são encontradas na classe Alphaproteobacteria (Hanson; Hanson, 1996). Bactérias metanotróficas do tipo I possuem gêneros como *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus* e *Methylocaldum* e o tipo II incluem gêneros como *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella* e *Methylocapsa* (Bowman, 2006; Knief, 2015). Apesar dessa divisão ter sido adotada, ela tem entrado em desuso, por existir muitas exceções entre os grupos, sendo assim preferida a classificação filogenética (Knief, 2015). Além disso, técnicas de biologia molecular têm revelado outros grupos de metanotróficas não cultiváveis e não pertencentes ao filo Proteobacteria, como o Verrucomicrobia (Dunfield et al., 2007) e filo NC10 (Ettwig et al., 2010).

O metano absorvido pelas bactérias é oxidado a metanol, por meio de enzimas metano mono-oxigenases (MMO) (Dedysh; Dunfield, 2014), posteriormente transformado em formaldeído para a

sua assimilação. Duas formas de MMO podem ser encontradas em bactérias metanotróficas, uma é a forma solúvel (sMMO), que se encontra no citoplasma e a outra é particulada (pMMO) que está ligada à membrana celular (Chowdhury; Dick, 2013). Enquanto a sMMO é encontrada somente em algumas espécies de metanotróficas, a pMMO está presente em praticamente todas, exceto *Methylocella* sp. (Chowdhury; Dick, 2013) e células com a presença de pMMO possuem maior afinidade por metano do que aquelas que contenham sMMO (Hanson; Hanson, 1996). As duas formas da MMO são expressas dependendo da concentração de cobre no ambiente durante o seu desenvolvimento, sendo que a sMMO se expressa quando há baixos níveis e a pMMO quando há altos níveis e, nesse caso, não há detecção da expressão de sMMO (Choi et al., 2003; Hanson; Hanson, 1996).

As bactérias metanotróficas podem ser encontradas em ecossistemas terrestres e aquáticos, sendo sua ocorrência influenciada por fatores bióticos e abióticos, como concentração de metano e oxigênio, disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, salinidade, disponibilidade de água, teor de umidade do solo, cobertura vegetal, textura do solo, teor de cobre, relação carbono-nitrogênio (C:N) e estações sazonais (Knief, 2015; Serrano-Silva et al., 2014). O isolamento de bactérias metanotróficas é uma etapa inicial de futuras biotecnologias com foco no aumento do consumo de metano. O processo de isolamento é longo, com incubações que geralmente ultrapassam

quatro semanas e com grande número de contaminantes, isto é, fungos e outras bactérias não metanotróficas. Este trabalho descreve duas estratégias de isolamento de bactérias metanotróficas, a partir de amostras de solos coletados em plantações de *Pinus taeda* L. e de florestas secundárias. Para isto, foram avaliadas duas estratégias: 1) cultura de enriquecimento e 2) diluição até extinção.

Metodologias utilizadas para o isolamento

Amostragem de solo

Amostragens de solo foram realizadas nos municípios de Rio Negrinho (SC) e Telêmaco Borba (PR), em áreas de plantio de *Pinus taeda* e florestas secundárias, como referências, em fevereiro de 2019. Apesar de terem sido exploradas no passado, ambas as florestas nativas têm sido preservadas atualmente. Em Rio Negrinho (25°20' Sul e 49°14' Oeste), a coleta de solo foi realizada em área de *P. taeda* implantado em 2013, no espaçamento de 2,5 m x 2,5 m, e em uma Floresta Ombrófila Mista no estágio sucessional intermediário para avançado. Em Telêmaco Borba (24°19' Sul e 50°36' Oeste) a coleta foi realizada em área de *P. taeda* implantado em 2015, no espaçamento 3,33 m x 1,88 m, e em uma Floresta Estacional Semidecidual com zona de contato com Floresta Ombrófila Mista. O solo da área

é classificado como Latossolo vermelho distrófico textura muito argilosa. Para cada local e uso do solo foram coletadas três amostras compostas constituindo a mistura de cinco amostras simples, na profundidade de 0-10 cm, obtidas com pá de corte. As amostras de solos foram colocadas em sacos plásticos e acondicionadas em geladeira, no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Florestas. As amostras foram peneiradas em malha de 4 mm e, na sequência, dois métodos de isolamento foram testados: cultura de enriquecimento e diluição até a extinção.

Meios de cultivos utilizados

Para o isolamento de bactérias metanotróficas foi utilizado o meio M2 (Dedysh et al., 1998), com a adição de solução de micronutrientes (Bowman, 2006; Dedysh; Dunfield, 2014). Este meio foi escolhido por ser mais apropriado para o isolamento a partir de amostras de solos, como descrito por Dedysh e Dunfield (2014). A composição do meio M2 e da solução de micronutrientes é apresentada na Tabela 1. Após o preparo, os meios foram autoclavados por 20 minutos, sob temperatura de 120 °C e pressão de 128 atm. Além do meio M2, foi utilizado também o meio ágar nutriente (Wollun, 1982) que é um meio específico para o crescimento de bactérias totais. Após a obtenção dos isolados bacterianos, estes foram repicados em meio ágar nutriente que possui fonte de

carbono prontamente disponível. Se o isolado crescer, não é considerada uma bactéria metanotrófica. A composição do meio ágar nutriente é apresentada na Tabela 1.

Cultura de enriquecimento

Cinco gramas de solo das áreas amostradas foram colocados em tubos

de ensaio contendo 2,7 mL do meio M2 líquido estéril. O tubo foi, então, vedado com tampa de borracha e, por meio de seringa, foram retirados 20% do ar e injetados 20% de gás metano puro. Os tubos contendo meio M2 + solo foram incubados sob temperatura de 20 °C, por dez semanas. O ensaio foi realizado em duplicata. Na Figura 1 encontra-se a imagem dos tubos de ensaio com meio M2 e solo utilizados no experimento.

Tabela 1. Meios de culturas e solução de micronutrientes utilizados nas estratégias de isolamento de bactérias metanotróficas em solos florestais.

Meios e solução de micronutrientes	Gramas ou mililitro por litro de H ₂ O
M2 (Dedysh et al., 1998) pH: 5,5	KNO ₃ (0,25); KH ₂ PO ₄ (0,10); MgSO ₄ .7H ₂ O (0,05); CaCl ₂ .2H ₂ O (0,01); NaCl ₂ (0,02); Solução de Micronutrientes (1 mL); Ágar (15,0)
Solução de Micronutrientes (Bowman, 2006; Dedysh; Dunfield, 2014)	NaMoO ₄ .2H ₂ O (0,003); Na ₂ EDTA (0,5); FeSO ₄ .7H ₂ O (0,2); MnCl ₂ .4H ₂ O (0,003); CoCl ₂ .6H ₂ O (0,02); ZnSO ₄ .7H ₂ O (0,01); CuSO ₄ .5H ₂ O (0,3); NiCl ₂ .6H ₂ O (0,002); H ₃ BO ₃ (0,03)
Ágar nutriente (Wollun, 1982) pH: 6,8	Peptona (5,0); Extrato de carne (3,0); Extrato de Levedura (1,0); Ágar (15,0); Glicose (5,0)



Figura 1. Tubos de ensaio contendo o meio M2 + amostras de solos com 20% de metano.

Após dez semanas, as amostras foram diluídas em solução salina (NaCl 0,85%) de 10^{-1} a 10^{-5} . Para isto, os tubos contendo as amostras incubadas foram agitados manualmente e 500 μ L da solução foram retirados e adicionados em tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina previamente esterilizada, representando a diluição 10^{-1} . Da diluição 10^{-1} , após agitação, foram retirados 500 μ L e adicionados em um novo tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina, representando a diluição 10^{-2} . Este procedimento foi repetido até a obtenção da diluição 10^{-5} . As diluições 10^{-3} a 10^{-5} foram, então, utilizadas para o isolamento de bactérias metanotróficas. Para isto, 100 μ L de cada diluição foram inoculados em meio M2 sólido em placas de Petri, com auxílio da alça de Drigalski. Para evitar o crescimento de fungos, o meio M2 sólido foi preparado com cicloheximida, na concentração de 100 mg L⁻¹. As placas foram, então, acondicionadas em dessecadores e a atmosfera enriquecida com 20% de gás metano puro. As placas foram incubadas sob temperatura de 20 °C, por duas semanas. Posteriormente, as colônias totais foram contadas e as típicas de bactérias metanotróficas (colônias grandes) foram selecionadas para isolamento. Após a obtenção dos isolados puros e típicos de bactérias metanotróficas, estas foram inoculadas em meio ágar nutriente. O crescimento no meio ágar nutriente indica que a bactéria não é metanotrófica. As bactérias que não apresentaram crescimento em meio

ágar nutriente também foram repicadas em meio M2 líquido, sem ágar e aquelas que cresceram foram, então, selecionadas como metanotróficas.

Bactérias obtidas pela cultura de enriquecimento

No total foram contadas 1.743 colônias, nas duas áreas, em *Pinus taeda* e Floresta (Figura 2). Em ambos os municípios, o número de colônias obtidas foi maior nas amostras de solos coletadas em plantação de *P. taeda* do que aquelas coletadas em floresta. No entanto, a maioria dessas colônias não são típicas de bactérias metanotróficas, pois crescem no meio utilizando pequenas quantidades de polímeros contidos no ágar ou utilizando o metanol, que é um produto produzido por bactérias metanotróficas na oxidação do metano (Dedysh; Dunfield, 2014).

Segundo Dedysh e Dunfield (2014), bactérias metanotróficas são geralmente as colônias grandes, sendo que as não metanotróficas geralmente são pequenas, planas e transparentes. Assim, foram selecionadas as colônias maiores presentes nas placas de Petri (Figura 3), obtendo-se 133 das 1.743 colônias obtidas. Para a área de *P. taeda* foram obtidos 38 e 51 isolados de Rio Negrinho e Telêmaco Borba, respectivamente (Figura 4). Para as áreas de Florestas secundárias, foram obtidos 21 e 23 isolados de Rio Negrinho e Telêmaco Borba, respectivamente (Figura 4).

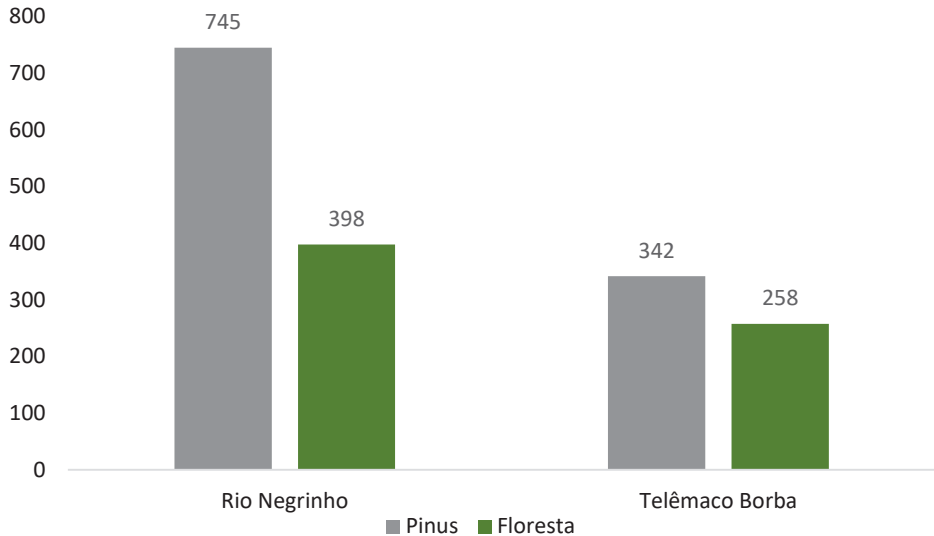


Figura 2. Total de colônias obtidas em meio M2 sólido após a cultura de enriquecimento de amostras coletadas em áreas de *Pinus taeda* e de florestas nativas secundárias.

Foto: Krisle da Silva

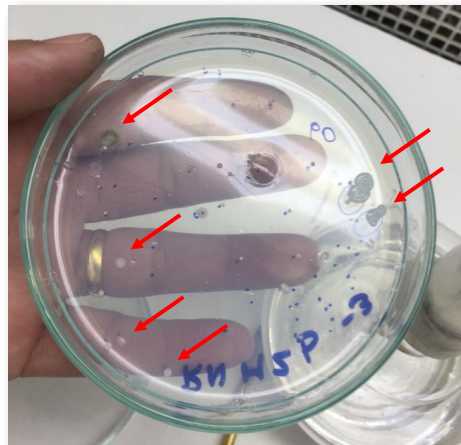


Figura 3. Exemplos das colônias típicas de bactérias metanotróficas

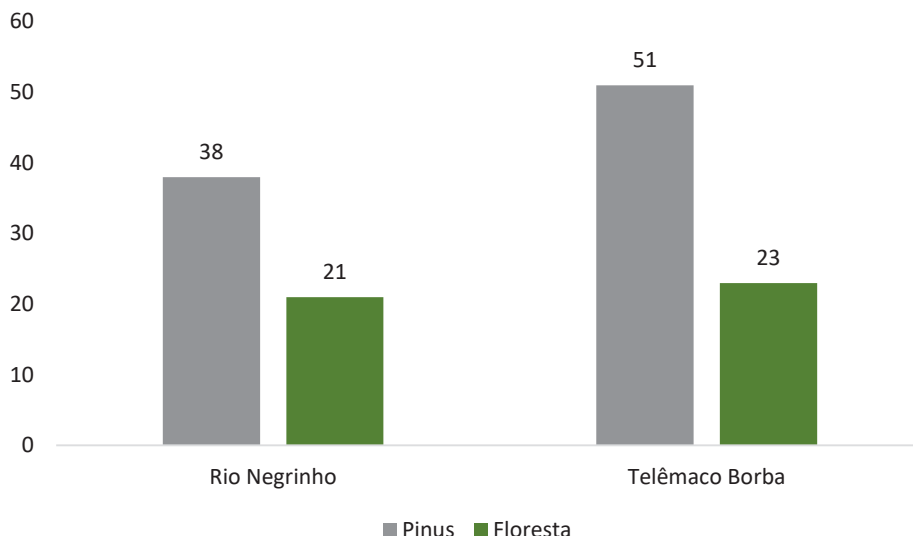


Figura 4. Total de colônias típicas de metanotróficas em meio M2 sólido, após a cultura de enriquecimento de solos coletados, em áreas de *P. taeda* e de Florestas secundárias.

Dos 133 isolados, após o teste em crescimento no meio ágar nutriente (sem metano), apenas 21 não cresceram, que é um indicativo de serem pertencentes ao grupo de bactérias metanotróficas. Na Figura 5 é possível observar as bactérias repicadas em meio ágar nutriente. No entanto, quando os 21 isolados bacterianos foram cultivados em meio

M2 líquido e com incubação de metano, apenas 13 cresceram. Assim, mediante método de cultura de enriquecimento foram obtidos 13 isolados bacterianos, sendo nove isolados das áreas de florestas secundárias (seis de Rio Negrinho e três de Telêmaco Borba) e quatro de área de *P. taeda* (todas de Telêmaco Borba).

Foto: Krisle da Silva

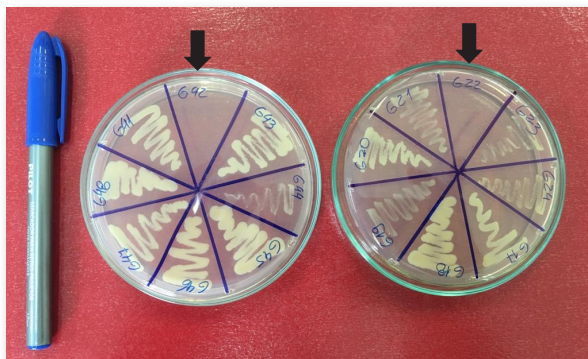


Figura 5. Bactérias isoladas após repicagem ao meio ágar nutriente, após dez dias de incubação sob temperatura de 28 °C. As setas pretas indicam isolados que não cresceram em meio ágar nutriente, que é um indicativo para bactérias metanotróficas.

Diluição até a extinção

Para este método, foram utilizados 5 g de amostras de solos coletadas nas áreas descritas e colocadas em Erlenmeyer contendo 45 mL de M2 líquido, representando a diluição 10^{-1} . Estes foram agitados com 150 rpm por 30 minutos. Após a agitação, os frascos Erlenmeyers permaneceram em repouso por 30 minutos e uma alíquota de 300 μL foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 2,7 mL de meio M2 líquido, representando a diluição de 10^{-2} (Figura 6). Esta etapa foi repetida até a diluição 10^{-5} . Os tubos de ensaios foram vedados com tampa de borracha e 20% do ar foram substituídos por gás metano puro. Os tubos foram incubados sob temperatura de 20 °C, por dez semanas. O ensaio foi realizado em triplicata e, para cada repetição, foi adicionado um controle com meio M2 sem solo diluído.

Após esse período, os tubos que apresentaram turbidez (um indicativo de crescimento bacteriano) foram selecionados e diluídos em microplacas de 96 poços contendo 180 μL de meio

M2 líquido (Figura 7). Foram inoculados 20 μL de cada tubo com turbidez em dois poços da microplaca, onde foram misturados com auxílio de uma micropipeta multicanal e 20 μL foram retirados e inoculados no próximo poço. O primeiro poço representou a rediluição 10^{-1} , sendo o último a 10^{-7} . As microplacas foram acondicionadas em dessecadores e incubadas com gás metano (20%) por duas semanas sob temperatura de 20 °C.

Após este tempo, os poços que apresentaram turbidez nas maiores diluições (Figura 8A) foram inoculados (10 μL) em placas de Petri contendo meio M2 sólido e incubados em dessecadores com 20% de metano sob temperatura de 20 °C, por duas semanas. Após crescimento (Figura 8B), estas foram repicadas para observar a sua pureza em meio M2 sólido. Posteriormente, os 139 isolados foram repicados ao meio ágar nutriente e incubados sob temperatura de 28 °C, por dez dias. Aqueles que não apresentaram crescimento foram avaliados quanto ao crescimento em meio líquido M2.

Foto: Foto: Krisle da Silva

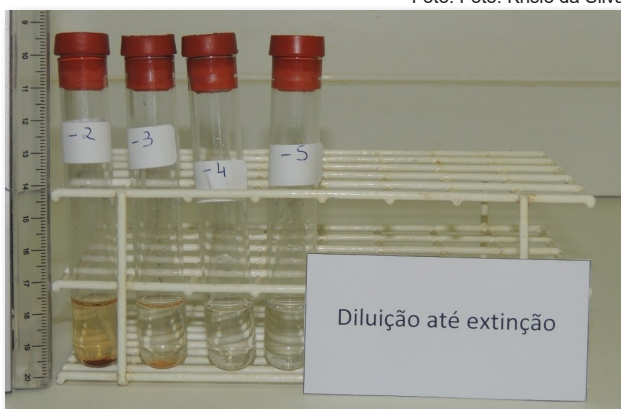


Figura 6. Diluição seriada (10^{-2} a 10^{-5}) das amostras de solo em meio M2 líquido para o isolamento de bactérias metanotróficas obtidas de solos sob plantação de *P. taeda* e Florestas secundárias.

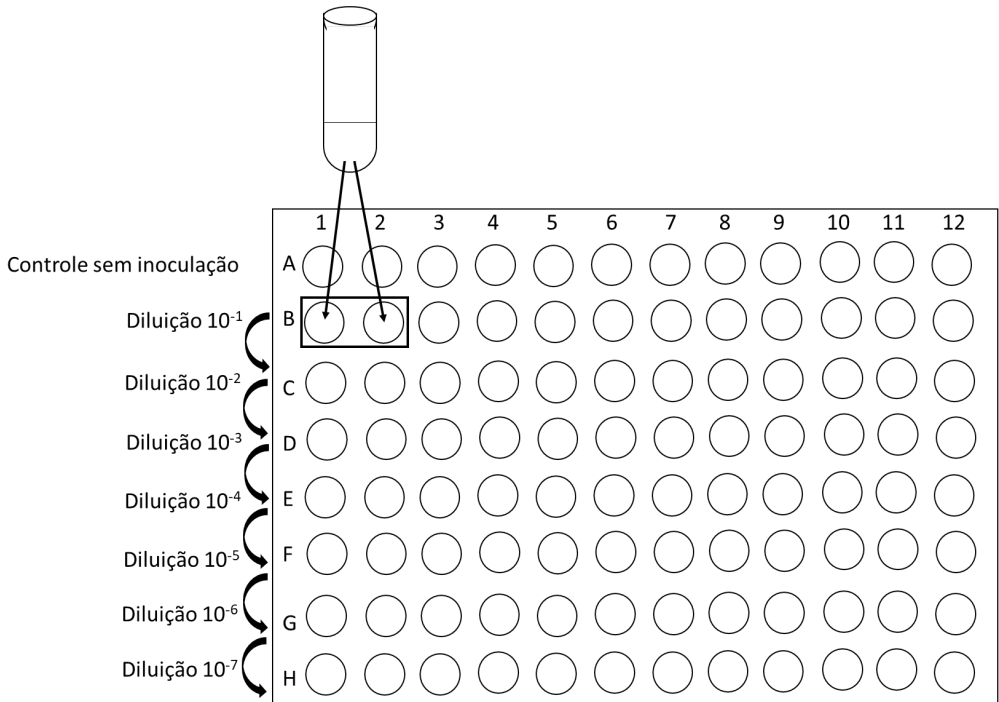


Figura 7. Esquema de diluição até a extinção em microplacas contendo 180 μ L de meio M2.

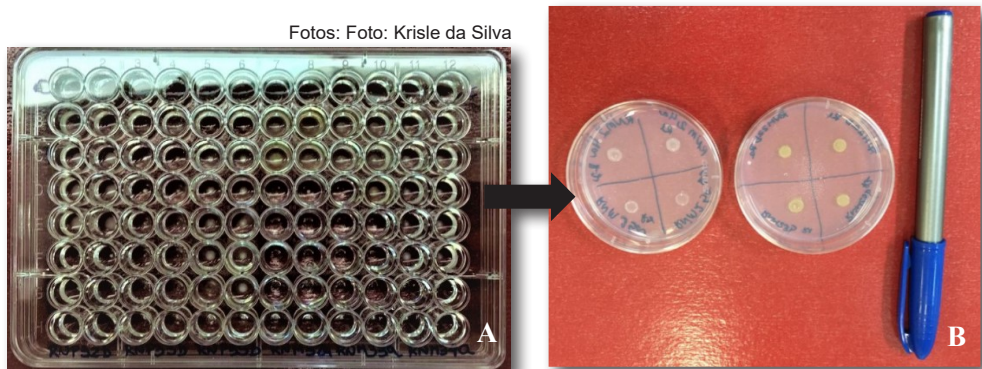


Figura 8. Microplaca de diluição até a extinção com crescimento bacteriano após duas semanas de incubação (A) e crescimento bacteriano em meio M2 sólido após a inoculação das amostras diluídas com crescimento na microplaca (B).

Bactérias obtidas mediante diluição até extinção

Dos 139 isolados bacterianos obtidos, 88 foram de solos sob Florestas secundárias e 51 de solos sob *P. taeda* (Figura 9). O número de isolados obtidos nos solos dos dois municípios foram equivalentes. Diferentemente do método de cultura de enriquecimento, o método de diluição até extinção apresentou um número maior de isolados bacterianos totais obtidos de áreas de Florestas secundárias, indicando que estratégias diferentes podem selecionar grupos diferentes de bactérias metanotróficas, para as áreas amostradas.

Do total de isolados obtidos, após a inoculação em meio ágar nutriente, apenas nove isolados não apresentaram crescimento bacteriano e foram

capazes de crescer em meio M2 líquido, indicando a característica de bactérias metanotróficas. Destes isolados, seis foram obtidos em áreas de Florestas secundárias (4 isolados do município de Telêmaco Borba e 2 de Rio Negrinho) e três da área de *P. taeda* (2 isolados de Telêmaco Borba e 1 de Rio Negrinho).

Considerações finais

Neste estudo, duas metodologias de isolamento foram avaliadas: o método de cultura de enriquecimento e o de diluição até a extinção. Ambas as metodologias se mostraram eficientes para o isolamento de bactérias metanotróficas, sendo obtidos um total 22 isolados bacterianos, 13 do método de

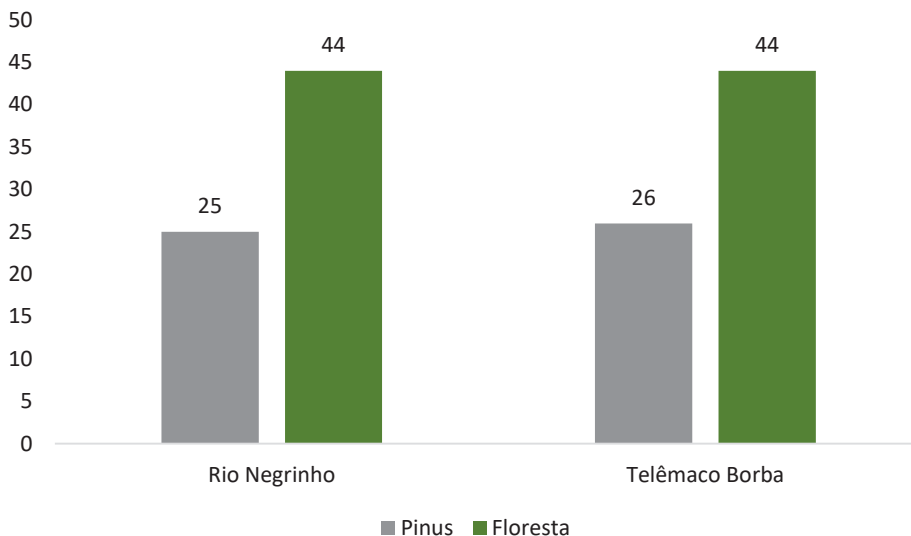


Figura 9. Número de isolados bacterianos totais obtidos mediante método de isolamento de diluição até extinção, em solos de áreas de *P. taeda* e Florestas secundárias.

enriquecimento e nove do método de diluição até a extinção. Os métodos utilizados são laboriosos e exigem tempo significativo de incubação para o isolamento, no entanto, com o método de cultura de enriquecimento foi possível obter um número maior de isolados. Novos estudos serão realizados para a identificação desses isolados e caracterização quanto à capacidade destes microrganismos em consumir CH₄.

Referências

- AYDIN, G.; KARAKURT, I.; AYDINER, K. Evaluation of geologic storage options of CO₂: applicability, cost, storage capacity and safety. **Energy Policy**, v. 38, n. 9, p. 5072-5080, 2010. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.04.035>>.
- BOGNER, J.; MATTHEWS, E. Global methane emissions from landfills: new methodology and annual estimates 1980-1996. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 17, n. 2, p. 34:1-34:18, 2003. DOI: <<https://doi.org/10.1029/2002GB001913>>.
- BOWMAN, J. The methanotrophs: the families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria**. 3rd ed. New York: Springer, 2006. v. 5. p. 266-289.
- CHOI, D.; KUNZ, R. C.; BOYD, E. S.; SEMRAU, J. D.; ANTHOLINE, W. E.; HAN, J.; ZAHN, J. A.; BOYD, J. M.; DE LA MORA, A. M.; DISPIRITO, A. A. The membrane-associated methane monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH : quinone oxidoreductase complex from *Methylococcus capsulatus* Bath. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 19, p. 5755-5764, 2003. DOI: <<https://doi.org/10.1128/JB.185.19.5755-5764.2003>>.
- CHOWDHURY, T. R.; DICK, R. P. Ecology of aerobic methanotrophs in controlling methane fluxes from wetlands. **Applied Soil Ecology**, v. 65, p. 8-22, 2013. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.12.014>>.
- CHISTOSERDOVA, L.; KALYUZHNAJA, M. G.; LIDSTROM, M. E. The expanding world of methylotrophic metabolism. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 477-499, 2009. DOI: <<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073600>>.
- DEDYSH, S. N.; DUNFIELD, P. F. Cultivation of Methanotrophs. In: MCGENITY, T.; TIMMIS, K.; NOGALES, B. (Ed.). **Hydrocarbon and lipid microbiology protocols**. Berlin: Springer, 2014. p. 1-14. (Springer protocols handbooks). DOI: <https://doi.org/10.1007/8623_2014_14>.
- DEDYSH, S. N.; PANIKOV, N. S.; TIEDJE, J. M. Acidophilic methanotrophic communities from *Sphagnum* peat bogs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 922-929, 1998.
- DUNFIELD, P. F.; YURYEV, A.; SENIN, P.; SMIRNOVA, A. V.; STOTT, M. B.; HOU, S.; LY, B.; SAW, J. H.; ZHOU, C.; REN, Y.; WANG, J.; MOUNTAIN, B. W.; ZROWING, M. A.; WEATHERBY, T. M.; BODELIER, P. L. E.; LIESACK, W.; FENG, L.; WANG, L.; ALAM, M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. **Nature**, v. 450, p. 879-82, 2007. DOI: <<https://doi.org/10.1038/nature06411>>.
- ETTWIG, K. F.; BUTLER, M. K.; LE PASLIER, D.; PELLETIER, E.; MANGENOT, S.; KUYPERS, M. M.; SCHREIBER, F.; DUTILH, B. E.; ZEDELIOUS, J.; DE BEER, D.; GLOERICH, J.; WESSELS, H. J.; VAN ALLEN, T.; LUESKEN, F.; WU, M. L.; VAN DE PAS-SCHOONEN, K. T.; OP DEN CAMP, H. J.; JANSSEN-MEGENS, E. M.; FRANCOIJS, K. J.; STUNNENBERG, H.; WEISSENBACH, J.; JETTEN, M. S.; STROUS, M. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. **Nature**, v. 464, p. 543-548, 2010. DOI: <<https://doi.org/10.1038/nature08883>>.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 439-471, 1996.

JHALA, Y. K.; VYAS, R. V.; PANPATTE, D. G.; SHELAT, H. N. Rapid methods for isolation and screening of methane degrading bacteria. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2016. DOI: <<https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000322>>.

KNIEF, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1346, 2015. DOI: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01346>>.

SCHNYDER, E.; BODELIER, P. L. E.; HARTMANN, M.; HENNEBERGER, R.; NIKLAUS, P. A. Positive diversity-functioning relationships in model communities of methanotrophic bacteria. **Ecology**, v. 99, n. 3, p. 714-723, 2018. DOI: <<https://doi.org/10.1002/ecy.2138>>.

SERRANO-SILVA, N.; SARRIA-GUZMÁN, Y.; DENDOOVEN, L.; LUNA-GUIDO, M.

Methanogenesis and methanotrophy in soil: a review. **Pedosphere**, v. 24, n. 3, p. 291-307, 2014. DOI: <[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(14\)60016-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(14)60016-3)>.

STOCKER, T. F.; QIN, D.; PLATTNER, G.-K.; TIGNOR, M.; ALLEN, S. K.; BOSCHUNG, J.; NAULES, A.; XIA, Y.; BEX, V.; MIDGLEY, P. M. (Ed). **Climate change 2013: the physical science basis: contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. 1535 p. Disponível em: <<https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/>>.

WOLLUN, A. G. II. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed). **Methods of soil analysis: Part 2: chemical and microbiological properties**. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 781-802.

WUEBBLES, D. J.; HAYHOE, K. Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Reviews**, v. 57, n. 3-4, p. 177-210, 2002. DOI: <[https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(01\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(01)00062-9)>.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Versão digital (2020)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva

Elisabete Marques Oaida

Membros

Annete Bonnet

Cristiane Aparecida Fioravante Reis

Guilherme Schnell e Schühli

Krisle da Silva

Marcelo Francia Arco-Verde

Marcia Toffani Simão Soares

Marilice Cordeiro Garrastazu

Valderés Aparecida de Sousa

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa

Foto capa:

Josiléia Acordi Zanata