DÉBORA DO CARMO LINHARES

**“Estudo da comunidade metanotrófica em amostras do manguezal de
Bertioga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de
ácidos nucléicos com isótopos estáveis (SIP-DNA)”**

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.

**São Paulo
2011**

DÉBORA DO CARMO LINHARES

**“Estudo da comunidade metanotrófica em amostras do manguezal de
Bertioga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de
ácidos nucleicos com isótopos estáveis (DNA-SIP)”**

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: Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari

Versão original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Linhares, Débora do Carmo.

Estudo da comunidade metanotrófica em amostras do manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de ácidos nucleicos com isótopos estáveis (SIP-DNA) / Débora do Carmo Linhares. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Vivian Helena Pellizari.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia Ambiental.

Versão do título para o inglês: Study of metanotrophic community present in sediment samples from Bertioga's mangrove, State of São Paulo, using nucleic acid labeling with stable isotope probing technique (DNA-SIP)

Descritores: 1. Bactérias Metanotróficas 2. Oxidação biológica do metano 3. Manguezal Brasileiro 4. Biblioteca Genômica 5. SIP-DNA 6. Gene *pmoA* I. Pellizari, Vivian Helena II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0228/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Débora do Carmo Linhares.

Título da Dissertação: Estudo da comunidade metanotrófica em amostras do manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de ácidos nucleicos com isótopos estáveis (SIP-DNA).

Orientador(a): Vivian Helena Pellizari.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 318/09, referente ao projeto intitulado: "*Caracterização da comunidade metanotrófica e de seus isolados, provenientes de manguezais de Bertiogo, Estado de São Paulo*" sob a responsabilidade de **Débora do Carmo Linhares**, foi analisado na presente data pela CEFA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SÉRIES HUMANAS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 30 de junho de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEFA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOITTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Aos meus pais Maria Dolôres e João Carlos,
que sempre acreditaram e investiram
em minha formação.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari, pela confiança, apoio e o incentivo de sempre, que desde os tempos de iniciação científica me ajudaram a acreditar no meu caminho na Microbiologia Ambiental. Também agradeço pela amizade, compreensão, orientação e ajuda para a condução deste trabalho.

À Profa. Dra. Cristina Rossi Nakayama (Cris!!!!), pelos primeiros ensinamentos sobre como cuidar de bactérias metanotróficas, e principalmente pela amizade, conversas divertidas sobre nosso trabalho (ou não) e todo o apoio que me dedicou desde a minha chegada ao laboratório.

À Dra. Flávia Talarico Saia, pelo treinamento na técnica de SIP e pela extrema dedicação em conduzir junto comigo estes experimentos para o trabalho.

Ao Dr. Rubens Delgado Duarte, por me apresentar quase tudo o que eu aprendi sobre bioinformática, e por me ajudar muito com as análises dos dados. Ah, e também pela amizade e por me revelar meu verdadeiro signo! rsrs

À Msc. Rosa de Carvalho Gamba, pelo companheirismo e por tantos momentos agradáveis no laboratório e nos almoços dos tempos de ICB.

Aos colegas Armando Dias e Danice Luvizotto, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, pelo companheirismo e ajuda com a técnica de DGGE, e ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo por ceder a estrutura do seu laboratório.

À equipe da EMBRAPA Meio Ambiente, que viabilizou as coletas no manguezal de Bertioga, em especial ao João Luiz.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Industrial do CTPP/IPT, onde hoje eu trabalho, pelo apoio para a conclusão do mestrado.

À FAPESP/BIOTA pela bolsa e financiamento para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo, da EMBRAPA Meio Ambiente, pela coordenação do Projeto Temático.

À minha querida Universidade de São Paulo, pela estrutura física, humana, social, cultural e etc, que me proporcionam boa formação e vivência durante uns bons anos.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia de Micro-organismos, entre os mais próximos a Ana Carolina, Ana Cláudia, André, Cris Barreto, Cris Naka, Daniella, Diego, Fabiana, Flávia, Priscila, Rosa, Rubens, Simone e Vivian, pelo companheirismo, auxílio e sugestões na condução dos experimentos. Ter a companhia de vocês tornou a minha estada no laboratório uma experiência realmente rica e feliz, pois além de nos divertirmos muito

com as nossas questões científico-culturais (como diz o Rubens), quase sempre conseguíamos achar graça nas nossas dificuldades e discutir a melhor solução para os problemas com os experimentos rsrs. Com toda a certeza devo muito da minha formação profissional a este convívio alegre, no qual o tema da microbiologia ambiental, pelo qual fui “me apaixonando”, muitas vezes passava disfarçado de uma agradável conversa entre amigos.

Aos amigos e familiares, por toda a ajuda, compreensão, paciência e incentivo recebido ao longo desses anos. Em especial ao meu pai e à minha Melhor Mãe do Mundo!

Enfim, à todos que durante este período me ajudaram no trabalho, e fora dele.

Meus agradecimentos.

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”

Louis Pasteur

RESUMO

LINHARES, D. C. **Estudo da comunidade metanotrófica em amostras do manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, através da técnica de marcação de ácidos nucleicos com isótopos estáveis (SIP-DNA)**. 2011. 110f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

Bactérias metanotróficas são conhecidas por sua habilidade de poder utilizar o metano como única fonte de carbono e energia. Este gás é importante para o efeito estufa e o estudo de sua produção e consumo tem sido incentivado. Os manguezais brasileiros apresentam potencial de produção de metano, são altamente produtivos e sua comunidade microbiana vem sendo estudada apenas recentemente. O escopo deste projeto foi pesquisar a diversidade taxonômica e funcional de bactérias metanotróficas presentes em amostras de sedimento do manguezal de Bertioga (SP, Brasil), através de novas técnicas de cultivo e enriquecimento, incluindo a técnica de DNA-SIP utilizando metano como substrato marcado, o que permite estudar o papel das bactérias não cultiváveis na oxidação do CH_4 . À partir de amostras de sedimento do manguezal de Bertioga, coletadas em dois locais de estudo (não impactado e impactado com óleo), foram realizados enriquecimentos com metano para fins de isolamento, e extração do DNA total para construir bibliotecas do gene funcional *pmoA* para o estudo da comunidade metanotrófica. O sedimento do ponto impactado foi também utilizado para a aplicação da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$, resultando na análise de sequências de 3 bibliotecas do gene rRNA 16S. Foram obtidos consórcios capazes de crescer em metano como única fonte de carbono, mas não foi possível o isolamento. As bibliotecas do gene *pmoA* indicaram a presença de bactérias metanotróficas das Famílias Methylocystaceae e Methylococcaceae, tanto em amostra de sedimento não impactado, quanto em amostra de sedimento impactado com óleo. No experimento de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$, a recuperação do DNA marcado ocorreu após o consumo de 0,2mmol de metano no microcosmo do tempo de incubação t2. As bibliotecas do gene rRNA 16S do DNA total do sedimento e do DNA da fração leve do tempo de incubação t2 revelaram a presença bactérias distribuídas por diversos Filos, relacionadas a manguezais, ambientes marinhos, e poluição com hidrocarbonetos. Entre as sequências obtidas da fração de DNA pesado, em teoria da microbiota que incorporou o metano marcado com isótopos estáveis, foram identificadas metanotróficas clássicas apenas da família Methylococcaceae, além de grupos de micro-organismos cujo papel no ciclo do metano é incerto, como o da família Methylophilaceae e do Filo TM7. É possível que o consumo de metano por esses dois últimos grupos não seja direto, mas a ocorrência de micro-organismos que prontamente consomem os metabólitos da oxidação deste gás pode ser de grande importância no ambiente.

Palavras-chave: Bactérias metanotróficas. Oxidação biológica do metano. Manguezal Brasileiro, Biblioteca genômica. DNA- Stable Isotope Probing (DNA-SIP). Gene *pmoA*.

ABSTRACT

LINHARES, D. C. **Study of metanotrophic community present in sediment samples from Bertioga's mangrove, State of São Paulo, using nucleic acid labeling with stable isotope probing technique (DNA-SIP).** 2011. 110p. Master thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Metanotrophic bacteria are known for their ability to use methane as sole carbon and energy source. This gas is important for the greenhouse effect and study of its production and consumption has been encouraged. Brazilian mangroves have potential for methane production, are highly productive and its microbial community has been studied only recently. The scope of this project was to investigate the functional and taxonomic diversity of metanotrophic bacteria present in mangrove sediment samples from Bertioga (SP, Brazil), through new techniques of cultivation and enrichment, including DNA-SIP technique using methane as a marked substrate, which allows to study the role of non-culturable bacteria in the oxidation of CH₄. With the sediment samples from the Bertioga's mangrove, collected from two study sites (not impacted and impacted with oil), were performed enrichments with methane for isolation of pure cultures, and extraction of total DNA to construct libraries of the *pmoA* functional gene, to study the metanotrophic community. Sediment of the impacted site was also used to apply the technique of DNA-SIP ¹³CH₄, resulting in the sequence analysis of three gene libraries of rRNA 16S. Consortia were obtained able to grow on methane as sole carbon source, but it was not possible to isolate pure cultures. The *pmoA* gene libraries indicated the presence of metanotrophic bacteria from the Families Methylocystaceae and Methylococcaceae, in both sediment samples, impacted and not impacted with oil. Considering the experiment of DNA-SIP ¹³CH₄, the recovery of labeled DNA occurred after consumption of 0.2 mmol of methane in the microcosm (incubation time t₂). Gene libraries of rRNA 16S from total DNA of sediment, and the DNA from the light fraction of the incubation time t₂, revealed the presence of bacteria distributed over several Phyla, related to wetlands, marine environments, and hydrocarbon pollution. Among the sequences obtained from the heavy fraction of DNA, in theory from micro-organisms that incorporated stable isotope-labeled methane, were identified only classical metanotrophs from Methylococcaceae Family, and groups of micro-organisms whose role in methane cycle is uncertain, as the ones from Methylophilaceae Family and TM7 Phylum. It is possible that consumption of methane by these latter groups is not straightforward, yet the occurrence of micro-organisms as readily consumers of the metabolites of methane oxidation can be of great importance in the environment.

Keywords: Methanotrophic bacteria. Biological methane oxidation. Brazilian mangrove. Genomic library. DNA- Stable Isotope Probing (DNA-SIP). *pmoA* gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema dos compostos formados no metabolismo do metano.....	26
Figura 2. Representação gráfica da enzima pMMO de <i>Methylococcus capsulatus</i>	28
Figura 3. Distribuição mundial de ecossistemas semelhantes à manguezais.....	33
Figura 4. Localização aproximada dos ambientes de coleta no manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil).	39
Figura 5. Organograma das metodologias empregadas para o estudo da comunidade metanotrófica em sedimentos de manguezal (coleta de 2008).	40
Figura 6. Organograma das metodologias empregadas para o estudo da comunidade metanotrófica em sedimentos de manguezal (coleta de 2009).	41
Figura 7. Sistema de distribuição simultânea de gases, empregado para a manipulação de micro-organismos anaeróbios estritos e metanotróficos.	43
Figura 8. Troca de atmosfera e alimentação com gás metano.	43
Figura 9. Desenho esquemático representando os sub-cultivos sucessivos, à partir dos enriquecimentos iniciais.....	44
Figura 10. Desenho esquemático dos frascos preparados para o experimento de SIP.	46
Figura 11. Esquema simplificado da metodologia empregada para o estudo da comunidade metanotrófica ativa no sedimento de manguezal, através da aplicação da técnica de SIP.	47
Figura 12. Representação esquemática das possibilidades de inserção do fragmento clonado.	53
Figura 13. Variáveis ambientais nos locais de estudo “impactado” e “não impactado” do Manguezal de Bertioga, São Paulo.	54
Figura 14. Estabelecimento de consumo estável de metano pelos enriquecimentos iniciais.....	58
Figura 15. Consumo de metano pelos primeiros sub-cultivos em duplicata, após a primeira alimentação com metano.....	58
Figura 16. Consumo de metano pelos primeiros sub-cultivos em duplicata, após a segunda alimentação com metano.....	59
Figura 17. Crescimento de colônias na lâmina de meio NMS solidificado, nas paredes internas do frasco tipo roll-tube.....	61
Figura 18. Frasco com meio mineral NMS inclinado.....	62
Figura 19. Exemplo de um trecho do banco de sequências de pmoA, utilizado para identificar o melhor valor de cut-off em nível de gênero.	64

Figura 20. Comparação das curvas de rarefação (<i>cut-off</i> 25%) das bibliotecas do gene funcional <i>pmoA</i> , que representam os locais “impactado” e “não impactado”.....	64
Figura 21. Árvore filogenética com as sequências do gene <i>pmoA</i> , obtidas das bibliotecas genômicas construídas à partir de amostras de sedimento de manguezal.....	66
Figura 22. Relação filogenética entre os polipeptídeos deduzidos dos fragmentos dos genes funcionais <i>pmoA</i> e <i>amoA</i>	68
Figura 23. Curva de rarefação (<i>cut-off</i> 25%) da biblioteca do gene funcional <i>pmoA</i> (sedimento do mangue “impactado”, coleta de 2009).....	70
Figura 24. Árvore filogenética com as sequências do gene <i>pmoA</i> , obtidas das bibliotecas genômicas construídas à partir do sedimento de manguezal do local “impactado”.	71
Figura 25. Árvore filogenética baseada no alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidos do gene funcional <i>pmoA</i> , amplificado à partir de sedimento de manguezal do ponto “impactado”.....	72
Figura 26. Representação gráfica mostrando o consumo e realimentação de $^{12}\text{CH}_4$ (A) e $^{13}\text{CH}_4$ (B), nos pares de frascos de t1 até t5.	73
Figura 27. Consumo de metano observado em enriquecimentos de solo com metano marcado, realizados em diferentes condições de incubação.	75
Figura 28. Consumo acumulado de metano em cada frasco de enriquecimento para a técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$	75
Figura 29. Quantidades de DNA normalizadas para cada uma das alíquotas recuperadas após fracionamento.	76
Figura 30. DGGE dos <i>amplicons</i> do gene rRNA 16S, obtidos à partir do DNA fracionado dos pares de enriquecimento alimentados com $^{13}\text{CH}_4$ e $^{12}\text{CH}_4$, dos tempos de incubação t2 (A) e t5 (B).	80
Figura 31. Curvas de rarefação das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S, construídas a partir do DNA total extraído do sedimento “impactado” e de DNA recuperado das frações t2-f15 e t2-f12.	82
Figura 32. Distribuição dos Filos detectados em sedimentos de manguezal, identificados através de três bibliotecas do gene rRNA 16S.	84
Figura 33. Distribuição dos subgrupos da divisão Proteobacteria, identificados através das bibliotecas de rRNA 16S.	85
Figura 34. Árvore filogenética baseada no alinhamento de sequências do gene rRNA 16S, obtidas a partir do DNA recuperado com a técnica de DNA-SIP.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Emissões de metano a partir de manguezais e outros ambientes no mundo.....	34
Tabela 2. Composição físico-química de sedimentos do manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, coletados em ponto “impactado” e “não impactado” com derivados de petróleo.	55
Tabela 3. Quantidade de clones sequenciados para cada biblioteca do gene funcional <i>pmoA</i> , e programas utilizados para cada tipo de análise dos dados.....	63
Tabela 4. Estimativas de riqueza e diversidade das bibliotecas gênicas de <i>pmoA</i> , representando as amostras do manguezal de Bertioga, litoral de São Paulo.	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Ecologia e importância da oxidação biológica do metano (OBM) aeróbia	19
3.2 Oxidação anaeróbia do metano	21
3.3 Bactérias metanotróficas	22
3.4 Estrutura e função da enzima Metano Mono-oxigenase (MMO).....	25
3.5 Potencial para degradação de compostos xenobióticos	29
3.6 Métodos para o Estudo de Ecologia e Diversidade de Bactérias Metanotróficas.....	29
3.7 O metano no Manguezal.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Origem e Coleta de Amostras	38
4.2 Abordagem para cultivo e isolamento	42
4.2.1 Condições de cultivo	42
4.2.1.1 Meio líquido.....	42
4.2.1.2 Metano	42
4.2.2 Enriquecimento	44
4.2.2.1 Enriquecimento inicial	44
4.2.2.2 Diluição decimal em série.....	45
4.2.3 Isolamento - Método do “roll-tube”	45
4.3 Microcosmos para a aplicação da técnica de DNA-SIP ¹³ CH ₄	46
4.4 Estudo com Técnicas de Biologia Molecular	47
4.4.1 Extração de DNA	47
4.4.2 Processamento do DNA obtido das frações do DNA-SIP	48
4.4.3 Amplificação por PCR do gene <i>pmoA</i>	49
4.4.4 Amplificação por PCR do fragmento de rRNA 16S	50
4.4.5 Amplificação por PCR do gene rRNA 16S com primers com grampo	50
4.4.6 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE).....	51
4.4.7 Construção das bibliotecas	51
4.4.8 Detecção do Inseto e Sequenciamento dos Clones	52

4.4.9 Análise da diversidade acessadas através das bibliotecas construídas.	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Coleta e tomada de dados ambientais	54
5.2 Enriquecimento e primeiros repiques	56
5.3 Isolamento	60
5.3.1 Diluições seriadas	60
5.3.2 Roll-tubes	60
5.4 Primeira abordagem para acessar a diversidade funcional de bactérias metanotróficas, através de bibliotecas do gene <i>pmoA</i>	63
5.5 Estudo da comunidade metanotrófica em amostra do sedimento “impactado” – Emprego da técnica de DNA-SIP ¹³CH₄	69
5.6 Microcosmos para a aplicação da técnica de DNA-SIP.....	73
4.6.1. Enriquecimento.....	73
5.6.2 Ultracentrifugação e fracionamento	76
5.7 Acesso à diversidade microbiana com a técnica de DNA-SIP	79
5.7.1 Primeiras verificações - DGGE	79
5.7.2 Bibliotecas do gene <i>rRNA 16S</i> após a aplicação da técnica de DNA-SIP	81
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS*	92
APÊNDICES	101
Apêndice A – Preparo do meio de cultura NMS	102
Apêndice B – Resultados das comparações entre as sequências parciais do gene <i>rRNA 16S</i>, utilizando o aplicativo Classifier	105
APÊNDICE C - Resultados das comparações entre as sequências parciais do gene <i>rRNA 16S</i>, utilizando o aplicativo BLAST.....	107

1 INTRODUÇÃO

O Laboratório de Ecologia de Micro-organismos (LECOM-IO-USP), ao qual este trabalho de mestrado encontra-se vinculado, vem adotando uma abordagem polifásica na pesquisa da ecologia das comunidades microbianas envolvidas na produção (metanogênicas) e consumo (metanotróficas) do metano em ecossistemas brasileiros e na Península Antártica (PELLIZARI et al., 2007).

Em função das ações estabelecidas pelo protocolo de Quioto, intensificaram-se as pesquisas voltadas para a determinação da produção de metano, do seu consumo biótico e abiótico e o controle de suas emissões, sendo assim relevante o desenvolvimento de pesquisas que visam esclarecer o papel dos micro-organismos nos ciclos dos gases atmosféricos (SHIVELY et al., 2001). A partir daí, surge o interesse de estimar o potencial das bactérias oxidadoras de metano (metanotróficas) como barreira natural ao biogás liberado para a atmosfera.

As bactérias metanotróficas formam um grupo fisiologicamente único e distinto por sua habilidade de poder usar o CH₄ como única fonte de carbono e energia (WISE et al., 1999). Estas bactérias desempenham um importante papel no ciclo global do metano, oxigênio e nitrogênio (HANSON; HANSON, 1996) e possuem potencial para o uso em biotecnologia como agentes biodegradadores e biorremediadores devido à plasticidade de seu metabolismo (KALYUZHNYAYA et al., 2005).

Tradicionalmente, as bactérias metanotróficas eram classificadas como pertencentes às classes α e γ -Proteobacteria. Como a comunidade metanotrófica não costuma ser dominante nos ambientes (DEDYSH et al., 2006), o estudo da diversidade cultivável e não cultivável do grupo vinha sendo muito apoiado na utilização do gene funcional *pmoA* como marcador filogenético, o qual codifica uma porção bem conservada da enzima Metano Mono-oxigenase, exclusiva de metanotróficas e chave no metabolismo do metano.

Porém, nos últimos cinco anos foram descritas novas linhagens de bactérias capazes de oxidar metano, inclusive uma linhagem do Filo Verrucomicrobia para a qual ainda não foi identificado o gene *pmoA* (ISLAM et al., 2008). Estas descobertas chamam a atenção para a vantagem de se utilizar técnicas como a “Marcação de Ácidos Nucléicos com Isótopos Estáveis” (“DNA - Stable Isotope Probing”, DNA-SIP), que possibilitam detectar a comunidade

microbiana que está ativamente utilizando o substrato de interesse, no caso o metano.

A técnica de DNA-SIP tem importância crescente na área de microbiologia ambiental, pois possibilita estabelecer uma ligação entre filogenia e funcionalidade (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005). A metodologia consiste basicamente em expor a comunidade alvo à um substrato enriquecido com isótopos estáveis de baixa abundância natural (^{13}C ou ^{15}N), que serão assimilados na biomassa da comunidade ativa, inclusive nos ácidos nucleicos (BOSCHER; MIDDELBURG, 2002). A fração de DNA enriquecida com os isótopos pesados é recuperada através de ultracentrifugação, e pode ser utilizada em diversas técnicas de biologia molecular para acessar a diversidade.

No presente trabalho, o ambiente a ser estudado em relação à sua comunidade metanotrófica é o manguezal, tido como altamente produtivo e apontado como fundamental para o ciclo biogeoquímico do carbono (BISWAS et al., 2007). Apesar dos relatos existentes de emissão de metano nestes ambientes (CHAUHAN et al., 2008), a diversidade dos oxidadores de metano em tais ecossistemas foi pouco estudada. No Brasil, em especial, não foram encontrados registros de micro-organismos metanotróficos isolados de manguezais.

Mais especificamente no manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil), embora não se tenha mensurado os valores de emissão de metano, estudos deste local envolvendo cultivo (Dra. Ana Carolina Araújo, dados não publicados ¹) e metagenômica (DIAS et al., 2011; TAKETANI et al., 2010) evidenciaram a presença de archaeas metanogênicas, produtoras do gás. À partir destes indícios de produção de metano, infere-se que a presença de micro-organismos metanotróficos também seja importante no ambiente.

Desta forma, o escopo deste projeto foi pesquisar a diversidade taxonômica e funcional de bactérias metanotróficas presentes em amostras de sedimento do manguezal de Bertioga, através de novas técnicas de cultivo e enriquecimento, incluindo a técnica de DNA-SIP, que permite estudar o papel das bactérias não cultiváveis na oxidação do CH_4 .

Este estudo faz parte do Projeto Temático “Biodiversidade e Atividades Funcionais de Microorganismos de Manguezais do Estado de São Paulo”, financiado pelo programa Biotá FAPESP.

¹ Dra. Ana Carolina Araújo, Instituto Oceanográfico da USP. São Paulo-SP. 2009.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Pesquisar a presença e a diversidade de bactérias metanotróficas presentes em amostras de sedimento do manguezal de Bertioga, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar bactérias metanotróficas a partir das amostras de sedimento de dois locais de coleta, identificados neste trabalho como “não impactado” e “impactado” (em evento de derramamento de petróleo), visando à obtenção de consórcios e/ou isolados.

- Estudar a comunidade metanotrófica através de bibliotecas do gene funcional *pmoA*, amplificado a partir do DNA total extraído de sedimento de manguezal dos dois locais de estudo, “não impactado” e “impactado”. Realizar as análises filogenéticas comparativas e calcular os índices de diversidade para obtenção de riqueza e equitabilidade da comunidade.

- Validar os protocolos do Laboratório de Ecologia de Micro-organismos para o uso da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$ no estudo de bactérias metanotróficas em ambientes naturais, utilizando como modelo o sedimento da área impactada com óleo, do manguezal de Bertioga.

- Estudar a diversidade da comunidade ativa para a oxidação do CH_4 com a aplicação da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$ e bibliotecas do gene rRNA 16S (amplificado à partir das frações de DNA leve e pesado).

- Discutir os resultados de diversidade bacteriana obtidos após a aplicação da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$, com aqueles de diversidade funcional, obtidos com as análises das bibliotecas do gene funcional *pmoA*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Ecologia e importância da oxidação biológica do metano (OBM) aeróbia

As bactérias metanotróficas (oxidadoras de metano) formam um grupo fisiologicamente único e distinto por sua habilidade de poder utilizar o gás metano como única fonte de carbono e energia (HANSON; HANSON, 1996; WISE; MCARTHUR; SHIMKETS, 1999). Apesar de serem consideradas bactérias aeróbias estritas, Zeiss et al. (2006) observaram que o processo de oxidação do metano é razoavelmente insensível à concentração de oxigênio, desde que este esteja acima de 3% em volume.

O gás metano é produzido em diferentes ecossistemas, sendo formado principalmente (cerca de 80%) pela decomposição microbiana anaeróbia da matéria orgânica e, em menor porcentagem, nos processos geotermiais. Quando produzido nos solos, o metano formado em condições anaeróbias difunde-se para regiões aeróbias, onde parte é geralmente oxidada por micro-organismos aeróbios a dióxido de carbono, e parte segue para a atmosfera (HANSON; HANSON, 1996). Há estimativas de que a atividade das bactérias metanotróficas possa reduzir o fluxo de metano para a atmosfera em cerca de 90%, em relação à concentração inicialmente disponível para transporte nos solos (PETERSEN et al., 2005; RASTOGI et al., 2009).

Da quantidade liberada na atmosfera, cerca de 90% (HANSON; HANSON, 1996) é oxidada através de reações fotoquímicas, sendo destruído quimicamente por radicais $\text{OH}^\cdot$ e $\text{Cl}^\cdot$ na troposfera e estratosfera, respectivamente (HENCKEL et al., 2000). Uma porção pequena, mas significativa (cerca de 6%) é consumida a partir da atmosfera por bactérias metanotróficas em solos de florestas, campos e outros solos insaturados, que são os maiores sorvedouros terrestres de metano atmosférico (HANSON; HANSON, 1996; HENCKEL et al., 2000; KNIEF et al., 2005).

Na atmosfera, o metano contribui com o efeito estufa, com um potencial de retenção de energia cerca de 21 vezes maior que o CO_2 (SHIVELY et al., 2001). O efeito estufa é um evento necessário à vida, porém, no período atual, o fenômeno vem se intensificando devido à maior quantidade de emissões dos gases responsáveis (GEEs) e acredita-se que tem potencial para causar mudanças climáticas globais (IPCC, 2007).

De acordo com o relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudança do Clima (IPCC, 2007), a concentração atmosférica global de metano aumentou de um valor pré-industrial de cerca de 715 ppb para 1732 ppb no início da década de 90, sendo de 1774 ppb em 2005. A concentração atmosférica de metano em 2005 ultrapassa em muito a faixa natural dos últimos 650.000 anos (320 a 790 ppb), como determinado com base em testemunhos de gelo. As taxas de aumento diminuíram desde o início da década de 90, de forma condizente com o total de emissões (soma das fontes antrópicas e naturais), ficando aproximadamente constantes durante esse período. É muito provável que o aumento observado da concentração de metano se deva às atividades antrópicas, predominantemente a agricultura e o uso de combustíveis fósseis, mas as contribuições relativas de diferentes tipos de fontes não estão bem determinadas.

Em função das ações estabelecidas pelo protocolo de Quioto, intensificaram-se as pesquisas voltadas para o entendimento sobre a produção de metano, seu consumo biótico e abiótico e o controle de suas emissões. Sendo assim, é relevante o desenvolvimento de pesquisas que visam esclarecer o papel dos micro-organismos nos ciclos dos gases atmosféricos (SHIVELY et al., 2001), considerando as particularidades ambientais que interferem nestes processos. A partir daí, surge o interesse de estimar o potencial das bactérias metanotróficas como barreira natural ao biogás liberado para a atmosfera.

A redução das emissões é uma preocupação também do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). Uma das ações do MDIC foi a criação do Mercado Brasileiro de Reduções de Emissões (MBRE). O Ministério das Cidades vem também incentivando Mecanismos de Desenvolvimento Limpo (MDL) de modo a possibilitar a comercialização de “créditos de carbono” aos países ou cidades que não conseguem reduzir seus níveis de emissão nos padrões exigidos pelo Protocolo de Quioto (MALDANER, 2011).

Um dos maiores gargalos para a utilização de sistemas de oxidação biológica do metano dentro do MBRE é a dificuldade de se obter quantificação adequada tanto da emissão quanto do consumo de CH_4 em diferentes ambientes.

Entre as áreas mais desenvolvidas neste sentido está a de Engenharia Sanitária, que já vem avaliando o potencial das barreiras biológicas para atenuação da emissão de metano em aterros sanitários, e vem encontrando resultados promissores (MALDANER, 2011). Estudos nesta área procuram também demonstrar a relevância dos parâmetros ambientais

que afetam a oxidação do metano, entre eles a umidade, temperatura, porosidade e entrada de nutrientes no solo (JUGNIA et al., 2009; MALDANER, 2011).

A influência de cada fator é difícil de ser detectada devido à forte interação entre os mesmos, conduzindo à formação de ambientes muito específicos. Estas particularidades reforçam a importância de estudos em diversos ambientes, se possível em períodos distintos, visando monitorar o potencial de absorção ou emissão de gases.

Houve esforços também para determinar o potencial emissor ou sorvedor de metano em diversos ambientes naturais, entre eles a Península Antártica (NAKAYAMA et al., 2011), a Bacia do Pantanal (MARANI; ALVALÁ, 2007) e outras áreas alagadas como os manguezais da costa sul da Índia (PURJAVA; RAMESH, 2001) e da Tanzânia (KRISTENSEN et al., 2008). Este tipo de monitoramento ainda não é feito de forma sistemática, embora seja importante para estimar os impactos que mudanças no uso destes ambientes podem provocar, do ponto de vista do equilíbrio gasoso entre a superfície e a atmosfera. Seria também interessante poder estimar a resposta da microbiota a estas alterações.

3.2 Oxidação anaeróbia do metano

A oxidação anaeróbia de metano também ocorre, principalmente em águas marinhas anóxicas e em sedimentos de lagos alcalinos e de água doce (HANSON; HANSON, 1996). Esse consumo é realizado por três ou mais grupos filogenéticos proximamente relacionados às archaeas metanogênicas. Esses micro-organismos aparentemente formam associações sintróficas com bactérias redutoras de nitrito ou de sulfato (VALENTINE et al., 2007). Nos oceanos, estima-se que a oxidação anaeróbia do metano consome mais de 90% do gás formado ou liberado (KNITTEL; BOETIUS, 2009).

Nesse trabalho, será dada atenção ao consumo realizado pelas bactérias metanotróficas, que são geralmente encontradas a partir da interface anóxica-óxica de solos, sedimentos e outros nichos onde o CH₄ é produzido em quantidade (RASTOGI et al., 2009).

3.3 Bactérias metanotróficas

As bactérias metanotróficas estão presentes em diversos ambientes, geralmente nos quais o metano e o oxigênio (mesmo em baixas concentrações) estão disponíveis, como nos solos alagados, cobertura de aterros sanitários, solo de florestas decíduas, coluna d'água, sedimento de lagos e rios, e no o lodo ativado (BOWMAN, 2006).

Organismos do grupo foram encontrados até mesmo em ambientes extremos como fontes termais, tundra antártica, ambientes ácidos de turfeiras e lagos alcalinos (MURRELL; RADAJEWSKI, 2000). Além disso, cada vez mais surgem registros de endossimbiose com mexilhões, esponjas (DUBILIER; BERGIN; LOTT, 2008), e em associação com plantas típicas de ambientes alagados (RAGHOEBARSING et al., 2005).

Em 1906 o pesquisador Söhngen isolou e caracterizou pela primeira vez um micro-organismo que utilizava metano como fonte de carbono e energia (DALTON, 2005). O organismo, denominado na época como *Bacillus methanicus*, foi encontrado em plantas aquáticas e superfície de poças. À partir daí, pouca informação foi acrescentada à respeito de micro-organismos metanotróficos até 1970, quando o grupo de Whittenbury isolou e descreveu mais de 100 linhagens de bactérias metanotróficas aeróbias, obtidas em diversos ambientes (DALTON, 2005).

Da caracterização destes isolados derivou o esquema de classificação de organismos metanotróficos, baseado em características morfológicas, existência e tipos de complexos membranosos, tipos de vias para assimilação de carbono, habilidade de fixar nitrogênio, formação de esporos ou cistos e conteúdo G+C (DALTON, 2005). Com o desenvolvimento da biologia molecular, a classificação passou a ser reconhecida também através das sequências de bases do gene que codifica o RNA ribossomal 16S (rRNA 16S).

A maior parte das linhagens de bactérias metanotróficas descritas até o momento pertence ao Filo Proteobacteria e estão classificadas como um subgrupo funcional de bactérias metilotróficas, capazes de oxidar compostos de um carbono mais reduzidos que ácido fórmico para geração celular de energia, bem como assimilar formaldeído para biossíntese (HANSON; HANSON, 1996).

O Filo Proteobacteria apresenta bactérias gram-negativas, com grande diversidade de formas e metabolismos. Seguindo uma classificação de acordo com a ultraestrutura celular,

vias metabólicas, e análises das sequências dos genes para rRNA 5S e rRNA 16S, a maior parte das bactérias oxidadoras de metano (MOB) conhecidas formam grupos filogeneticamente coerentes com as subdivisões α e γ de Proteobacteria (DEDYSH et al., 2000; HANSON; HANSON, 1996; LIN et al., 2005). Sendo assim, os gêneros de metanotróficas pertencentes a este Filo estão divididos em dois tipos: i) tipo I, pertencentes à subdivisão γ -Proteobacteria, e ii) tipo II, pertencentes à subdivisão α -Proteobacteria.

As metanotróficas do tipo I assimilam formaldeído pela Via da Ribulose Monofosfato (RuMP), apresentam nas membranas predominantemente ácidos graxos de 16 carbonos e estas se encontram organizadas como feixes de vesículas discóides distribuídas por toda a célula. Esse grupo corresponde à família Methylococcaceae, na qual se encontram os gêneros principais: *Methylococcus* sp., *Methylomonas* sp., *Methylobacter* sp., *Methyломicrobium* sp., *Methylosphaera* sp., *Methylocaldum* sp., *Methylosarcina* sp., *Methylossoma* sp. e *Methylothermus* sp.

As metanotróficas do tipo II assimilam formaldeído pela Via da Serina, apresentam nas membranas predominantemente ácidos graxos de 18 carbonos e estas se encontram emparelhadas ao longo da periferia celular. Correspondem à família Methylocystaceae, que inclui os gêneros *Methylosinus* sp., *Methylocystis* sp., *Methylocella* sp. e *Methylocapsa* sp.

As espécies de *Methylocella* sp. são diferentes das outras metanotróficas pela sua capacidade de consumir compostos com mais de um carbono, como piruvato, succinato, malato, etanol e acetato, sendo este último consumido preferencialmente em relação ao metano quando ambos estão disponíveis (DEDYSH et al., 2005).

Foram propostas algumas hipóteses para as diferenças ecológicas entre metanotróficas do tipo I e do tipo II, mas não há ainda uma ampla compreensão de como os gêneros diferem ecologicamente. Acredita-se que a capacidade de fixar N_2 seja um fator de competição importante nos ambientes pobres em formas facilmente assimiláveis deste nutriente, visto que poucos gêneros de metanotróficas do tipo I (*Methylococcus* sp e *Methylosphaera* sp) apresentam esta habilidade, enquanto todos do tipo II a possuem (LIOTTI, 2007). Entre outros fatores que influenciam sua distribuição e competição estão as concentrações de acetato, metano, oxigênio, disponibilidade de nitrogênio e cobre, pH e temperatura (MOHANTY et al., 2006).

Ainda em relação a diferenças ecológicas entre grupos metanotróficos, os resultados obtidos por Bender e Conrad em 1994 (HANSON; HANSON, 1996) sugeriam a existência de duas populações diferentes de metanotróficas em solos expostos a diferentes concentrações de metano, uma apresentando uma enzima Metano Mono-Oxigenase (responsável pela oxidação do metano) de alta afinidade, e outra de baixa afinidade ao gás.

Em vários estudos, bactérias metanotróficas do tipo I tem sido associadas ao grupo que possui alta afinidade por metano, supostamente sendo capazes de oxidar metano em concentrações atmosféricas de cerca de 1774ppb (IPCC, 2007). Por outro lado, metanotróficas do tipo II são relacionadas à oxidação de metano com baixa afinidade (MALDANER, 2011). Scheutz et al. (2009) apresentam uma hipótese interessante sobre estes registros, argumentando que tal diferenciação pode ter sido observada em decorrência da vantagem das metanotróficas do tipo II em fixar N_2 , já que a disponibilidade de formas facilmente assimiláveis deste elemento pode ser limitante em ambientes com alta concentração de metano e de micro-organismos metanotróficos. Sendo assim, especula-se que habitats com alta concentração de metano, que frequentemente apresentam baixa concentração de O_2 , seriam mais adequados para as metanotróficas do tipo II, visto que a fixação de N_2 requer baixa tensão de O_2 .

Outra perspectiva é apontada por Jugnia et al. (2009), sugerindo que a distribuição dos dois tipos de metanotróficas com base nas concentrações de metano é questionável, visto que estudos em coberturas de aterros sanitários sob diversas condições indicam que tal distribuição está mais associada às condições específicas de cada habitat.

Essa hipótese sobre afinidades diferentes ao metano foi reformulada em um estudo conduzido por Baani e Liesack (2008), no qual foi detectada a ocorrência de duas isozimas da forma particulada da enzima Metano Mono-Oxigenase em linhagem do gênero *Methylocystis* sp. Segundo este trabalho, a isozima pMMO2 é expressa constitutivamente em metanotróficas do tipo II e é capaz de oxidar metano até mesmo em concentrações traço, enquanto a forma pMMO1 oxida metano apenas em concentrações maiores que 600ppm (600 000ppb).

Considerando esta diversidade de estudos e hipóteses sobre a diferenciação ecológica dos dois tipos de metanotróficas do Filo Proteobacteria, com verificações nem

sempre convergentes, nota-se que o entendimento sobre este assunto ainda é bastante incompleto.

Até meados de 2006, acreditava-se que grupo das metanotróficas, ou bactérias oxidadoras de metano (MOB), exibisse uma limitada diversidade fisiológica, estrutural e filogenética se comparado com outros grupos funcionais (HOLMES et al., 1999). No entanto, recentemente tem-se descoberto novos grupos de bactérias metanotróficas.

Entre as novas descobertas está a espécie *Crenothrix polyspora*, uma bactéria filamentosa que embora descrita há 140 anos por Ferdinand Cohn, apenas em 2006 foi reconhecida como capaz de oxidar metano facultativamente (STOECKER et al., 2006). Encontrada em sistemas de abastecimento de água potável, este organismo pertence à subdivisão γ -Proteobacteria, sendo proximamente aparentado às metanotróficas do tipo I. O consumo de metano por esta linhagem foi constatado, assim como foi identificada a presença de uma enzima semelhante a Metano Mono-Oxigenase (MMO) presente em bactérias metanotróficas antes conhecidas.

Outros trabalhos apresentando novas espécies de bactérias metanotróficas continuam sendo publicados (CONRAD, 2009; SEMRAU; DISPIRITO; YOON, 2010), em especial três publicações quase simultâneas que descrevem novas linhagens extremamente acidófilas pertencentes à Divisão Verrucomicrobia (DUNFIELD et al, 2007; ISLAM et al, 2008; POL et al, 2007).

3.4 Estrutura e função da enzima Metano Mono-oxigenase (MMO)

A oxidação do metano a metanol é a primeira etapa do metabolismo deste gás, e a enzima que catalisa esta reação é a Metano Mono-oxigenase (MMO) (HANSON, HANSON, 1996; HAKEMIAN; ROSENZWEIG, 2007).

Embora existam variações e pontos não esclarecidos sobre o mecanismo, de forma geral a oxidação do metano inicia-se com a clivagem das ligações O-O do gás oxigênio pela enzima Metano Mono-oxigenase (MMOs), sendo um dos átomos de oxigênio reduzido para formar água, e o outro incorporado ao metano formando metanol (CH_3OH). Nesta etapa ocorre também a oxidação de coenzimas NAD^+ e/ou CytC_{ox} (HANSON; HANSON, 1996).

Na reação seguinte, a enzima Metanol Desidrogenase (MDH) catalisa a oxidação do metanol à formaldeído, forma pela qual o carbono é assimilado para formar intermediários das rotas metabólicas centrais, que serão subsequentemente usadas para biossíntese de material celular. A assimilação do formaldeído pode se dar pela Via Ribulose Monofosfato (RuMP) nas metanotróficas do tipo I, ou pela Via da Serina, nas metanotróficas do tipo II.

Alternativamente, o metano pode ser completamente oxidado à CO_2 , contribuindo apenas para a ciclagem de potencial redutor das coenzimas envolvidas na via (HANSON; HANSON, 1996). Em um levantamento realizado por Einola (2010), estudos laboratoriais indicaram que de 8 a 70% do metano oxidado pelos micro-organismos pode ser incorporado à biomassa.

A oxidação total do metano a CO_2 segue várias etapas, esquematizadas na Figura 1:

Figura 1. Esquema dos compostos formados no metabolismo do metano.

Fonte: Liotti, 2007; baseado em Hanson e Hanson (1996)

A reação global comumente descrita para a utilização aeróbia do metano é a seguinte:

São conhecidas duas formas da enzima Metano Mono-oxigenase (MMO): i) uma forma particulada (pMMO), presente na membrana celular de todas as metanotróficas, com exceção do gênero *Methylocella* sp. (DEDYSH et al., 2000); e ii) uma forma solúvel citoplasmática (sMMO), encontrada apenas em algumas espécies.

Ambas as formas dessa enzima, em especial a sMMO, apresentam baixa especificidade pelo substrato, resultando no metabolismo de um grande número de

compostos. Graças a isso, as metanotróficas têm atraído o interesse de pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de processos biológicos para a degradação de compostos tóxicos como os hidrocarbonetos clorados de baixo peso molecular, entre outros (HANSON; HANSON, 1996; HAKEMIAN; ROSENZWEIG, 2007).

A forma citoplasmática (sMMO) compreende três componentes: uma hidroxilase (MMOH) que abriga o sítio ativo, uma redutase (MMOR) que transfere elétrons de NADH para o sítio ativo, e uma proteína regulatória (MMOB). O fator ambiental mais importante para a regulação da expressão desta enzima é a concentração de cobre (Cu), que funciona como um potente inibidor (SEMRAU et al., 2010). Em metanotróficas que expressam ambas as formas de MMO, a forma sMMO somente é expressa em condições com concentração de cobre (Cu) abaixo de 0,8 μ M, enquanto a pMMO é largamente expressada em meio com concentração de cobre em torno de 4 μ M (HAKEMIAN; ROSENZWEIG, 2007).

A forma particulada (pMMO) teve sua estrutura elucidada mais tardiamente, em parte devido à dificuldade de se trabalhar com um complexo de proteínas integrantes de membrana. Hakemian e Rosenzweig (2007) reuniram grande quantidade de informações sobre os aspectos estruturais desta enzima, que de forma geral é composta por três cópias de cada uma de suas três subunidades: α (45kDa), β (26kDa) e γ (23kDa), arranjadas na forma $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ (Figura 2).

Os genes que codificam para essa enzima encontram-se agrupados em um operon, na ordem *pmoC* (subunidade γ), *pmoA* (subunidade β) e *pmoB* (subunidade α) (MURRELL; RADAJEWSK, 2000; SEMRAU et al., 2010). A localização do sítio ativo da enzima ficou indeterminada por muito tempo, mas já se acreditava que estaria na subunidade β (*pmoB*), codificada pelo gene *pmoA*. Mais tarde, a descoberta da estrutura cristalográfica de pMMO levantou a possibilidade de que o sítio ativo poderia estar localizado em algum dos centros ligantes de metais (LIEBERMAN; ROSENZWEIG, 2005). Balasubramanian et al. (2010) aprofundaram os estudos na estrutura de pMMO de *M. capsulatus* e demonstraram que o sítio ativo está localizado na região N-terminal do domínio solúvel do peptídeo *pmoB* (Figura 2), onde se encontra o centro dinuclear de ligação de cobre (Cu).

Figura 2. Representação gráfica da enzima pMMO de *Methylococcus capsulatus*.

Imagens construídas através de modelagem estrutural. Na figura da esquerda, em visão paralela à membrana, destaque para um dos três conjuntos de polipeptídeos α , β e γ . À direita, em visão perpendicular de onde estaria a membrana plasmática, observa-se um poro central.

Fonte: Hakemian; Rosenzweig (2007); Protein Data Bank - PDB - accession code 1YEW

Possivelmente por abrigar a codificação para o sítio ativo da enzima, o gene *pmoA* possui uma seqüência muito conservada e sua presença é quase universal no genoma das metanotróficas conhecidas (HOLMES et al., 1995; MURRELL; RADAJEWSK, 2000; RASTOGI et al., 2009; SEMRAU; DISPIRITO; YOON, 2010). Estas particularidades tornaram viável a ampla utilização deste gene como marcador filogenético para identificar e classificar especificamente as bactérias metanotróficas.

Em algumas das linhagens metanotróficas pertencentes à Divisão Verrucomicrobia, assim como em *Crenothrix polyspora*, foram encontrados os genes que codificam uma proteína estruturalmente muito similar à Metano Mono-Oxigenase (DULFIELD, 2007; STOECKER, 2006; POL, 2007). Apesar da semelhança estrutural, e provavelmente funcional, as seqüências de aminoácidos apresentam pouca similaridade se comparadas com as de metanotróficas pertencentes ao Filo Proteobacteria (entre 34-65%).

3.5 Potencial para degradação de compostos xenobióticos

Quando crescem na presença de metano, metanol ou formiato, algumas destas bactérias aeróbias são aptas a cometabolizar uma grande variedade de moléculas orgânicas, incluindo vários poluentes importantes (HANSON; HANSON, 1996; HAKEMIAN; ROSENZWEIG, 2007).

Foi demonstrado que a espécie *Methylosinus trichosporium* é apta a oxidar também cis e trans-1,2-dicloroetileno, 1,1-dicloroetileno, 1,2-dicloropropano e 1,3-dicloropropileno. Aparentemente esta mesma enzima em outras bactérias metanotróficas também poderiam catabolizar a oxidação de n-alcanos com 2 a 8 carbonos, n-alcenos com 2 a 6 carbonos e mono e dicloroalcanos com 5 ou 6 carbonos, assim como dialquil-eters e cicloalcanos (ALEXANDER, 1994).

Frequentemente, produtos sabidamente gerados por cometabolismo em meio de cultura também acumulam e persistem na natureza, mas pode não ser assim no caso de o produto ser metabolizado por outra espécie da comunidade. A característica de transformação de diversos compostos apenas por cometabolismo limita a aplicação em biorremediação na sua forma clássica, mas outros estudos estão sendo conduzidos para aproveitar esse potencial ainda pouco explorado.

3.6 Métodos para o Estudo de Ecologia e Diversidade de Bactérias Metanotróficas

Os estudos que visam à identificação e à caracterização de bactérias metanotróficas incluem os procedimentos clássicos em microbiologia, como enriquecimento e isolamento, observação da morfologia das colônias e das células e testes bioquímicos de crescimento em condições fisiológicas distintas.

Embora reconhecida a importância do cultivo e isolamento, tais métodos selecionam apenas alguns membros da comunidade, isto é, aqueles para os quais o meio de cultura e a incubação fornecem as condições apropriadas para o crescimento. Estima-se que menos de 1% dos micro-organismos em geral sejam cultiváveis (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995), e a inexistência de uma cepa metanotrófica brasileira registrada como referência ilustra a dificuldade encontrada na obtenção e manutenção de isolados desse grupo.

Desta forma, o emprego de técnicas de biologia molecular, independentes de cultivo, tornou-se uma necessidade metodológica no campo da ecologia microbiana (DUARTE, 2010). Entre elas está a análise filogenética com base no gene que codifica o RNA ribossomal 16S (rRNA 16S), que está presente em todo o domínio Bactéria, e no gene *pmoA*, que codifica uma região conservada da enzima pMMO, sendo portanto exclusivo de bactérias metanotróficas.

A maioria dos métodos moleculares empregados em ecologia microbiana envolve o estudo do gene rRNA 16S, que devido a características como ubiquidade e propriedades evolucionárias vem sendo utilizado como marcador filogenético universal para o Domínio Bacteria (CASE et al., 2007; DUARTE, 2010), e extensivamente empregado em estudos de diversidade. Uma particularidade do gene rRNA 16S é a presença de regiões altamente conservadas, as quais permitem o desenho de *primers* específicos, e regiões hipervariadas, as quais são utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os micro-organismos (WARD, et al., 1990).

Quando a comunidade alvo é um grupo específico, é possível também construir bibliotecas à partir dos chamados genes funcionais, como o *pmoA*, desde que estes reflitam a filogenia do grupo (em comparação à filogenia obtida com o sequenciamento do gene rRNA 16S) e sejam validados para esta finalidade. Em relação aos grupos metanotróficos pertencentes ao Filo Proteobacteria, as filogenias construídas com base nas sequências do gene rRNA 16S e aquelas baseadas nas sequências de aminoácidos ou nucleotídeos de *pmoA* apresentam topologias bastante semelhantes (HEYER; GALCHENKO; DUNFIELD, 2002).

Uma técnica muito utilizada para revelar a composição de comunidades é a construção e análise de bibliotecas genômicas, com a clonagem de genes que refletem a filogenia dos grupos de interesse.

O princípio da técnica de clonagem baseia-se na inserção de um segmento de DNA de interesse em um vetor apropriado, o qual é introduzido em uma célula hospedeira de fácil manutenção e propagação, frequentemente *E. coli*. A partir do crescimento de colônias das bactérias que receberam o vetor, pode-se proceder com a amplificação do fragmento clonado através de reação em cadeia da polimerase (PCR). De forma geral, os produtos desta PCR representam os genes das populações dominantes na comunidade estudada, e o

sequenciamento destes permite a identificação das sequências em bancos de dados como o GenBank, além da construção de filogenias.

A técnica de DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) também é uma ferramenta molecular bem estabelecida na microbiologia ambiental. Esta técnica de *fingerprinting* apresenta alta resolução na comparação de comunidades microbianas, é confiável, rápida e de baixo custo. Uma de suas maiores aplicações na ecologia microbiana é a análise simultânea de múltiplas amostras, o que permite a comparação dos perfis de comunidades em função das variações ambientais, inclusive ao longo do tempo. Além de apresentar um perfil comparável de bandas em gel de poliacrilamida, é possível também a identificação de membros da comunidade através do sequenciamento de genes obtidos nas bandas excisadas do gel (MUYZER; SAMALA, 1999).

Para a aplicação desta técnica, fragmentos dos genes de interesse em cada estudo são amplificados por PCR, utilizando-se *primers* com grampo, e então aplicados em um gel de poliacrilamida com desnaturantes de DNA. O “grampo” em um dos *primers* do par consiste em uma extensão de cerca de 40 bases C e G, que ajuda a dar estabilidade ao fragmento durante a migração no DGGE. A separação dos fragmentos de DNA no DGGE é baseada na diminuição da mobilidade eletroforética de moléculas de DNA dupla fita, parcialmente desnaturadas em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes de DNA (uréia e formamida) (MUYZER; SAMALA 1999). Assim como para as bibliotecas, para a análise dos padrões de bandas no DGGE existem vários *softwares* que permitem a análise da estrutura da comunidade, em relação à riqueza e abundância (SCHLOSS et al., 2005).

Dedysh et al. (2006) observaram que vários estudos, realizados a partir de sequências obtidas com a utilização de *primers* universais para o domínio Bactéria (rRNA 16S), mostraram que a estrutura da comunidade era dominada por populações não metanotróficas, mesmo quando as condições ambientais sugeriam a ocorrência de gás metano no ambiente. Assim, para estudos com bactérias metanotróficas de amostras ambientais, era interessante utilizar *primers* de genes funcionais como o *pmoA*. Um dos pares de *primers* específicos para metanotróficas mais frequentemente utilizados em trabalhos recentes (CÉBRON et al. 2007a,b; KNIEF; DUNFIEKD, 2005) é o par A189f (5' GGN

GAC TGG GAC TTC TGG 3') desenhado por Holmes et al. (1995) e mb661r (5' CCG GMG CAA CGT CYT TAC C 3'), desenhado por Costello e Lidstrom (1999).

Entre as metodologias de acesso à diversidade microbiana desenvolvidas mais recentemente, a técnica de Marcação com Isótopo Estável – SIP (Stable Isotope Probing) tem se mostrado muito promissora. O princípio da técnica é a exposição de uma amostra ambiental a um substrato com carbono ou nitrogênio comercialmente enriquecido com isótopos estáveis de baixa abundância natural (^{13}C ou ^{15}N), que são assimilados na biomassa da comunidade microbiana ativa, incluindo a incorporação nos ácidos nucleicos (BOSCHER; MIDDELBURG, 2002).

A fração de DNA marcado (^{13}C -DNA) é recuperada após a ultracentrifugação do extrato de DNA total em gradiente de densidade, e irá conter o genoma completo de toda a população microbiana capaz de utilizar tal substrato como fonte de carbono. Os ácidos nucleicos recuperados podem ser aplicados em diversas outras técnicas de biologia molecular, como PCR, bibliotecas gênicas, DGGE, etc.

Pesquisas sobre a diversidade de populações metanotróficas ativas no ambiente estão entre os primeiros trabalhos que utilizaram a técnica de DNA-SIP para a microbiologia ambiental (MORRIS et al., 2002; RADAJEWSKI et al., 2002). Entre os ambientes pesquisados estão solo de turfeira (MORRIS et al., 2002), solo ácido de floresta (RADAJEWSKI et al., 2002), sedimento de lago alcalino (LIN et al., 2004), solo de cobertura de aterro sanitário (CÉBRON et al., 2007b), entre outros.

Nestes estudos, em geral são construídas bibliotecas de clones do gene rRNA 16S, e muitas vezes também do gene *pmoA*, além de outras técnicas complementares. Para verificar se a técnica atingiu seu objetivo, as sequências obtidas à partir da fração pesada de DNA (^{13}C DNA) são comparadas basicamente com sequências obtidas: i) de DNA da fração leve (^{12}C DNA), ii) de DNA de um microcosmo enriquecido apenas com metano não pesado, iii) de DNA total da amostra ambiental antes do enriquecimento (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular tornou-se possível o levantamento de informações relevantes sobre a comunidade microbiana e seu papel no ambiente. Porém, embora reconhecidas às limitações das técnicas tradicionais de cultivo no isolamento de

micro-organismos da natureza, a obtenção de cepas isoladas é certamente necessária para uma melhor compreensão de sua fisiologia e papel no ciclo dos elementos químicos.

Em relação às bactérias metanotróficas, o papel chave do grupo no ciclo global do metano ainda não está totalmente esclarecido (LIOTTI, 2007). No Brasil, os estudos desse grupo de micro-organismos são recentes e se constituem em uma linha de trabalho pioneira, principalmente no caso dos ecossistemas naturais.

3.7 O metano no Manguezal

No trabalho ora apresentado, o ambiente estudado em relação à sua comunidade metanotrófica é o manguezal. Esse ecossistema, típico de ambientes costeiros tropicais, situa-se na transição entre a terra e o mar e ocorre com características muito semelhantes em diversas partes do mundo (Figura 3). No Brasil, que possui uma das maiores extensões de manguezais do mundo, estes ocorrem por quase toda a Costa, com exceção do Rio Grande do Sul, abrangendo uma superfície total de cerca de 10.000 km², a maioria na Costa Norte (SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010).

Figura 3. Distribuição mundial de ecossistemas semelhantes à manguezais.

Fonte: World Atlas of Mangroves (SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010)

Os manguezais sofrem inundações periódicas de marés, que conferem condições altamente variáveis de salinidade, oxigenação e disponibilidade de matéria orgânica e nutrientes ao longo do tempo, promovendo a ciclagem de substâncias entre o ambiente terrestre e o marinho. Assim, conferem-se características únicas ao ambiente e aos seus habitantes (LUGO; SNEDAKER, 1974). As comunidades microbianas presentes nos manguezais participam ativamente em vários processos ecológicos, e são as maiores

responsáveis pela ciclagem de nutrientes, crucial para o equilíbrio do ecossistema (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Manguezais são altamente produtivos e têm sido apontados como muito importantes no ciclo biogeoquímico do carbono (BISWAS et al., 2007). Vários autores já reportaram emissão de metano a partir dos manguezais (Tabela 1), que devido às condições majoritariamente anóxicas do sedimento e a grande disponibilidade de matéria orgânica, podem ser fontes importantes de metano atmosférico, principalmente em temperaturas tipicamente tropicais (CHAUHAN et al., 2008; PUJARVA; RAMESH, 2001).

De acordo com modelos e estimativas apresentados por Lelieveld, Crutzen e Dentener (1998), do total de metano emitido para a atmosfera em 1992, cerca de 600 ± 80 Tg/ano, aproximadamente 30% era proveniente de fontes estritamente naturais, sem interferência antropogênica. Destas fontes, cerca de 75% das emissões eram provenientes de solos alagados (wetlands), sendo 60% apenas de solos alagados de regiões tropicais. Dentre as áreas alagadas citadas estão incluídos os manguezais, além de turfeiras, pântanos, várzeas e outros, muitas vezes sujeitos a ciclos de maré ou cheia de rios. Estimativas mais recentes mantêm este padrão, como mostra estudo realizado no âmbito do IPCC (2007), em que as áreas alagadas naturais são responsáveis por 20 a 39% das emissões de metano.

Nos manguezais, o metano produzido nas regiões anóxicas difunde-se para a atmosfera através do sedimento e também dos pneumatóforos da vegetação típica do mangue, como *Avicennia sp* e *Rhizophora sp*. Segundo estudo publicado por Beckmann & Lloyd (2001), a emissão de metano para a atmosfera seria muito aumentada se o gás não fosse extensivamente oxidado por micro-organismos residentes na porção óxica do sedimento e em associação com as raízes das plantas.

Tabela 1. Emissões de metano a partir de manguezais e outros ambientes no mundo.

(continua)

Locais	Latitude	Fluxo diário ($\text{mgCH}_4/\text{m}^2 \cdot \text{dia}$)	Fluxo anual (gCH_4/ano)	Método	Referências
Bhitarkanika Manguezal, Leste da Índia	20°N	2.2–77.52	$2.35 \cdot 10^6$	Câmara estática; fluxo através dos pneumatóforos	Chauhan et al. 2008
Pichavaram Manguezal, Sul da Índia	11°N	15.04–23.83	$8.2 \cdot 10^5$	Câmara estática; fluxo através dos pneumatóforos	Senthilkumar, 2008
Muthupet Manguezal, Sul da Índia	10°N	18.9–37.5	$62.6 \cdot 10^2$	Câmara estática; fluxo através dos pneumatóforos	Krithika et al. 2008

(conclusão)					
Sunderban Manguezal, Índia	21°N	0.03–2.15	$7.32 \cdot 10^8$	Medição micro-meteorológica	Biswas et al. 2007
Godavari South, Manguezal, Índia	17°N	88–355	-	Câmara estática	Krupadam et al. 2007
Wright Myo, Manguezal, Ilha Andaman	12°N	6.9–13.4	$8.1 \cdot 10^9$	Câmara estática e medição micro-meteorológica	Barnes et al. 2006
Pichavaram Manguezal, Sul da Índia	11°N	7.4–63.7	$11 \cdot 10^2$	Câmara estática; fluxo através dos pneumatóforos	Purvaja et al. 2004
Queensland Manguezal, Austrália	27°S	0.07–417	-	Câmara estática; superfície da água e solo	Allen et al. 2007
Ranong Manguezal, Tailândia	9.5°N	0.19–0.52	-	Câmara estática; sedimento e água	Lekphet et al. 2005
Sunderban Manguezal, Índia	22°N	-16 to 32	-	Medição micro-meteorológica	Mukhopadhyaya et al. 2002
Mtoni Manguezais, Tanzânia	6°N	0–192	-	Câmara estática; superfície da água e solo	Lyimo et al. 2002
Hainan Manguezais, China	18°N	0.12–0.39	-	Câmara estática; superfície da água e solo	Lu et al. 1999
Manguezal, Porto Rico	18°N	4–42	-	Câmara estática, gradiente do preservado para o poluído	Sotomayor et al. 1994
Outros ambientes					
Enseada Martel, Península Antártica	62°S	3.2 - 117.9 mmol/m ² dia		Câmara estática	Nakayama et al. 2011
Cobertura de aterro sanitário, Quebec, Canadá	46°N	2500-30000	-	Câmara estática	Jugnia et al. 2008
Terras alagadas do Pantanal, Brasil	19°S	1-124		Câmara estática, fluxo difuso	Marani, Alvalá, 2007

Fonte: Modificado de Chauhan et al. (2008)

O método mais utilizado para quantificar a emissão de gases em ambientes naturais é o da câmara estática (chamber method) (CHAUHAN et al., 2008; MARANI; ALVALÁ, 2007), que consiste em apoiar no sedimento uma cúpula com a abertura voltada para baixo, visando o aprisionamento do gás emanado. Uma saída na câmara se conecta a uma mangueira por onde são retiradas amostras do gás acumulado, que deve ser rapidamente submetido à análise cromatográfica para quantificação.

Chauhan et al. (2008) realizaram um amplo estudo para quantificar os fluxos de metano em manguezais ao longo da Costa Leste da Índia, considerando variações espaciais e sazonais. Como esperado, foi verificado que dependendo da estação, as características do sedimento e da água mudam, o que por sua vez altera o padrão de emissão de CH₄. Dentre os três manguezais estudados por eles, não foi observada uma tendência única entre determinada estação e o aumento de emissões, pois cada sistema apresentava suas particularidades.

O levantamento realizado por Allen et al. (2007) mostra que as taxas de emissão de metano tendem a variar geograficamente, dependendo de fatores locais como temperatura, salinidade, potencial redox e conteúdo orgânico de carbono e nitrogênio. Apesar da necessidade de mais estudos, vários autores apontam que a influência antrópica sobre os manguezais, como despejo de esgoto, lixo e resíduos agrícolas, aumentam a entrada de nutrientes no sistema e podem incrementar o potencial de emissão de gases do efeito estufa (ALLEN et al. 2007; CHAUHAN et al. 2008; CORREDOR; MORELL; BAUZA, 1999).

No Brasil, os manguezais do Estado de São Paulo também já foram alvos de estudos recentes no que se refere à estrutura e função da comunidade microbiana. Dias et al. (2009) desenvolveram estudo em uma área bem preservada de manguezal na Ilha do Cardoso (Cananéia, SP), cujo resultado foi o isolamento bactérias produtoras de enzimas de interesse biotecnológico, como amilases, proteases, esterases e lipases.

Também em busca de micro-organismos produtores de substâncias de interesse comercial, Canova (2009) pesquisou e isolou actinobactérias à partir da rizosfera de *Rizophora mangle* nos manguezais de Cananéia e Bertioga (SP), e avaliou a produção de metabólitos secundários antifúngicos por estes micro-organismos. Entre os resultados, foram obtidos compostos que inibem o crescimento de fitopatógenos.

No manguezal de Cananéia, Taketani et al. (2010) estudaram a diversidade de archaeas metanogênicas e bactérias redutoras de sulfato, e concluíram que as duas comunidades co-existem no sedimento, provavelmente devido à grande disponibilidade de matéria orgânica.

A diversidade de Archaea também foi acessada por Dias et al. (2011) que avaliaram a presença e a diversidade do grupo em sedimentos de três áreas de manguezal (em Cananéia e Bertioga – SP), em diferentes estágios de preservação (preservado, afetado por atividades

antropogênicas e contaminado em evento de derramamento de petróleo). Entre diversos grupos de Archaea, neste trabalho foram obtidos também clones muito aparentados às Archaeas metanogênicas dos gêneros *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Methanolobus* e *Methanoculleus*, confirmando o potencial de produção de metano neste ambiente.

Apesar deste potencial, não foram encontrados trabalhos que tratam especificamente da diversidade de bactérias metanotróficas em manguezais brasileiros. A literatura é escassa mesmo em outras localidades, sendo mais comuns os trabalhos que tratam da influencia da microbiota como um todo nos ciclos biogeoquímicos, incluindo o ciclo do metano (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; LAANBROEK et al., 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem e Coleta de Amostras

Para a realização deste trabalho houve duas campanhas de coleta de sedimento no manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, a primeira delas realizada em Outubro de 2008 e a segunda em Outubro de 2009. As coletas foram realizadas com apoio da equipe que integra o programa Biota – FAPESP, sob o Projeto Temático “Biodiversidade e Atividades Funcionais de Microorganismos de Manguezais do Estado de São Paulo”, coordenado pelo Prof. Itamar Soares de Melo.

Em ambas as campanhas foram coletados sedimentos de dois pontos de manguezal nas proximidades da Mata de Restinga, que distam cerca de 3 km um do outro. O primeiro ponto, chamado neste trabalho de “impactado” (23°53’49”S, 46°12’28”W) é referência de uma região do manguezal que sofreu contaminação, em virtude do derramamento de cerca de 35 milhões de litros de petróleo, ocorrido em 1983 (COIMBRA, 2006; DIAS et al., 2011). Os efeitos dessa contaminação são descritos em alguns estudos principalmente em relação à vegetação e às espécies de caranguejo. Recentemente, foi constatado através de biomarcadores de petróleo e identificação de Compostos Policíclicos Aromáticos (CPAs) mutagênicos, que no sedimento ainda existem resíduos do petróleo oriundo do referido derramamento e que o dano ambiental ainda persiste (COIMBRA, 2006).

Assim como o ponto “impactado”, o segundo local de coleta recebe influência de atividades antrópicas, devido à proximidade com uma rodovia e um município (Figura 4). Para facilitar a identificação dos dois locais de coleta, o segundo ponto mencionado será chamado neste trabalho de “não impactado” (23°54’06”S, 45°15’03”W).

Em cada um dos locais de coleta foi realizada uma sub-amostragem aleatória de cinco pontos, distando de 2m a 4m entre eles. Cerca de 500g de sedimento superficial (até cerca de 8 cm de profundidade) foram coletados com assepsia, utilizando espátulas esterilizadas.

No ponto “impactado” havia poucas raízes de plantas e o sedimento apresentava-se muito pastoso, com coloração escura e acinzentada (cor chumbo). O sedimento no ponto “não contaminado” era marrom, e apresentava uma ampla trama de raízes de plantas.

Figura 4. Localização aproximada dos ambientes de coleta no manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil).

Fontes: Imagens de satélite do Google Earth (2011) e fotos de Daniella Vilela Lima (2008). Com permissão

O material foi acondicionado em sacos plásticos estéreis, fechados, e então transportados em caixa térmica, à temperatura de cerca de 4 °C. No laboratório, procedeu-se com a homogeneização manual e alíquotas de 0,25 g foram imediatamente congeladas para a posterior extração de DNA e construção das bibliotecas. Partes das amostras foram mantidas a 4 °C até o início do enriquecimento, que ocorreu em até quatro dias após a coleta.

Nas figuras 5 e 6, à seguir, estão representados esquemas das etapas de trabalho realizadas a partir de cada uma das campanhas de coleta.

Figura 5. Organograma das metodologias empregadas para o estudo da comunidade metanotrófica em sedimentos de manguezal (coleta de 2008).

As coletas de sedimento nos locais de estudo "impactado" e "não impactado" foram realizadas no manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil), em outubro de 2008.

Fonte: Linhares (2011)

Figura 6. Organograma das metodologias empregadas para o estudo da comunidade metanotrófica em sedimentos de manguezal (coleta de 2009).

A coleta de sedimento no local de estudo "impactado" foi realizada no manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil), em outubro de 2009.

Fonte: Linhares (2011)

4.2 Abordagem para cultivo e isolamento

4.2.1 Condições de cultivo

4.2.1.1 Meio líquido

O sedimento coletado foi utilizado como inóculo, em uma proporção de cerca de 5% em meio de cultura. Os cultivos foram realizados em meio mínimo mineral NMS (Nitrate Mineral Salts Medium - ATCC 1306) salino, preferencialmente à 30 °C, sob agitação de 150 rpm à 170 rpm. Em alguns momentos, os cultivos foram mantidos em regimes de incubação diferentes, variando entre 4 °C e 18 °C, com objetivo de reduzir a taxa de crescimento. A salinidade, em torno de 1,2% de NaCl, foi escolhida com base em dados preliminares obtidos nos pontos de coleta, e foi acertada com mistura de quantidade adequada de água do mar esterilizada (APÊNDICE A). Os frascos foram fechados com batoques de borracha (butila) e lacres metálicos.

4.2.1.2 Metano

O metano foi fornecido como substrato único de carbono e energia na atmosfera dos frascos, em proporção aproximada de 1:9 metano/ar atmosférico. Para a realização da troca de atmosfera dos frascos, foi empregado o sistema de distribuição simultânea de gases, comum nos trabalhos para a manipulação de anaeróbios estritos, e já adaptado para a manipulação de culturas metanotróficas (Figura 7).

Todos os gases que entraram nos frascos passaram por uma unidade filtrante com poros de 0,2µm, da marca *Millipore*, sendo esta mais uma medida adotada para evitar a contaminação (Figura 8). O metano empregado foi o de padrão cromatográfico, grau analítico (99,95% de pureza), da marca Linde.

Figura 7. Sistema de distribuição simultânea de gases, empregado para a manipulação de micro-organismos anaeróbios estritos e metanotróficos.

Fonte: Linhares (2011)

Figura 8. Troca de atmosfera e alimentação com gás metano.

Fonte: Linhares (2011)

A ocorrência de atividade metanotrófica, evidenciada pela queda da porcentagem de metano nos frascos de cultivo, foi verificada periodicamente por cromatografia gasosa (Agilent, modelo HP6850A, equipado com detector de ionização de chama - GC/FID).

O *headspace* dos frascos foi amostrado de forma asséptica, com a utilização de seringas para amostragem de gás, e as injeções no cromatógrafo foram realizadas em triplicata. As análises cromatográficas ocorreram com a utilização de N₂ como gás de arraste e temperatura da coluna em 40 °C. Cada corrida levou 3 minutos, sendo o tempo de retenção do metano por volta de 1,3 minutos.

As áreas de pico de metano encontradas nas amostras foram comparadas com o padrão de metano 99,95%, o qual é representado pela média das áreas de pico geradas por cinco injeções de metano puro (diretamente da tubulação). O cálculo da quantidade de metano em mmol foi realizado segundo a equação de Clapeyron para gases perfeitos ($PV=nRT$), com a temperatura em 25 °C, e o volume correspondendo ao valor total de mililitros de metano consumidos em dado período.

4.2.2 Enriquecimento

4.2.2.1 Enriquecimento inicial

Para cada ponto de coleta, “impactado” e “não impactado”, foram realizados enriquecimentos em duplicata. Foram pesados 5g de sedimento (peso úmido) diretamente em frascos de reagente tipo Schott de 250 mL, e então foram adicionados 95 mL de meio de cultura NMS (ATCC 1306) salino (1,2% de NaCl). Os frascos foram lacrados com batoque de borracha e tampa de rosca perfurada no centro, sendo em seguida acertada uma atmosfera de 10% de metano em ar atmosférico, através do sistema de distribuição simultânea de gases.

Com o objetivo de favorecer o crescimento de bactérias metanotróficas em detrimento de outras, foram realizados três subcultivos sequenciais, com intervalos de cerca de 7 (sete) dias, a partir dos frascos de enriquecimento inicial (Figura 9). A ocorrência de atividade metanotrófica foi verificada periodicamente por cromatografia gasosa.

Figura 9. Desenho esquemático representando os sub-cultivos sucessivos, à partir dos enriquecimentos iniciais.

Fonte: Linhares (2011)

4.2.2.2 Diluição decimal em série

Os frascos de cada um dos últimos repiques do enriquecimento foram amostrados para execução de diluição decimal seriada. A diluição foi realizada na faixa de 10^{-1} a 10^{-9} , em frascos de 30 mL, para o princípio do isolamento dos micro-organismos metanotróficos presentes nas culturas. Os frascos das diluições tiveram também a atmosfera acertada com 10% de metano em ar atmosférico. A concentração de metano na atmosfera dos frascos foi medida periodicamente durante a incubação, a fim de verificar o consumo do gás.

4.2.3 Isolamento - Método do “roll-tube”

Os cultivos mais diluídos que apresentaram consumo de metano foram selecionados para o emprego da técnica do “roll-tube”. Esta técnica foi desenvolvida por Hungate em 1969, com a finalidade de obter o crescimento e o isolamento de colônias de microrganismos anaeróbios estritos em meio sólido (HUNGATE, 1969; apud LIOTTI, 2007). No Laboratório de Ecologia de Micro-organismos, essa técnica foi adaptada por Nakayama em 2005 e utilizada por Liotti (2007) na tentativa de obter culturas puras de bactérias metanotróficas. A técnica adaptada consiste em inocular uma alíquota de cultura em frasco de antibiótico longo (12 cm), contendo meio de cultura com 1,5% de ágar fundido, previamente mantido a uma temperatura de 45 °C. Uma vez inoculados, os tubos são colocados na posição horizontal em uma bandeja com água e gelo e rolados rapidamente até ocorrer a solidificação do meio. O meio de cultura utilizado foi também o NMS salino, descrito no item 3.2.1 com 1.5% de ágar ou agarose. Os frascos foram incubados a 30 °C, invertidos, com 10% de gás metano em atmosfera comum. A formação das colônias foi periodicamente acompanhada.

Após o crescimento das colônias, estas foram alçadas do meio sólido com ajuda de pipetas Pasteur, sendo imediatamente inoculadas em meio NMS líquido e alimentadas com atmosfera com cerca de 10% de metano.

4.3 Microcosmos para a aplicação da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$

O experimento com a utilização da técnica de DNA-SIP foi realizado com o sedimento de manguezal do ponto “impactado”, coletado na campanha de Outubro de 2009. Os microcosmos foram montados em frascos de ampicilina de 100 mL, contendo 40 mL de meio mínimo mineral NMS salino (1,2% NaCl) e 5 gramas (peso úmido) de sedimento. Após a inoculação, os frascos foram fechados com batoques de butila e lacres metálicos. Um total de 12 frascos foi montado, cinco dos quais receberam como única fonte de carbono o metano com carbono pesado, $^{13}\text{CH}_4$. Outros cinco frascos receberam a adição de metano comum ($^{12}\text{CH}_4$), (Figura 10) e os dois frascos restantes serviram como controles para a ausência de produção de metano nos microcosmos, e por isso não receberam metano ou qualquer outra fonte de carbono.

Figura 10. Desenho esquemático dos frascos preparados para o experimento de SIP.

Fonte: Linhares (2011)

Após o fornecimento de metano (cerca de 10% em ar atmosférico), a incubação foi realizada à temperatura de 28°C, sob agitação de 150rpm, protegido de luz.

Visando recuperar o DNA do material de cada tempo de enriquecimento, um par de frascos (um incubado com $^{13}\text{CH}_4$ e outro com $^{12}\text{CH}_4$) era removido da incubação (sacrificado), conforme o consumo atingia um valor acumulado de 0,2; 0,7; 1,4; 1,7 e 2,2mmol/frasco (t1, t2, t3, t4 e t5).

Os frascos retirados da incubação (sacrificados) foram abertos em ambiente estéril e o conteúdo foi despejado em tubos cônicos esterilizados. Estes tubos foram imediatamente centrifugados a 10.000 rpm por 40 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o pellet preservado à -20 °C em tampão Tris-EDTA para posterior extração de DNA total.

Na figura 11, a seguir, está apresentado um esquema da metodologia empregada para todas as etapas de processamento dos microcosmos, utilizando como exemplo apenas um dos tempos de incubação. A descrição detalhada de cada uma das etapas encontra-se nos tópicos seguintes.

Figura 11. Esquema simplificado da metodologia empregada para o estudo da comunidade metanotrófica ativa no sedimento de manguezal, através da aplicação da técnica de SIP.

Fonte: Modificado de Daniella Vilela Lima (Ilustração não publicada, 2010). Com permissão

4.4 Estudo com Técnicas de Biologia Molecular

4.4.1 Extração de DNA

As extrações de DNA do sedimento original e do material recuperado dos microcosmos para o DNA-SIP foram sempre realizadas utilizando-se o Kit de Extração e Purificação Power Soil (Mo-Bio Laboratories Inc, USA), de acordo com as instruções do

fabricante. Os produtos de todas as extrações foram verificados em gel de agarose 0,8% e quantificados pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

4.4.2 Processamento do DNA obtido das frações do DNA-SIP

Alíquotas de 10 μL do DNA total extraído dos frascos de enriquecimento, correspondendo a 500 ng de ^{12}C -DNA e ^{13}C -DNA, foram aplicados em tubos de ultra-centrífuga de 2,2 mL, contendo 1,8 mL de CsTFA/GB com densidade de 1,61 g/mL (SAIA et al., 2010). Tubos controle também foram preparados, contendo 10 μL de água Milli-Q estéril ao invés de DNA. Os tubos foram centrifugados em ultracentrífuga de bancada Optima TLX 120000 (Beckman, USA) com rotor de ângulo fixo TLA 120.2 (específico para tubos de 2,2 mL). As condições de ultra-centrifugação foram de 64000 rpm por 40h, à 20 °C. A coleta das frações foi realizada com sucesso por fracionamento com água Milli-Q estéril, do topo à base dos tubos, utilizando o sistema de fracionamento acoplado à bomba de infusão de seringa. Um total de 20 frações, contendo 100 μL de amostra em cada, foram coletadas a cada 30 segundos à vazão de 0,2 mL/min. A densidade dos tubos controle foi determinada pelo índice de refração ou pesagem de 40 μL de amostra (SAIA et al., 2010).

O DNA de cada fração foi precipitado *overnight* à 4 °C pela adição de 500 μL de isopropanol gelado. Os microtubos contendo o material foram então centrifugados por 30 minutos em rotação máxima (~14.000 rpm), à temperatura de 4 °C. O sobrenadando foi removido gentilmente, invertendo os tubos. Seguindo, os precipitados foram lavados com 500 μL de etanol 70% gelado e os tubos foram centrifugados novamente por 15min em rotação máxima, à temperatura de 4 °C. O etanol foi removido invertendo-se os tubos (SAIA et al., 2010).

A quantificação de DNA de cada fração foi realizada utilizando o PicoGreen® ds-DNA Quantitation Kit (Invitrogen, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

Para a verificação da qualidade das frações do SIP, foi realizada apenas uma PCR por fração, utilizando sempre 1 μL de DNA fracionado como *template* (DNA molde).

4.4.3 Amplificação por PCR do gene *pmoA*

Em relação à coleta realizada em 2008, foram amplificados os fragmentos existentes no DNA total, extraído do sedimento de cada um dos pontos do estudo: “impactado” e “não impactado”. Já em relação ao material coletado em 2009, foram amplificados os fragmentos existentes no DNA total extraído apenas do sedimento do ponto “impactado”.

Para as reações de amplificação do gene *pmoA*, que codifica para uma porção conservada da enzima pMMO, foram utilizados os *primers* já testados A189f (5' GGN GAC TGG GAC TTC TGG 3') desenhado por Holmes e colaboradores (1995) e mb661r (5' CCG GMG CAA CGT CYT TAC C 3'), desenhado por Costello e Lidstrom (1999).

Para a construção das bibliotecas, a PCR foi realizada em triplicata. As reações foram conduzidas da forma mais comumente utilizada no laboratório, conforme descrita por Knief e colaboradores (2005) para o mesmo par de *primers*. As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, contendo cerca de 50 ng do DNA molde, tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada um dos deoxirribonucleosídeos trifosfato, 0,25 µM de cada primer e 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Brasil). O controle positivo de reação foi preparado utilizando DNA extraído de cultivo que apresentava consumo regular de metano, e o controle negativo foi preparado substituindo o volume do DNA molde por DNA de *Escherichia coli*, ou pelo mesmo volume de água para PCR.

A amplificação foi programada para uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, rampa de 64 °C à 57 °C por 1 minuto (-0,2 °C por ciclo), e 72 °C por 1 minuto. Uma extensão final foi realizada a 72 °C por 7 minutos. A amplificação do fragmento esperado (510 pb) foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (w/v) em tampão TAE 1X, seguido de coloração em brometo de etídio e observação em luz ultravioleta. Os produtos foram purificados utilizando o kit Pure Link PCR Purification Kit (Invitrogen, Brasil) e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

3.4.4. Amplificação por PCR do fragmento de rRNA 16S

Foram amplificados os fragmentos existentes no DNA total extraído do sedimento do ponto “impactado” (coleta de 2009), e do DNA obtido das frações de DNA-SIP dos tempos de incubação t2 e t5. Para as reações de amplificação, foram utilizados os *primers* universais para o domínio bactéria 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') (LANE, 1991) e 1401R (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3') (FELSKE et al., 1996). Para a construção das bibliotecas, a PCR foi realizada em triplicata, utilizando diferentes concentrações de DNA molde.

As reações foram realizadas com volume final de 25 µL contendo o DNA molde, tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada um dos deoxirribonucleosídeos trifosfato, 0,25 µM de cada primer e 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Brasil). O controle positivo de reação foi preparado utilizando DNA extraído de cultivo bacteriano, e o controle negativo foi preparado substituindo o volume do DNA molde pelo mesmo volume de água para PCR.

O programa da reação de PCR foi: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos, e finalmente extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram verificados em géis de agarose 1,5%, corados posteriormente à corrida com brometo de etídio. Os produtos utilizados posteriormente para a construção de bibliotecas foram purificados utilizando o kit Pure Link PCR Purification Kit (Invitrogen) e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

4.4.5 Amplificação por PCR do gene rRNA 16S com primers com grampo

Para uma primeira investigação sobre a diferenciação das comunidades acessadas através do DNA separado em frações, após a aplicação da técnica de SIP, optou-se por realizar a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Para tanto foram realizadas duas tentativas de amplificação dos fragmentos do gene rRNA 16S existentes no DNA recuperado das frações de SIP, dos tempos de incubação t2 e t5. A primeira tentativa foi realizada utilizando 1 uL de *template*, e a segunda, 2 µL.

Os *primers* empregados para a amplificação de região hiper-variável V3 do gene rRNA 16S de Bactéria, gerando um fragmento de cerca de 190 pb, foram 338F-CG (5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG 3') (AMPE et al., 1999) 518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). A sequência do grampo de GC, sintetizada ao final do oligonucleotídeo 338F foi a seguinte: 5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G 3'.

As reações foram realizadas com volume final de 30 µL, contendo o DNA molde, tampão de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada um dos deoxirribonucleosídeos trifosfato, 0,20 µM de cada primer e 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum. O controle positivo de reação foi preparado utilizando DNA extraído de cultivo bacteriano, e o controle negativo foi preparado substituindo o volume do DNA molde pelo mesmo volume de água para PCR.

O programa de amplificação foi: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, e, finalmente extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram verificados em géis de agarose 1,5% e corados posteriormente à corrida com brometo de etídio.

4.4.6 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Alíquotas de 7 µL dos produtos amplificados com os primers 338F-CG/518R foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% com gradiente desnaturante de 30-55% e de 45-65%. A eletroforese vertical foi realizada no equipamento Ingeny PhorU2 (Ingeny, Netherland) e levou 15 horas a 60 °C, utilizando tensão de 90V. Os géis foram corados com nitrato de prata (MAECK et al., 1997), e a análise dos resultados foi qualitativa.

4.4.7 Construção das bibliotecas

Para a construção das bibliotecas foi utilizado o sistema de clonagem pGEM-T Easy Vector (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados os fragmentos amplificados em triplicata e purificados. A reação de ligação teve uma

concentração apropriada de produto de PCR para obter-se uma proporção de 3:1 (mol de inserto: mol de vetor) em um volume final de 10 μ L. Células competentes de *E. coli* JM109 foram transformadas com 2 μ L da reação de ligação utilizando-se o método de choque térmico 0 °/42 °C por 45 segundos (DUARTE, 2010).

As células transformadas foram inoculadas por espalhamento em meio Luria Bertani - LB, contendo ampicilina (100 μ g/mL), Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG 50 μ g/mL) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-Gal 40pg/mL). Neste caso, a ampicilina foi empregada para não permitir o crescimento de células que não receberam o vetor. Como o vetor utilizado possui o sistema β -Galactosidase induzido por IPTG e sinalizado pelo indicador X-Gal, é possível diferenciar os clones que receberam inserto (colônias brancas) dos que não receberam (colônias azuis). Cerca de 120 colônias brancas foram selecionadas para repique em uma nova placa, para confirmação da coloração branca.

4.4.8 Detecção do Inserto e Sequenciamento dos Clones

Os clones foram transferidos diretamente para a reação de PCR sem a necessidade de uma etapa de extração de DNA. A reação de PCR possuía um volume final de 50 μ L, contendo tampão de PCR 1X, 1,7 mM de $MgCl_2$, 0,8 mM de dNTPs, 0,3 μ M de cada primer e 1 U de Taq DNA Polimerase.

Os pares de *primers* utilizados para a amplificação dos clones do gene *pmoA* foram M13F (5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3') e M13R (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (pGEM-T-easy manual –Promega). Quanto ao gene rRNA 16S, visando obter apenas os fragmentos inseridos no vetor no sentido *forward* (regiões hipervariáveis V1-V3), foi utilizado o par de primers M13F e 1401R, como esquematizado na figura 12.

As reações de amplificação foram realizadas com ciclo inicial de desnaturação a 97 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, e 72 °C por 90 segundos, com extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos foram purificados e concentrados.

Após a purificação com o kit Pure Link PCR purification kit (Invitrogen), os produtos foram verificados em gel de agarose 1,5%, quantificados no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 e enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano (IB-

USP), que utilizam o sistema de sequenciamento MegaBACE 1000. Para a reação de sequenciamento dos clones, foi utilizado o *primer* T7-F (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') (pGEM-T-easy manual –Promega), com temperatura de anelamento de 56 °C.

Figura 12. Representação esquemática das possibilidades de inserção do fragmento clonado.

Representação dos insertos no vetor p-GEM	Primers para PCR	Sucesso na amplificação
M13F/ M13R	✓
M13F/ M13R	✓
M13F/ 1401R	✓
M13F/ 1401R	✗

O fragmento clonado está representado no retângulo cinza claro. A amplificação do fragmento do gene rRNA 16S foi obtida apenas no sentido *forward*, utilizando o par de *primers* M13F/1401R.

Fonte: Linhares (2011)

4.4.9 Análise da diversidade acessadas através das bibliotecas construídas.

As sequências foram editadas e organizadas em árvores filogenéticas utilizando-se os softwares BIOEDIT v7.0.9.0 (HALL et al., 1999), MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) e ARB (WOLFGANG et al., 2004). As sequências alinhadas foram avaliadas quanto à presença de quimeras com o software Bellerophon (HUBER; FAULKNER; HUGENHOLTZ, 2004) e então comparadas com sequências referência adquiridas nos bancos de dados “GenBank - National Center for Biotechnology Information” – NCBI (BENSON et al., 2005) e Ribosomal Database Project II – RDP II (COLE et al., 2008). Foram calculados os índices não paramétricos de estimativa de riqueza CHAO e ACE, e curvas de rarefação, empregando o programa DOTUR v1.53 (SCHLOSS et al., 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta e tomada de dados ambientais

Os dados ambientais coletados (pH, condutividade, oxigênio dissolvido, temperatura do sedimento e salinidade) indicam que, em relação aos parâmetros observados (Figura 13), os dois ambientes estudados (“impactado” e “não impactado”) são semelhantes. Apesar de os dois locais serem inundados durante os períodos de maré cheia, a baixa salinidade detectada pode ser atribuída à água doce do Rio Iriri, que corre próximo aos locais de coleta.

Figura 13. Variáveis ambientais nos locais de estudo “impactado” e “não impactado” do Manguezal de Bertioga, São Paulo.

Médias de 15 leituras das variáveis ambientais: pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e salinidade. Desvios maiores que 5%: condutividade, 39 e 6,89% e salinidade, 48 e 7,39%, “impactado” e “não impactado”, respectivamente.

Fonte: Linhares (2011).

Outros parâmetros ambientais foram mensurados por Dias et al. (2011) e parecem não diferir entre os dois pontos de coleta (Tabela 2). Porém, visualmente os dois ambientes são diferentes, principalmente em relação à presença de animais e ao estado da vegetação, ainda em recuperação no ponto contaminado.

Tabela 2. Composição físico-química de sedimentos do manguezal de Bertioga, Estado de São Paulo, coletados em ponto “impactado” e “não impactado” com derivados de petróleo.

Parâmetros	“Impactado”	“Não impactado”
Areia:silte:argila	35:50:15	57:38:05
Matéria orgânica (%)	10,89	11,43
Carbono total (%)	6,05	6,35
Carbono orgânico (%)	5,15	5,19
Nitrogênio total (%)	0,31	0,34
Enxofre total (%)	0,32	0,20

Fonte: Adaptado de Dias et al. (2011). Com permissão

A não detecção de O₂ dissolvido, mesmo a poucos centímetros da superfície, indica que o ambiente é anaeróbio. No entanto, não é descartada a presença de micro-habitats microaerófilos, principalmente se for considerada a atividade de pequenos animais que revolvem o sedimento, como pequenos caranguejos. Apesar de as bactérias metanotróficas serem descritas como aeróbias estritas, condições de baixa concentração de oxigênio podem não ser limitantes do crescimento do grupo. Como já observado por Henckel et al. (2000), há metanotróficas capazes de crescer a baixas tensões de O₂, e até mesmo em reatores de biogás (RASTOGI et al, 2009).

Ainda que os sedimentos considerados sejam estritamente anóxicos, estudos recentes mostram ser possível a oxidação aeróbia do metano em ambientes anaeróbios (ETTWIG et al., 2010; LUESKEN, et al., 2011; RAGHOEBARSING et al., 2006; WU et al., 2011). Ettwig et al. (2010) obtiveram a bactéria “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*” como dominante em enriquecimentos anaeróbios à partir de vários ecossistemas aquáticos, na presença de nitrito e com metano como fonte de carbono. Inicialmente o metagenoma deste enriquecimento foi obtido através de pirosequenciamento com 454, além de sequenciamentos realizados com Illumina e com o método Sanger. Não foi verificada a presença de Archaea neste enriquecimento, e a compilação dos dados permitiu a obtenção do genoma completo de “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*”, no qual estava contida a via completa para a oxidação aeróbia do metano, incluindo o *operon* para a síntese de pMMO.

Ao invés de captar o oxigênio do ambiente, como as bactérias metanotróficas tradicionalmente aeróbias, ou então oxidar o metano pela via reversa da metanogênese, como fazem certas archaeas metanogênicas, *M. oxyfera* produz intracelularmente o gás oxigênio utilizado na via clássica de oxidação do metano, envolvendo a enzima Metano Mono-oxigenase (WU et al., 2011).

A “produção” intracelular do oxigênio é dependente de nitrito (NO_2^-), que primeiramente é reduzido a óxido nítrico (NO) pela enzima nitrito redutase. Seguindo nesta via, duas moléculas de óxido nítrico são convertidas nos gases nitrogênio (N_2) e oxigênio (O_2), mas ainda não se sabe exatamente qual enzima catalisa esta reação (ETTWIG et al., 2010). O oxigênio gerado seria utilizado principalmente para a oxidação aeróbia do metano, de acordo com a relação estequiométrica proposta por WU et al. (2011):

A linhagem *M. oxyfera* não foi isolada até o momento, mas pertence ao Filo NC10, definido apenas pelas sequências do gene do rRNA 16S (WU et al., 2011). Embora tenhamos poucas informações sobre esta linhagem, sua descoberta reforça a possibilidade de encontrarmos bactérias com enzimas oxigenases funcionais em ambientes anaeróbios.

5.2 Enriquecimento e primeiros repiques

O trabalho com as amostras de sedimento dividiu-se inicialmente em duas frentes: i) cultivo para isolamento e ii) construção de bibliotecas de clones do gene *pmoA*. O cultivo foi realizado em meio NMS salino, em frascos com atmosfera controlada mantida em proporção aproximada de 90% de ar atmosférico e 10% de gás metano.

O meio NMS é amplamente utilizado para o cultivo, isolamento e manutenção de bactérias metanotróficas (BOWMAN, 2006). *Methylocystis rosea* (WARTIAINEN et al., 2006), *Methylocella silvestris* (DULFIELD et al., 2003) e *Methylosarcina lacus* (KALYUZHNYA et al., 2005) são exemplos de micro-organismos isolados neste meio.

Por tratar-se de material proveniente de região estuarina, era esperada a presença de uma comunidade microbiana halofílica. Visando manter esta comunidade, optou-se por alterar o meio NMS original, adicionando-se água do mar (~3,5% em NaCl) esterilizada (autoclavação e filtração), em quantidade suficiente para atingir uma concentração de NaCl

em torno de 1,2%. Na tentativa de minimizar a contribuição de carbono orgânico oriundo da água do mar, esta água foi coletada em mar aberto, próximo à Península Antártica, onde se espera um ambiente muito oligotrófico.

Adaptações ao meio NMS já foram utilizadas por vários autores, visando suprir demandas específicas dos grupos alvos. Tsubota (2005) suplementou o meio NMS com 0,25 g/L de NH_4Cl no estudo que resultou no isolamento de *Methylothermus thermalis*, e Bowman et al. (1997) testou diferentes concentrações de água do mar adicionada ao NMS para o isolamento de *Methylosphaera hansonii*.

Um meio de cultura utilizado com menor frequência é o descrito por Heyer² et al. (1993), que apresenta 220 μg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /L. A intenção com este meio é favorecer a expressão de pMMO, que é dependente de cobre. Neste trabalho não houve esta preocupação, pois concentrações traço de cobre (Cu) já são suficientes para a atividade desta enzima, além do que a presença de outros sais na água do mar, além dos que constituem o meio NMS, também foi considerada uma vantagem neste sentido.

Segundo Bowman (2006), a maioria das bactérias metanotróficas resiste a apenas cerca de uma semana sem receber alimentação (adição) com metano, portando os enriquecimentos foram realizados em até 4 dias após a coleta dos sedimentos. O consumo estável de metano se estabeleceu em poucos dias (Figura 14), indicando que a comunidade metanotrófica está presente e é ativa *in situ*. Na última amostragem registrada no gráfico da Figura 14, nota-se que em menos de 12 h houve consumo de mais de 90% do metano adicionado. A duplicata de enriquecimento do sedimento do ponto “impactado” foi perdida, mas o padrão de consumo de metano mostrou-se muito semelhante para as duas condições testadas (C1 e C2 – não impactado e C3 – impactado).

² Traduzido de Heyer, J.; Malashenko, Y.; Berger, U.; Budkova, E. (1984). Verbreitung methanotropher Bakterien. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*. 24 (10): 725-744, por pesquisadores do Laboratório de Geotecnia da Universidade de Sherbrooke, Canadá.

Figura 14. Estabelecimento de consumo estável de metano pelos enriquecimentos iniciais.

Os enriquecimentos foram realizados à partir de amostras de sedimento “impactado” e “não impactado” do manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil). As flechas indicam as adições (alimentações) de CH_4 .

Fonte: Linhares (2011)

Chegando ao décimo dia de enriquecimento, foi realizado o primeiro sub-cultivo dos frascos C1, C2 e C3, em duplicata, gerando C1a, C1b, C2a, C2b, C3a e C3b. Cerca de 20 h após a primeira adição de metano, todos os cultivos, com exceção do frasco C3a, apresentaram consumo de mais de 50% do gás adicionado (Figura 15). À partir da segunda adição, no terceiro dia de incubação, o consumo já se mostrou estável para todos (Figura 16) e os frascos C1b, C2b e C3b foram escolhidos para continuar a série de sub-cultivos, todos apresentando consumo estável do gás metano.

Figura 15. Consumo de metano pelos primeiros sub-cultivos em duplicata, após a primeira alimentação com metano.

Fonte: Linhares (2011)

Figura 16. Consumo de metano pelos primeiros sub-cultivos em duplicata, após a segunda alimentação com metano.

Fonte: Linhares (2011)

O cultivo em frascos de ampicilina lacrados com batoques de borracha foi muito adequado por permitir a amostragem de gás no *headspace* e o monitoramento do consumo de metano (BODELIER et al., 2005; LIOTTI, 2007; KALLISTOVA, 2005). A concentração de 10% de metano introduzida no *headspace* foi também utilizada por vários autores, como Newby et al. (2004), Kallistova et al. (2005) e Liotti (2007).

A metodologia utilizada para mensurar o metano também foi adequada, visto que as porcentagens obtidas por cromatografia foram condizentes com os volumes adicionados nos frascos. Os desvios nos valores das áreas de pico de metano nos cromatogramas, entre as triplicatas (dados não mostrados), foram devidos a imprecisão das agulhas e seringas utilizadas na introdução dos gases nos frascos de cultivo, do manuseio e das análises cromatográficas. Por se tratar de um trabalho em que são em geral comparados extremos das variações na concentração de metano (normalmente de 0% até 15%), estes erros não causaram impacto no andamento do trabalho. Porém, caso houvesse a intenção de determinar a cinética da oxidação do metano, esta questão deveria ser melhor averiguada.

Quanto aos tipos celulares observados, imagens de microscopia de fundo claro com coloração de Gram indicam que a composição a básica de cada comunidade foi pouco alterada ao longo da seqüência de repiques. Todos os cultivos apresentaram grande variedade de tipos celulares, tanto gram-positivos quanto gram-negativos.

Em linhas gerais, os cultivos da sequência de repiques realizados à partir do sedimento do ponto “não impactado” apresentaram poucas estruturas filamentosas, que diminuíram gradualmente até quase desaparecer no último repique. Em toda a sequência foi verificada a presença de protozoários que não foram identificados. No início, foi observada certa predominância de células gram-negativas, que foi perdida gradualmente ao longo dos repiques, até chegar a distribuição aparentemente homogênea entre gram-negativas e positivas.

Na sequência de repiques realizados a partir do sedimento do ponto impactado com óleo (“impactado”), houve grande quantidade de estruturas filamentosas, que também foram sendo perdidas ao longo dos repiques. Não foram observados protozoários, diferente do ocorrido na outra amostra, e houve clara predominância de células gram-negativas em toda a sequência.

5.3 Isolamento

5.3.1 Diluições seriadas

Os três últimos sub-cultivos da série descrita no item anterior foram utilizados para a execução de diluições decimais seriadas. As diluições foram realizadas na faixa de 10^{-1} a 10^{-9} , em frascos de 30 mL. Após cerca de 20 dias de incubação, as diluições de 10^{-8} apresentaram consumo de metano e foram selecionadas para as próximas etapas do isolamento.

5.3.2 Roll-tubes

As culturas das diluições selecionadas foram inoculadas nos tubos de *roll-tube* contendo meio NMS salino fundido. Foram utilizados dois *roll-tubes* para cada uma das 3 culturas de diluição (originárias de C1, C2 e C3), totalizando seis frascos. Estes foram imediatamente rolados em bandeja com água gelada até a solidificação uniforme do meio com agarose.

Este tipo de incubação é interessante, pois permite acompanhar o desenvolvimento das colônias (Figura 17), assim como mensurar o consumo de metano nos frascos.

Figura 17. Crescimento de colônias na lâmina de meio NMS solidificado, nas paredes internas do frasco tipo roll-tube.

Fonte: Linhares (2011)

Em todos os *roll-tubes* houve crescimento de colônias com borda regular, e cerca de 3 ou 4 colônias foram transferidas de cada tubo para frascos contendo meio NMS salino líquido, totalizando 20 novos cultivos. Estas colônias foram selecionadas com base em suas características morfológicas, que se restringiram à: branca translúcida (~2mm), branca opaca grande (entre 2 e 5mm), branca opaca pequena (<2mm), marrom (~2mm) e bege (<2mm).

Estes cultivos foram alimentados com metano à 10%, e também monitorados quanto ao consumo do gás. Os frascos que apresentaram consumo em 10 dias foram sub-cultivados e destes sobraram cinco (5) que melhor consumiam o metano adicionado periodicamente, todos provenientes do sedimento do ponto “não impactado”. Os sub-cultivos que tiveram origem no sedimento do mangue “impactado” não apresentaram consumo de metano no tempo considerado.

Mesmo após esta etapa de cultivo em *roll-tube*, não foram obtidas culturas puras, mas sim culturas com dominância de certos tipos celulares, como evidenciados por microscopia com coloração de Gram. Considerando-se estas características, procedeu-se então com uma nova etapa de *roll-tubes*, à partir de cultivos com as seguintes morfologias: A) colônia branca translúcida, cocos Gram-negativos; B) colônia branca grande, cocos Gram-negativos; e C) colônia branca pequena, cocobacilos Gram-negativos.

Cada um destes três cultivos foi diluído até 10^{-8} , e 100 μL das diluições 10^{-5} e 10^{-8} foram inoculados em novos *roll-tubes*. Passados cerca de 40 dias de incubação, apenas o *roll-tube* de concentração 10^{-5} do cultivo “A” apresentou crescimento, embora não tenha sido constatado consumo do metano adicionado a nenhum dos frascos.

Do roll-tube do cultivo “A” foram obtidas:

- a) 187 colônias de borda regular, coloração branca opaca, até 1 mm.
- b) 33 colônias de borda regular, coloração branca furta cor, de 1 até 3 mm.
- c) 8 colônias de borda irregular, coloração esbranquiçada ficando transparente nas margens, tamanho de cerca de 2 mm.

A seguir, 8 colônias de cada tipo morfológico foram transferidas para meio NMS salino líquido e apenas os cultivos das colônias brancas furta cor apresentaram consumo estável de metano em até 5 dias.

Através da coloração de Gram foi possível observar que nestes cultivos havia grande dominância de cocos Gram-negativos, porém ainda havia a presença de pequenos bacilos. Até o momento não foi obtido uma cultura pura, mas estes cultivos estão sendo mantidos viáveis e apresentam consumo de metano.

Além desta técnica, o emprego de placas de Petri contendo meio NMS sólido, incubadas em jarras de atmosfera controlada, é bastante utilizado para a obtenção de colônias metanotróficas (DEDYSH et al., 2007; RAHALKAR et al., 2007; WARTIAINEN et al., 2006). Embora desta forma seja mais difícil acompanhar a formação das colônias, a recuperação das mesmas pode ser mais simples, visto que com o *roll-tube* muitas vezes as colônias ficam inseridas no ágar, sendo difícil removê-las.

Como não tínhamos no laboratório uma jarra onde fosse possível adicionar metano, foi adaptado outro método de isolamento, no qual as colônias cresceriam apenas sobre o meio solidificado. Este método consistia na inoculação por espalhamento na superfície do meio NMS sólido (1,5% de agarose), contido dentro de frascos de reagente fechados com tampa de borracha (Figura 18) e alimentados com metano. Mesmo após estes esforços, não foram obtidos isolados capazes de utilizar o metano como única fonte de carbono.

Figura 18. Frasco com meio mineral NMS inclinado.

Fonte: Linhares (2011)

5.4 Primeira abordagem para acessar a diversidade funcional de bactérias metanotróficas, através de bibliotecas do gene *pmoA*

Apesar de não resultar no isolamento de bactérias oxidadoras do metano, os cultivos demonstraram a existência de uma comunidade metanotrófica ativa. Inicialmente, havia também o interesse em verificar se o evento da contaminação poderia refletir em composições diferentes da comunidade nas amostras dos dois pontos de estudo, “impactado” e “não impactado”.

Assim, a estratégia para acessar a diversidade deste grupo foi a construção de bibliotecas de clones do gene *pmoA*. Para tanto, o DNA bacteriano extraído do sedimento dos dois pontos em estudo foi utilizado como *template* para a reação de PCR com os *primers* específicos A189f e mb661r.

A etapa de clonagem foi realizada com o sistema pGEM-T-easy vector (Promega), e células competentes para choque térmico (Promega). A quantidade de clones sequenciados de cada biblioteca e a forma de tratamento dos dados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3. Quantidade de clones sequenciados para cada biblioteca do gene funcional *pmoA*, e programas utilizados para cada tipo de análise dos dados.

Nº de clones “Não Impactado”	Nº de clones “Impactado”	Edição das sequências	Análise filogenética	Índices de diversidade e curva de rarefação
30 clones	27 clones	BioEdit	Mega 4.0	Dotur

Fonte: Linhares (2011)

Na literatura não foi descrito o valor de *cut-off* adotado pelos pesquisadores para a determinação do número de OTU's (Operational Taxonomic Units) ou OPFs (Operational Protein Families) encontradas. Sendo assim, o valor de *cut-off* proposto neste trabalho foi obtido manualmente, através da análise de 110 sequências de *pmoA* pesquisadas de linhagens no Genbank, distribuídas entre os diversos representantes do grupo funcional de bactérias metanotróficas. As sequências (nucleotídeos e aminoácidos) analisadas correspondem à posição de aminoácidos de 10 a 162 do fragmento de *pmoA* de *Methylococcus capsulatus*. Foram pesquisadas as porcentagens de dissimilaridade entre sequências de diferentes famílias e gêneros (Figura 19).

Figura 19. Exemplo de um trecho do banco de sequências de *pmoA*, utilizado para identificar o melhor valor de cut-off em nível de gênero.

As colunas coloridas representam aminoácidos em posições conservadas nos gêneros *Methylocystis* sp e *Methylosinus* sp.

Fonte: Linhares (2011)

Os resultados indicaram que, em relação às sequências de nucleotídeos, o melhor valor de *cut-off* para o nível de gênero é de 25% de dissimilaridade. A determinação do melhor valor de *cut-off* em 25% gerou um número de OTUs que concordaram com o número de gêneros observados na filogenia obtida, e com as identidades mais semelhantes pesquisadas no Genbank do NCBI (Tabela 4).

Para verificar a representatividade das bibliotecas construídas, foi calculada uma curva de rarefação com o programa Dotur (SCHLOSS et al., 2005). Os resultados estão apresentados na figura 20 e na tabela 4, e mostram que apenas a biblioteca referente ao ponto “não impactado” foi considerada representativa.

Figura 20. Comparação das curvas de rarefação (*cut-off* 25%) das bibliotecas do gene funcional *pmoA*, que representam os locais “impactado” e “não impactado”.

As curvas foram construídas pelo programa Dotur, à partir do alinhamento de fragmentos de 508 bases do gene *pmoA*, amplificado com os *primers* A189f e mb661r

Fonte: Linhares (2011)

Tabela 4. Estimativas de riqueza e diversidade das bibliotecas gênicas de *pmoA*, representando as amostras do manguezal de Bertioga, litoral de São Paulo.

Local	Riqueza CHAO (OTUs)	Riqueza ACE (OTUs)	Riqueza observada ^a	cobertura ^b %	Diversidade Shannon	Dominância Simpson
“Não impactado”	4	4	4	100	1,0755	0,3724
“Impactado”	6,5	7,79	6	83,9	1,4059	0,2849

Os cálculos foram realizados pelo programa DOTUR com base em matrizes de nucleotídeos, exceto para os parâmetros “Riqueza observada” e porcentagem “cobertura (%)”. Notas: a) N° de gêneros encontrados segundo as identidades semelhantes do BLAST (NCBI), em concordância com os agrupamentos da árvore filogenética gerada neste estudo. b) Porcentagem de cobertura é a razão do número de OTUs observadas pela média do número de OTUs estimadas (baseada nas estimativas de CHAO e ACE).

Fonte: Linhares (2011)

O sequenciamento de 57 clones permitiu verificar nos dois pontos a ocorrência de representantes de duas famílias do grupo: *Methylococcaceae* e *Methylocystaceae* (Figura 21). A maioria das sequências é relacionada a clones de sedimento marinho, mas fracamente relacionadas a gêneros conhecidos, sugerindo a existência de novos táxons, como mencionado por Elsaied, Hayashi e Nagamura (2004).

As sequências obtidas à partir da biblioteca do mangue “impactado” foram agrupadas em sua maioria com sequências relacionadas à família *Methylococcaceae*, sugerindo que a contaminação por hidrocarbonetos pode ter favorecido o desenvolvimento de organismos da família. Porém, a cobertura da biblioteca em questão não foi satisfatória a ponto de justificar esta afirmação, além de que mais estudos são necessários para tentar explicar esta distribuição. Comparativamente, os índices de diversidade também apontam que a amostra de sedimento do local “impactado” apresenta maior diversidade (Tabela 4).

Os resultados apresentados a seguir são suficientes para discutir as diferenças entre os grupos dominantes de bactérias metanotróficas acessados nas amostras coletadas. No entanto, considerando-se a limitação do método de extração e a amostragem empregada, a biodiversidade não pode ser extrapolada para toda a área de mangue estudada.

Figura 21. Árvore filogenética com as sequências do gene *pmoA*, obtidas das bibliotecas genômicas construídas à partir de amostras de sedimento de manguezal.

Filogenia baseada no alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidos de fragmento do gene funcional *pmoA*, amplificado com os primers A189F e mb661R. As sequências de referência foram adquiridas no GeneBank do NCBI, e os números de acesso estão indicados entre parênteses. O método utilizado foi o Neighbor-Joining e os números nos ramos indicam valores de Bootstrap com N=2000. A barra indica o número de substituições por sítio.

Fonte: Linhares (2011).

De acordo com as buscas em bancos de dados, no conjunto de sequências obtidas em ambas as bibliotecas não estavam presentes representantes de outros grupos de bactérias metanotróficas, como *Crenothrix polyspora* e aqueles incluídos no Filo Verrucomicrobia. Porém, não se pode excluir a possibilidade de que estejam presentes no ambiente, primeiro porque a cobertura das bibliotecas não foi completa e segundo, e mais importante, porque estes organismos possuem um gene *pmoA* atípico, que passou a ser acessado apenas através da utilização de *primers* modificados e/ou condições pouco restritivas de PCR (POL et al., 2007; STOECKER et al., 2006).

Stoecker et al. (2006) observaram que embora *C. polyspora* fosse filogeneticamente associada ao grupo das γ -Proteobacteria (de acordo com os alinhamentos do gene do rRNA 16S), o gene *pmoA* desta linhagem se agrupava mais proximamente ao gene *amoA* de β -Proteobacteria (Figura 22). O gene *amoA* em questão codifica um fragmento da enzima Amônia Mono-oxigenase (AMO), e apresenta alto grau de conservação, no nível da sequência de aminoácidos, com o gene *pmoA* das metanotróficas, sugerindo que as enzimas possam ser evolutivamente relacionadas (MURRELL; RADAJEWSKI, 2000).

Para obter amplificação para tal gene *pmoA* atípico, os autores realizaram algumas modificações no par de primers (A189gc/mb661) utilizado por Costello e Lidstrom (1999), gerando o par pmof1 5'-AAC TTC TGG GGN TGG AC-3' e pmor 5'-RCN ACG TCN TTA CCG AA-3'.

Apesar das diferenças marcantes, os autores afirmam que a sequência obtida como sendo do gene *pmoA* de *C. polyspora* carrega assinaturas importantes da enzima pMMO, presente em outras metanotróficas do mesmo Filo (Proteobacteria).

Pol et al. (2007) também obtiveram amplificação do que seria o gene *pmoA* da linhagem *Acidimethylocilex fumarolicum*, pertencente ao Filo Verrucomicrobia (Figura 22). Para tanto, a reação de PCR foi realizada em condições pouco restritivas (48 °C para temperatura de anelamento), utilizando o par de primers A189/A682, que pode também amplificar o gene *amoA*.

Figura 22. Relação filogenética entre os polipeptídeos deduzidos dos fragmentos dos genes funcionais *pmoA* e *amoA*.

Fonte: Pol et al. (2007)

Uma observação interessante sobre isto é que, principalmente entre os autores que descobriram as linhagens metanotróficas do Filo Verrucomicrobia, não há consenso sobre como teria se dado no grupo a evolução do gene que codifica esta enzima para a oxidação do metano. As hipóteses levantadas relacionam-se à transferência horizontal de genes, à divergência precoce de bactérias metanotróficas dos Filos Proteobacteria e Verrucomicrobia, e até mesmo à evolução independente de um novo aparato para a oxidação do metano (DUNFIELD et al., 2007; ISLAM et al., 2008; POL et al., 2007).

O agrupamento destas novas sequências levanta um questionamento importante quando se fala da reconstituição filogenética de bactérias metanotróficas à partir de

sequências do gene *pmoA*, recurso bastante usado até o momento. Quando os grupos reconhecidos classicamente como metanotróficos eram pertencentes ao Filo Proteobacteria, esta relação era bem estabelecida. Porém, com o reconhecimento de novos grupos, que possuem o gene *pmoA* atípico, esta relação tornou-se questionável.

Considerando estes aspectos, nota-se que o estudo da diversidade de bactérias metanotróficas através do acesso ao gene funcional *pmoA* tornou-se mais limitado, uma vez que tal grupo agora se mostra filogeneticamente mais abrangente. Isso porque utilizando os genes funcionais como alvo, os micro-organismos acessados tendem a ser aqueles mais próximos das linhagens já descritas, podendo subestimar a diversidade daqueles que exercem a função estudada.

Dessa forma, tornou-se mais interessante buscar novos meios para estudar a comunidade funcional utilizando técnicas que complementam ou não dependem do estudo de genes funcionais já identificados. A utilização da técnica de DNA-SIP, utilizando o metano como substrato marcado com isótopo estável, pode servir bem a este propósito quando tem como alvo o gene rRNA 16S. Uma limitação importante é que apenas os micro-organismos ativos nas condições de enriquecimento com o substrato marcado serão acessados, o que torna esta técnica complementar aos métodos mais tradicionais de estudo.

5.5 Estudo da comunidade metanotrófica em amostra do sedimento “impactado” – Emprego da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$

Através das bibliotecas discutidas no item anterior, foi observada a presença de bactérias das duas famílias de metanotróficas em amostras de sedimento dos pontos “impactado” e “não impactado”, embora não seja possível explicar sua distribuição. Para a continuação dos estudos sobre a comunidade metanotrófica local, agora com o emprego da técnica de DNA-SIP, o ponto “impactado” foi escolhido por se tratar do ambiente com maior diversidade entre os dois locais de estudo (segundo as comparações das bibliotecas anteriores).

Primeiramente, optou-se por construir uma nova biblioteca do gene *pmoA*, à partir do mesmo lote de sedimento homogeneizado que seria utilizado nos enriquecimentos para a utilização da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$. O objetivo, neste caso, foi obter as identidades dos micro-organismos metanotróficos à partir das sequências de *pmoA*, e assim poder comparar

o resultado com as identidades dos micro-organismos ativos, obtidas à partir das sequências do gene rRNA16S.

Sendo assim, este trabalho não só aborda a questão de diversidade e distribuição, como também discute os resultados obtidos por duas técnicas para o estudo de uma mesma comunidade alvo, no caso de bactérias oxidadoras de metano.

Foi então construída uma biblioteca de clones do gene *pmoA*, para identificar os táxons predominantes de bactérias metanotróficas. O procedimento realizado foi o mesmo descrito anteriormente e foram sequenciados 57 clones, o suficiente para conseguir uma cobertura razoavelmente estável com um *cut-off* de 25% (Figura 23).

Figura 23. Curva de rarefação (*cut-off* 25%) da biblioteca do gene funcional *pmoA* (sedimento do mangue “impactado”, coleta de 2009).

As sequências foram obtidas da biblioteca do gene funcional *pmoA*, construída a partir do DNA total extraído de sedimento do mangue “impactado”, referente à coleta de 2009. A curva foi calculada pelo programa Dotur, à partir do alinhamento de fragmentos de 508 bases do gene *pmoA*, amplificado com os *primers* A189f e mb661r.

Fonte: Linhares (2011)

As sequências foram editadas com o *software* BioEdit e pesquisadas quanto à identidade e similaridade no Genbank, utilizando a opção BLAST. A árvore filogenética construída com estas sequências dos aminoácidos deduzidos está representada nas figuras 24 e 25, onde nota-se a presença das famílias Methylococcaceae e Methylocystaceae em proporção semelhante àquela obtida com a biblioteca referente à coleta de 2008. Cerca de 80% dos clones obtidos nesta nova biblioteca foram agrupados junto à família Methylococcaceae.

Figura 24. Árvore filogenética com as sequências do gene *pmoA*, obtidas das bibliotecas genômicas construídas à partir do sedimento de manguezal do local “impactado”.

Árvore filogenética baseada no alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidos do gene funcional *pmoA*. As sequências de referência foram adquiridas no GeneBank (números de acesso entre parênteses). O método utilizado foi o Neighbor-Joining e a barra indica o número de substituições por sítio.

Fonte: Linhares (2011).

A Figura 24 apresenta uma árvore filogenética com a família Methylococcaceae expandida, mostrando todos os clones. Vê-se uma grande quantidade de sequências alinhadas com o gênero *Methylomonas* e, em especial, observa-se um grande agrupamento cuja referência mais próxima é um organismo não cultivável (Uncultured bacterium – FN600101.1). Esta sequência de referência foi obtida de uma amostra de solo da rizosfera de *Oryza sativa* (arroz), em um arrozal na Itália. Realmente, já foram observados grupos de bactérias metanotróficas não cultivadas relacionadas à arrozais em diversas partes do mundo, em especial na China (LÜKE et al., 2010).

Na figura 25, a seguir, o destaque é dado para a Família Methylocystaceae, e observa-se novamente a presença apenas do gênero *Methylocystis*.

Figura 25. Árvore filogenética baseada no alinhamento de sequências de aminoácidos deduzidos do gene funcional *pmoA*, amplificado à partir de sedimento de manguezal do ponto “impactado”.

As sequências de referência foram adquiridas no GeneBank (números de acesso entre parênteses). O método utilizado foi o Neighbor-Joining e a barra indica o número de substituições por sítio.

Fonte: Linhares (2011)

Assim como nas bibliotecas de *pmoA* anteriores, há grande porcentagem de sequências agrupadas com as de organismos não cultivados, demonstrando a carência de isolados caracterizados do grupo.

Considerando este conjunto de resultados, seguiu-se adiante com os experimentos empregando a técnica de marcação dos isótopos estáveis (SIP).

5.6 Microcosmos para a aplicação da técnica de DNA-SIP

4.6.1. Enriquecimento

Para o experimento de DNA-SIP, 10 frascos de cultivo foram preparados com 5g de sedimento, meio NMS, e então enriquecidos com cerca de 10% de metano na atmosfera (cinco deles com metano marcado, $^{13}\text{CH}_4$). Os 5 frascos incubados com metano não marcado foram denominados t1, t2, t3, t4 e t5, e aqueles incubados com metano marcado são t1', t2', t3', t4' e t5'. Toda vez que o consumo de metano atingia cerca de 95%, o *headspace* dos frascos eram renovados e mais 8% de metano era adicionado. Conforme os resultados apresentados na figura 26, a microbiota estava ativa na oxidação do metano, uma vez que os frascos incubados com $^{12}\text{CH}_4$ e $^{13}\text{CH}_4$ apresentaram consumo crescente e rápido do gás a cada nova realimentação.

Figura 26. Representação gráfica mostrando o consumo e realimentação de $^{12}\text{CH}_4$ (A) e $^{13}\text{CH}_4$ (B), nos pares de frascos de t1 até t5.

Figura 26 A

Figura 26 B

As concentrações de metano foram determinadas em triplicata, e os dados representam os valores médios. As setas indicam os momentos de adição de metano.

Fonte: Linhares (2011).

A porcentagem de metano adicionada ao enriquecimento está de acordo com o praticado em outros trabalhos, nos quais em geral foram adicionados de 5 a 10% de metano a cada nova alimentação (CÉBRON et al. 2007a,b; MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005).

O tempo de incubação foi curto se comparado a outros trabalhos, e a adição de meio de cultura certamente contribui para esta rapidez, como mostram os resultados representados na figura 27, retirada de um trabalho publicado por Cébron et al. (2007a,b).

Nos primeiros trabalhos realizados empregando a técnica de SIP, imaginava-se que a adição de meio de cultura pudesse mascarar a diversidade microbiana do ambiente, uma vez que as condições nutricionais seriam bastante diferentes das originais. No entanto, embora não seja desconsiderada esta interferência, observou-se que esta suplementação é na verdade bastante valiosa para evitar o *cross-feeding*, muito frequente principalmente depois de tempos mais longos de incubação (CÉBRON et al. 2007a,b; MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005).

Figura 27. Consumo de metano observado em enriquecimentos de solo com metano marcado, realizados em diferentes condições de incubação.

As concentrações de metano foram determinadas em triplicata, e os dados representam os valores médios. As condições de incubação estão indicadas nas figuras. As setas indicam os momentos de adição de metano (5mL ou 0,2mmol).

Fonte: Cébron et al. (2007a)

Para recuperar o DNA do material de cada tempo de enriquecimento, um par de frascos (um incubado com ¹³CH₄ e outro com ¹²CH₄) era retirado da incubação, conforme o consumo atingia um valor acumulado de 0.2, 0.7, 1.4, 1.7 e 2.2mmol/frasco (t1, t2, t3, t4 e t5). A figura 28 mostra o consumo de metano acumulado, em mmol por frasco. Os tempos de retirada, em horas, foram os seguintes: t1 - 48h; t2 - 96h; t3 - 190h; t4 - 216h e t5 - 240h.

Figura 28. Consumo acumulado de metano em cada frasco de enriquecimento para a técnica de DNA-SIP ¹³CH₄.

Os frascos t1, t2, t3, t4 e t5 foram incubados com ¹²CH₄, e os frascos t1', t2', t3', t4' e t5' incubados com ¹³CH₄.
Fonte: Linhares (2011)

Os tempos de incubação foram escolhidos com base em observações de trabalhos anteriores, que relatavam a necessidade de um consumo mínimo de metano (0,2 até 0,8mmol/ 5g de solo), para que fosse possível separar a fração de DNA pesado (CÉBRON et al. 2007a; MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005).

Realizado o enriquecimento nos diferentes tempos de incubação, o sedimento foi recuperado através da centrifugação de todo o material de cada um dos frascos. A extração de DNA a partir do material recuperado também foi realizada utilizando-se o Kit Power Soil, da MoBio.

5.6.2 Ultracentrifugação e fracionamento

As etapas de ultracentrifugação, fracionamento, recuperação e quantificação foram realizadas com sucesso, segundo descrito no item 3.4.2. A figura 29 apresenta os gráficos da distribuição da quantidade absoluta de DNA, em relação à densidade de cada fração, para os pares de frascos alimentados com $^{12}\text{CH}_4$ (^{12}C -DNA) e $^{13}\text{CH}_4$ (^{13}C -DNA), a cada tempo de incubação.

Figura 29. Quantidades de DNA normalizadas para cada uma das alíquotas recuperadas após fracionamento.

(continua)

Figura 29-A

(continua)

Figura 29-B

Figura 29-C

Figura 29-D

(conclusão)

Figura 29-E

Frações obtidas com a aplicação da técnica de DNA-SIP, tanto relativas aos enriquecimentos com $^{12}\text{CH}_4$ (^{12}C -DNA linha pontilhada), quanto aos enriquecimento com $^{13}\text{CH}_4$ (^{13}C -DNA linha cheia). Os números na área de plotagem representam as frações de destaque. Os gráficos dos tempos de incubação t1 a t5 estão representados pelas letras de (A) até (E).

Fonte: Saia et al. (2010)

As distribuições de densidades das frações do ^{12}C -DNA e ^{13}C -DNA provenientes dos microcosmos no tempo de incubação t1 (Figura 29-A) são praticamente as mesmas, estando a maior quantidade de ^{12}C -DNA na fração 15, e de ^{13}C -DNA na fração 16. Estes resultados demonstram que no tempo de incubação 1 (t1) não houve incorporação do carbono do $^{13}\text{CH}_4$ no DNA da microbiota.

As Figuras 29-B a 29-E mostram que houve incorporação do isótopo carbono-13 do metano no DNA da microbiota. O ^{13}C -DNA ocupou as frações de 9 a 12, com maior quantidade de DNA na fração 12 para todos os tempos de incubação. A figura 29-B mostra que, com 96 horas de incubação e consumo de 0,7mmol de metano, o ^{13}C já havia sido incorporado no DNA da microbiota ativa no metabolismo de oxidação do metano. O DNA “leve” (^{12}C -DNA) do frasco alimentado com $^{13}\text{CH}_4$, ou seja, o DNA da microbiota que não participa diretamente do metabolismo do metano nas condições estudadas, ocupou as frações de 14 à 17.

Os frascos controle (alimentados com $^{12}\text{CH}_4$) mostram que o ^{12}C -DNA, proveniente dos micro-organismos que participam ou não do metabolismo do ^{12}C -metano, ocupou as frações 13-16, com maior quantidade na fração 14.

À partir destes resultados, as frações dos tempos t2 e t5 foram escolhidas para a continuação dos estudos; t2 porque foi o primeiro tempo onde se detectou ^{13}C -DNA, e o t5 porque representa o final do enriquecimento.

5.7 Acesso à diversidade microbiana com a técnica de DNA-SIP

5.7.1 Primeiras verificações - DGGE

Para testar a qualidade do material, as frações de t2 e t5 foram submetidas à PCR com os *primers* 27F e 1401R, universais para o Domínio Bacteria. Para cada reação de amplificação foi adicionado como *template* 1 μL de DNA fracionado. Houve amplificação em praticamente todas as frações, indicando que há DNA em todas elas, mesmo que em concentrações traço.

Com o DNA das frações dos tempos 2 e 5 também foram realizadas PCRs para amplificação da região V3 do rRNA 16S com *primers* com grampo, para DGGE. Os produtos da PCR foram verificados em gel de agarose a 1%. Não houve amplificação para todas as frações como ocorreu com o primer 27F/1401R, o que pode significar que os primers 338GC/518R não são tão sensíveis quanto os primeiros. Neste caso, houve amplificação apenas nas reações em que o *template* era de frações com quantidade razoável de DNA (Figura 30).

Houve uma tentativa de obter maior amplificação adicionando como *template* 2 μL do DNA de cada fração. Neste caso, não houve amplificação para nenhuma das frações, possivelmente devido à inibição da reação de amplificação, provocada por resíduos de sais das soluções de fracionamento presentes no *template*.

Alíquotas de 7 μL de dos produtos amplificados com os primers 338F-CG/518R foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% com gradiente desnaturante (DGGE) de 45-65%. A eletroforese foi de 15 horas a 60°C e 100 V. Os géis foram corados com nitrato de prata (Figura 30). O gel com gradiente desnaturante de 30-55% também foi testado, mas apresentou menor resolução de bandas.

Figura 30. DGGE dos *amplicons* do gene rRNA 16S, obtidos à partir do DNA fracionado dos pares de enriquecimento alimentados com $^{13}\text{CH}_4$ e $^{12}\text{CH}_4$, dos tempos de incubação t2 (A) e t5 (B).

Figura 30-A

Figura 30-B

As frações de 7 a 12 são as pesadas, e as frações de 13 a 18 são consideradas leves. A letra “t” indica a raia onde foi aplicado o produto da amplificação do DNA total do sedimento (t0). “c12” e “c13” correspondem aos *amplicons* do DNA não fracionado dos frascos de enriquecimento. As raia nas extremidades de cada gel correspondem à corrida com marcadores de peso molecular.

Fonte: Linhares (2010)

A Figura 30-A mostra que, em relação ao tempo inicial (t0), já é possível notar que houve um enriquecimento razoável de organismos que dependem do metabolismo do

metano, evidenciado pelo aumento da intensidade de algumas bandas de c12 e c13 (DNA não fracionado, dos frascos incubados com $^{12}\text{CH}_4$ e $^{13}\text{CH}_4$, respectivamente). No tempo t2, o padrão de bandas das amostras incubadas com $^{12}\text{CH}_4$ (frações 14-18) são muito semelhantes entre si e ao padrão observado nas frações 11 e 12 (frações pesadas) do frasco alimentado com $^{13}\text{CH}_4$. Isto indica que os organismos presentes nas frações pesadas do frasco alimentado com $^{13}\text{CH}_4$ são aqueles que realmente incorporaram direta ou indiretamente o carbono vindo do metano marcado.

Na Figura 30-B, correspondente ao tempo de incubação t5, observa-se muitas bandas, de elevada intensidade, e com padrão diferente do observado nas frações vindas do enriquecimento do tempo t2. Provavelmente, neste tempo de incubação já ocorreram muitos eventos de *cross-feeding* e, sendo assim, não refletiriam a comunidade metanotrófica.

5.7.2 Bibliotecas do gene rRNA 16S após a aplicação da técnica de DNA-SIP

Considerando os resultados já obtidos até o momento, optou-se por construir três bibliotecas genômicas do gene rRNA 16S. Uma delas foi construída a partir do DNA total extraído do sedimento da região de mangue contaminado, para obter uma visão geral da diversidade encontrada na amostra.

As outras duas bibliotecas foram das frações 12 (pesada) e 15 (leve), recuperadas do tempo de incubação t2, proveniente da incubação com metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$). O objetivo de construir a biblioteca da fração 12 (pesada) foi de realmente acessar a comunidade metabolicamente ativa que oxida metano. A construção da biblioteca da fração 15 (leve) permitiu verificar que realmente as frações pesadas e leves de um mesmo enriquecimento foram bem separadas.

Foram sequenciados 29 clones da biblioteca de DNA total do sedimento (t0), 40 clones da biblioteca do DNA da fração 15 leve (t2-f15), e 50 clones da biblioteca do DNA da fração 12 pesada (t2-f12).

As curvas de rarefação para as bibliotecas citadas encontram-se na figura 31, e demonstram que a cobertura ideal ficou longe de ser alcançada, principalmente para a biblioteca de DNA do sedimento (Figura 31-A), o que já é esperado para bibliotecas de amostras ambientais.

Figura 31. Curvas de rarefação das bibliotecas de clones do gene rRNA 16S, construídas a partir do DNA total extraído do sedimento “impactado” e de DNA recuperado das frações t2-f15 e t2-f12.

As bibliotecas em questão foram construídas a partir do: A) DNA total extraído do sedimento do mangue contaminado t0, B) DNA recuperado na fração leve do tempo de incubação t2 (t2-f15), e C) DNA recuperado na fração pesada do tempo de incubação t2 (t2-f12). As curvas foram calculadas pelo programa Dotur, à partir do alinhamento de fragmentos de cerca de 600 bases.

Fonte: Linhares (2011)

Na comparação entre estas três curvas considerou-se que cada biblioteca tem diferentes quantidades de clones sequenciados. Desta forma foi adicionada em cada gráfico uma linha “x=y”, na tentativa de padronizar a escala. Além disso, foram inseridas barras verticais nas figuras 31-B e 31-C, indicando o número de clones sequenciados das outras bibliotecas.

Apesar de não atingir um platô, a quantidade de clones sequenciados foi adequada para extrair informações importantes sobre a comunidade metanotrófica na amostra estudada, sendo este o objetivo principal. Observou-se inclusive que a biblioteca da fração pesada de DNA apresentou a melhor cobertura ao nível de Filo, indicando que houve uma divisão eficiente entre as frações consideradas.

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa BioEdit, e posteriormente comparadas quanto à similaridade com outras sequências do banco de dados do RDP II e do GenBank. Através desta comparação, observou-se que as três bibliotecas continham clones cujas sequências se agrupavam com outras previamente descritas, provenientes de manguezais, sedimentos marinhos e de áreas contaminadas com xenobióticos.

Utilizando o aplicativo “Classifier” no site do RDP II, as sequências das três bibliotecas foram classificadas em Filos e o resultado está graficamente apresentado na figura 32. Observa-se que as bibliotecas construídas a partir do DNA total do mangue contaminado e da fração leve (t2-f15) apresentam maior porcentagem de sequências para as quais o Filo pôde ser determinado.

Como esperado, depois da incubação com metano houve um enriquecimento de Proteobacteria, mais evidente na biblioteca da fração pesada de DNA (t2-f12). Também como esperado, a diversidade acessada através da biblioteca desta fração foi menor que as das demais bibliotecas, indicando que a técnica atingiu seu objetivo de evidenciar apenas a comunidade ativa utilizando o metano marcado com isótopos estáveis como substrato.

Figura 32. Distribuição dos Filos detectados em sedimentos de manguezal, identificados através de três bibliotecas do gene rRNA 16S.

Bibliotecas construídas a partir do DNA total do sedimento de mangue “impactado”, e do DNA recuperado das frações leve e pesada, obtidas do tempo de incubação t2 com aplicação da técnica de DNA-SIP.

Fonte: Linhares (2011)

Para analisar melhor a distribuição de Proteobacteria nas três bibliotecas, foram realizados os agrupamentos mostrados na figura 33. Mesmo entre Proteobacteria, é interessante notar que apenas na biblioteca de DNA da fração pesada foram detectadas sequências similares a de organismos relacionados ao ciclo do metano (cerca de 70%), representados pelas famílias Methylococcaceae (metanotróficos) e Methylophilaceae (metilotróficos).

Em geral, bactérias metilotróficas não metanotróficas são capazes de utilizar vários substratos de um carbono como fonte de carbono e energia, entre eles metanol, aminas metiladas, espécies metiladas de compostos sulfúricos, entre outros (CRISTOSERDOVA, 2011). Assim, a detecção de bactérias metilotróficas da família Methylophilaceae pode indicar que houve *cross-feeding*, através da utilização de algum intermediário do metabolismo metanotrófico, que eventualmente tenha ficado disponível no meio.

Uma forma de evitar ainda mais evento de *cross-feeding* seria diminuir o intervalo entre a incorporação do carbono pesado (^{13}C) pelos primeiros utilizadores do substrato marcado e a interrupção da incubação do frasco. No caso deste trabalho, apesar de a detecção ter se dado provavelmente no início da incorporação, é possível que a retirada de um par de frascos entre os tempos de incubação t1 e t2 pudesse nos mostrar um resultado diferente, visto que as comunidades microbianas são muito dinâmicas.

A recuperação de sequências de bactérias metilotróficas, em especial do grupo β -Proteobacteria, no DNA das frações pesadas ocorreu em diversos trabalhos pesquisados envolvendo a técnica de Marcação de Ácidos Nucléicos com Isótopos Estáveis (SIP-DNA), e a justificativa mais frequente foi a incorporação do isótopo estável através da oxidação do intermediário metanol, que seria liberado pelas bactérias metanotróficas (CÉBRON et al., 2007a,b; MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005; MORRIS et al., 2002; RADAJEWSKI et al., 2002).

Figura 33. Distribuição dos subgrupos da divisão Proteobacteria, identificados através das bibliotecas de rRNAr 16S.

Bibliotecas construídas a partir do DNA total do sedimento de mangue "impactado", e do DNA recuperado das frações leve e pesada, obtidas do tempo de incubação t2 com aplicação da técnica de DNA-SIP.

Fonte: Linhares (2011)

Em 2009, Kalyuzhnaya et al. realizaram um estudo da microbiota da superfície do Lago Washington, utilizando metanol como substrato marcado para a técnica de DNA-SIP. Como resultado, foi observado que a comunidade dominante que incorporava o carbono marcado pertencia à subdivisão β -Proteobacteria, mais especificamente à família Methylophilaceae. É válido lembrar que algumas bactérias metanotróficas também são capazes de captar e utilizar o metanol para o crescimento, mas apenas em baixas concentrações (BOWMAN, 2006).

Visando esclarecer melhor estas observações, Dumont et al. (2011) realizaram um trabalho no qual foi recuperado RNA marcado, além do DNA, à partir de enriquecimento de sedimento de lago com metano marcado ($^{13}\text{CH}_4$). Houve recuperação de sequências β -Proteobacteria apenas no DNA pesado, mas não no RNA, sugerindo que o *cross-feeding* do carbono marcado tenha sido detectado primeiramente no DNA-SIP.

De forma geral, a ocorrência de grande número de clones que se relacionam à sequências de metanotróficas conhecidas sugere que a maior parte do DNA da fração pesada é oriunda de utilizadores primários do substrato marcado, e que a incorporação de carbono pesado por outros grupos através de *cross-feeding* é limitada (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005). Porém, neste trabalho, a porcentagem de sequências de β -Proteobacteria foi maior do que de famílias conhecidas de metanotróficas.

Embora a hipótese de *cross-feeding* seja muito plausível para explicar a detecção de β -Proteobacteria nas frações pesadas de DNA, existe outra possibilidade que ainda não pode ser descartada, que é a existência de um novo grupo de bactérias metanotróficas (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005), mesmo que sejam metanotróficas facultativas.

Ainda não foi descrito um mecanismo pelo qual estas bactérias poderiam utilizar diretamente o metano como fonte de carbono e energia, mas sabe-se que existe um alto grau de conservação entre os genes pMMO das metanotróficas e os genes que codificam a enzima amônia mono-oxigenase (AMO) das bactérias metilotróficas nitrificantes, sugerindo que estas enzimas sejam evolutivamente relacionadas. Esta particularidade confere à enzima AMO a capacidade de oxidar metano de forma eventual e inespecífica, mas acredita-se que apenas as metanotróficas são capazes extrair energia diretamente desse substrato (MURRELL; RADAJEWSKI, 2000).

Visto que neste trabalho a técnica de DNA-SIP foi seguida por construção de bibliotecas e análise de sequências do gene rRNA 16S, sua aplicação permitiu a identificação não apenas de bactérias metanotróficas clássicas ou proteobactérias, mas também de outros grupos supostamente envolvidos com o ciclo do metano.

Para uma análise mais detalhada dos resultados, foi construída uma árvore filogenética utilizando o programa ARB (WOLFGANG et al., 2004), à partir das sequências editadas das bibliotecas das frações leve e pesada (Figura 34). As sequências da biblioteca do DNA total do sedimento (t0) não foram utilizadas na construção da árvore final, mas possuem similaridade com clones de diversos Filos de forma dispersa (APÊNDICES B e C).

Nota-se que as sequências da biblioteca da fração leve t2-f15 (Figura 34) ficaram alinhadas à diversos grupos e de forma dispersa. Por outro lado, as sequências provenientes da biblioteca da fração pesada de DNA (t2-f12) agruparam-se majoritariamente em clados filogeneticamente próximos.

Em relação às metanotróficas da Divisão Proteobacteria, apenas clones classificados como representantes da família Methylococcaceae foram detectados no DNA da fração pesada, após a aplicação da técnica de SIP (Figura 34). No entanto, a biblioteca do gene *pmoA*, construída a partir do DNA total do sedimento do mangue contaminado, evidenciou a presença de genes pertencentes às duas famílias de Proteobacterias metanotróficas. Esta observação pode indicar que linhagens de bactérias metanotróficas desta família estão mais ativas nas condições testadas, até porque mesmo na biblioteca do gene *pmoA* sua representação foi muito maior.

Entre os clones da fração pesada que ocorrem em baixa frequência podem estar representantes de: i) bactérias que crescem mais lentamente utilizando o substrato adicionado, ii) bactérias que incorporaram carbono pesado através da utilização de substratos marcados secundários (cross-feeding) ou iii) sequências amplificadas de traços de DNA não pesado, que podem ter sido mal separados no fracionamento (MCDONALD; RADAJEWSKI; MURRELL, 2005).

Figura 34. Árvore filogenética baseada no alinhamento de sequências do gene rRNA 16S, obtidas a partir do DNA recuperado com a técnica de DNA-SIP.

0.05

As sequências foram obtidas a partir do DNA recuperado dos enriquecimentos com metano marcado, 1^o tempo de incubação 12, tanto da fração leve (t2-f15) quanto da pesada (t2-f12). As sequências de referência foram adquiridas no GeneBank, cujo código de acesso está entre parênteses. O método utilizado foi o Neighbor-Joining e a barra indica o número de substituições por sítio.

Fonte: Unihares (2011)

Assim como neste trabalho, outros estudos envolvendo a técnica de DNA-SIP detectaram uma série de micro-organismos cujo papel no ciclo do metano é desconhecido, entre eles Actinobacteria, TM7, Bacterioidetes etc. Sequências relacionadas à bactérias predadoras também foram encontradas, como dos gêneros *Bdellovibrio* (MORRIS et al., 2002; HUTCHENS et al., 2004) e *Cytophaga* (MORRIS et al., 2002; RADAJEWSKI et al., 2002).

Entre os outros clados nos quais agruparam-se sequências de clones da biblioteca da fração pesada, destaca-se aquele formado por representantes do candidato a filo TM7. Pouco se sabe sobre este Filo, que teve sua existência descoberta apenas através de sequências do gene rRNA 16S, recuperadas de ambientes muito diversos, tais como solos, reatores de lodo ativado, fontes hidrotermais de mar profundo e cavidade oral humana (FERRARI et al., 2005; LUO et al., 2009; PODAR et al., 2007; WALKER; PARKHILL, 2008; XIE et al., 2011).

TM7 é considerado um “candidato” à Filo, pois ainda não foi possível obter cultivo permanente de nenhum isolado (XIE et al., 2011). Além disso, sua relação filogenética com os outros Filos bacterianos permanece pouco esclarecida, mas possivelmente apresenta maior proximidade com Chloroflexi (PODAR et al., 2007).

Combinando micro-cultivo com hibridização fluorescente *in situ* (Fluorescent *in situ* Hybridization - FISH), Ferrari et al. (2005) conseguiram identificar em solo alguns organismos pertencentes a este Filo, os quais foram caracterizados como bacilos grandes, que podem formar longos filamentos.

Mais tarde, visando obter alguma informação fisiológica sobre o grupo, Podar et al. (2007) combinaram as técnicas de FISH e de separação de células através de citometria de fluxo, seguidas pela amplificação e sequenciamento do DNA genômico da fração de células correspondentes ao Filo TM7. Apesar de não terem obtido uma reconstrução metabólica abrangente, foram encontrados genes para a utilização de glicose, síntese de amino-ácidos e lipídios e metabolismo geral do nitrogênio. Não foram encontradas evidências de que o organismo de TM7 estudado poderia crescer de forma autotrófica, ou que pudesse degradar certos polissacarídeos, mantendo a natureza das suas fontes de carbono ainda incompleta.

Outros trabalhos empregando a técnica de marcação com isótopos estáveis (Stable Isotope Probing – SIP), utilizando tolueno (LUO et al., 2009) e benzeno (XIE et al., 2011),

recuperaram sequências de organismos do Filo TM7. Porém, ainda não há informações que liguem os organismos de TM7 com o metabolismo do metano, direta ou indiretamente.

Um segundo grupo pouco caracterizado que chama a atenção é aquele formado por três sequências da biblioteca da fração pesada (T2-f12-14, 40 e 48), para o qual as únicas referências encontradas são clones obtidos em um trabalho utilizando ácido butírico como substrato na técnica de SIP (KRISTIANSEN et al., 2011). O foco neste estudo era a redução de ácidos carboxílicos, compostos orgânicos sulfurosos e amônia, emitidos de um ambiente de criação de porcos, através da instalação de um biofiltro na saída de exaustão. É provável que o gás emanado também contenha metano, porém nenhuma observação foi feita a este respeito.

Considerando o conjunto de resultados obtidos, na fração de DNA pesado, representando em teoria a comunidade microbiana ativa que metaboliza o metano, foram obtidas sequências de organismos já relacionados ao consumo deste gás, mas também de outros organismos cujo papel no ciclo é incerto.

Em relação a estes, não é possível dizer se estes se configuram como novos grupos envolvidos no metabolismo direto do metano, ou se estão incorporando o carbono pesado indiretamente, através da utilização de intermediários metabólicos liberados por bactérias metanotróficas.

De qualquer forma, mesmo que o consumo do metano não seja direto, a ocorrência de micro-organismos que prontamente consomem os metabólitos da sua oxidação pode ser de grande importância no ambiente. É possível que as bactérias metanotróficas oxidem o metano a uma taxa proporcionalmente maior do que a utilização dos metabólitos resultantes, causando acúmulo no ambiente, não fossem outros membros da comunidade. Sendo assim, é possível que o gás metano, em geral produzido em grande quantidade em manguezais, sustente uma comunidade microbiana mais diversa no ambiente.

Quanto à técnica de DNA-SIP, podemos dizer que o sucesso de sua aplicação no laboratório abre novas perspectivas em relação ao estudo das atividades funcionais de micro-organismos em ambientes naturais.

6 CONCLUSÕES

- A metodologia de cultivo convencional foi adequada para obter e manter consórcios microbianos que apresentam capacidade de crescer utilizando metano como única fonte de carbono. Porém, não foram obtidos isolados de bactérias metanotróficas, demonstrando a importância do investimento no estudo de novos métodos de isolamento e caracterização de novos grupos de metanotróficas.
- O protocolo desenvolvido para a utilização da técnica de DNA-SIP $^{13}\text{CH}_4$ se mostrou eficiente para o estudo de bactérias metanotróficas. Foi verificada a importância da diminuição do tempo de incubação do microcosmo com o substrato marcado, para evitar a possibilidade de *cross-feeding*.
- A técnica de DNA-SIP também possibilitou identificar como comunidade ativa de metanotróficas, tanto aquelas já descritas da família Methylococcaceae, como grupos de micro-organismos cujo papel no ciclo do metano ainda é incerto, como o da família Methylophilaceae e do Filo TM7. Estes resultados sugerem a existência de novos micro-organismos envolvidos em vias metabólicas ainda não conhecidas.
- Apesar da família Methylocystaceae ter sido detectada na biblioteca do gene *pmoA* da amostra de sedimento, o mesmo não foi verificado na biblioteca do gene rRNA 16S da comunidade ativa após o emprego da técnica de DNA SIP $^{13}\text{CH}_4$, indicando que esta família estaria inativa ou pouco representativa nos microcosmos estudados.

REFERÊNCIAS*

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. San Francisco, CA-USA: Academic Press Inc, 1994. 244p.

ALLEN, D. E. et al. Spatial and temporal variation of nitrous oxide and methane flux between subtropical mangrove sediments and the atmosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 622-631, 2007.

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.

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.

ATCC. **ATCC medium: 1306 Nitrate mineral salts medium (NMS)**. <http://www.atcc.org/Attachments/2554.pdf> (acessado em 01 de Dezembro de 2011).

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, p. 10203-10208, 2008.

BALASUBRAMANIAN, R. et al. Oxidation of methane by a biological dicopper centre. **Nature**, v. 465, p. 115-9, 2010.

BECKMANN, M.; LLOYD, D. Mass spectrometric monitoring of gases (CO₂, CH₄, O₂) in a mesotrophic peat core from Kopparas Mire, Sweden. **Global Change Biology**, v. 7, p. 171-180, 2001.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 34-38, 2005.

BISWAS, H. et al. Spatial and temporal patterns of methane dynamics in the tropical mangrove dominated estuary , NE coast of Bay of Bengal , India. **Journal of Marine Systems**, v. 68, p. 55 - 64, 2007.

BODELIER, P. L. E. et al. New DGGE strategies for the analyses of methanotrophic microbial communities using different combinations of existing 16S rRNA-based primers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, p.163–174, 2005.

* De acordo com:

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

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

BOWMAN, J. P.; MCCAMMON, S. A.; SKERRATT, J. H. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group I methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes. **Microbiology**, v. 143, p. 1451-1459, 1997.

BOWMAN, J. The Methanotrophs - The Families Methylococcaceae and Methylocystaceae. In: Dworkin, M. et al (Ed.) **The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria**. 3ª edição. Singapura: Springer Science, 2006. v. 5, p. 266-289.

CANOVA, S. P. Diversidade e Bioprospecção de Actinobactérias Isoladas de Manguezais. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CASE, R. J. et al. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 278-288, 2007

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.

CHAUHAN, R. et al. Assessment of methane and nitrous oxide flux from mangroves along Eastern coast of India. **Geofluids**, v. 8, p. 321-332, 2008.

COIMBRA, M. A. C. **Avaliação de resultados analíticos de hidrocarbonetos como instrumento jurídico em caso de derrames de petróleo: mangue de Bertioga**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D141-D145, 2008.

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

CORREDOR, J. E.; MORELL, J. M.; BAUZA, J. Atmospheric nitrous oxide fluxes from mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p. 473-478, 1999.

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.

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

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

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. Phylogenetic Analysis and *In Situ* Identification of *Bacteria* Community Composition in an Acidic *Sphagnum* Peat Bog. **Applied and environmental microbiology**, vol. 72, p. 2110-2117, 2006.

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.

DIAS, A. C. F. et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1305-1311, 2009.

DIAS, A. C. F. et al. Archaeal communities in the sediments of three contrasting mangroves. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 1466-1476 2011.

DUARTE, R. T. D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares**. 2010. 202f. 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.

DUMONT, M. G. et al. DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. **Environmental microbiology**, v. 13, p. 1153-1167, 2011.

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.

EINOLA, J. **Biotic Oxidation of Methane in Landfills in Boreal Climatic Conditions**. 2010. 113p. Master thesis - University of Jyväskylä, Jyväskylä, 2010.

ELSAIED, H.; HAYASHI, T.; NAGANUMA, T. Molecular Analysis of Deep-Sea Hydrothermal Vent Aerobic Methanotrophs by Targeting Genes of 16S rRNA and Particulate Methane Monooxygenase. **Marine biotechnology**, v. 6, p. 503-509, 2004.

ETTWIG, K. F. et al. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. **Nature**, v. 464, p. 543-548, 2010.

FELSKE, A. et al. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis . Direct Ribosome Isolation from Soil To Extract Bacterial rRNA for Community Analysis. **Microbiology**, v. 62, p. 4162-4167, 1996.

FERRARI, B. C.; BINNERUP, S. J.; GILLINGS, M. Microcolony Cultivation on a Soil Substrate Membrane System Selects for Previously Uncultured Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8714-8720, 2005.

HAKEMIAN, A. S.; ROSENZWEIG, A. C. The biochemistry of methane oxidation. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 76, p. 223-241, 2007.

HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSON, R. S. AND HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Review**, v. 60, p. 439, 1996.

HENCKEL, T., FRIEDRICH, M. AND CONRAD, R. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1980-1990, 1999

HENCKEL, T. et al. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1801-1808, 2000.

HEYER, J.; GALCHENKO, V. F.; DUNFIELD, P. F. Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. **Microbiology**, v. 148, p. 2831-2846, 2002.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.

HOLMES, A. J. et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 132, p. 203-208, 1995.

HOLMES, A. J. et al. Characterization of methanotrophic bacterial populations in soils showing atmospheric methane uptake. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3312–3318, 1999.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2317-2319, 2004.

HUTCHENS, H. et al. Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 111–120, 2004.

IPCC. **Fourth Assessment Report: Climate Change (2007) Pew Center on Global Climate Change**. <http://www.pewclimate.org/global-warming-basics/ipccar4.cfm> (accessed on 25 November 2011).

ISLAM, T. et al. Methane oxidation at 55 °C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 300-304, 2008.

JUGNIA, L. B. et al. Diversity and Dynamics of Methanotrophs within an Experimental Landfill Cover Soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, p. 1479-1487, 2009.

KALLISTOVA, A. et al. Methane Oxidation in Landfill Cover Soil. **Microbiology**, v. 74, p. 608-614, 2005.

KALYUZHNYA, M. G. et al. *Methylosarcina lacus* sp. nov., a methanotroph from Lake Washington, Seattle, USA, and emended description of the genus *Methylosarcina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2345-2350, 2005.

KALYUZHNYA, M. G. et al. Methylophilaceae link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, p. 385-392, 2009.

KNIEF, C.; DUNFIELD, P. F. Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 1307-1317, 2005.

KNITTEL, K.; BOETIUS, A. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. **Annu Rev Microbiol**, v. 63, p. 311–334, 2009.

KRISTENSEN, E. et al. Emission of CO₂ and CH₄ to the atmosphere by sediments and open waters in two Tanzanian mangrove forests. **Marine Ecology Progress Series**, v. 370, p. 53-67, 2008.

KRISTIANSEN A. et al. Butyric acid and dimethyl disulfide assimilating microorganisms in a biofilter treating air emissions from a livestock facility. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, p. 8595-8604, 2011.

LAANBROECK, H. J. Methane emission from natural wetlands: interplay between emergent macrophytes and soil microbial processes. **Annals of Botany**, v. 105, p. 141-153, 2010.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACHEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: Wiley. 1991. p. 115– 175.

LELIEVELD, J.; CRUTZEN, P. J.; DENTENER, F. J. Changing concentrations, lifetime and climate forcing of atmospheric methane. **Tellus**, v. 50B, p. 128–150, 1998.

LIEBERMAN, R. L.; ROSENZWEIG, A. C. Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. **Nature**, v. 434, p. 177-82, 2005.

LIN, J. et al. Analysis of Methane Monooxygenase Genes in Mono Lake Suggests That Increased Methane Oxidation Activity May Correlate with a Change in Methanotroph Community Structure. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, p. 6458-6462, 2005.

LIOTTI, R. G. **Ocorrência de bactérias metanotróficas em amostras de aterro sanitário através da determinação do pontencial de oxidação do metano e da caracterização de cultura enriquecidas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LUESKEN, F. et al. Diversity and enrichment of nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria from wastewater sludge. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, p. 845-854, 2011.

LUGO, A. E.; SNEDAKER, S. C. The ecology of mangroves. **Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, p.39-64, 1974.

LÜKE, C. et al. Biogeography of wetland rice methanotrophs. **Environmental microbiology**, v. 12, p. 862-872, 2010.

LUO, C. et al. Identification of a novel toluene-degrading bacterium from the candidate phylum TM7, as determined by DNA stable isotope probing. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, p. 4644-4647, 2009.

MAECK, M. et al. Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and novel Asian mutations in the *CFTR* gene. **Human Mutation**, v. 9, p. 136-147, 1997.

MALDANER, L. S. **Cobertura para oxidação biológica do metano em aterros de resíduos sólidos urbanos**. 2011. 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MARANI, L. A.; ALVALA, P. C. Methane emissions from lakes and floodplains in Pantanal, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 41, p. 1627-1633, 2007.

MCDONALD, I. R.; RADAJEWSKI, S.; MURRELL, J. C. Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs : A review. **Organic Geochemistry**, v. 36, p. 779-787, 2005.

MOHANTY, S. R. et al. Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1346-1354, 2006.

MORRIS, S. A. et al. Identification of the Functionally Active Methanotroph Population in a Peat Soil Microcosm by Stable-Isotope Probing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1446-1453, 2002.

MURRELL, J.C.; RADAJEWSKI, S. Cultivation-independent technique for studying methanotroph ecology. **Microbiological Research**, v. 151, p. 807-814, 2000.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, p. 127-141, 1999.

NAKAYAMA, C. R. et al. Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Admiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 58, p. 128-138, 2011.

NEWBY, D. T. et al. Diversity of methanotroph communities in a basalt aquifer. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, p. 333-344, 2004.

PELLIZARI, V. H. et al. Metano: Mudanças Climáticas Globais e a Microbiologia. **Microbiologia in foco**, v. 1, p. 4-9, 2007.

PETERSEN, S. O. et al. Methane oxidation in slurry storage surface crusts. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p. 455-461, 2005.

PODAR, M. et al. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, p. 3205-14, 2007.

POL, A. et al. Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species. **Nature**, v. 450, p. 874-879, 2007.

PURJAVA, R.; RAMESH, R. Natural and Anthropogenic Methane Emission from Coastal Wetlands of South India. **Environmental Management**, v. 27, p. 547–557, 2001.

RADAJEWSKI, S. et al. Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. **Microbiology**, v. 148, p. 2331-2342, 2002

RAGHOEBARSING, A. A. et al. Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. **Nature**, v. 436, p. 1153-1156, 2005.

RAGHOEBARSING, A. A. et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. **Nature**, v. 440, p. 918– 921, 2006.

RAHALKAR, M. et al. *Methylosoma difficile* gen . nov ., sp . nov ., a novel methanotroph enriched by gradient cultivation from littoral sediment of Lake Constance Printed in Great Britain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1073-1080, 2007.

RASTOGI, G. et al. Novel methanotroph diversity evidenced by molecular characterization of particulate methane monooxygenase A (pmoA) genes in a biogas reactor. **Microbiol Research**, v. 164, p. 536-544, 2009.

SAIA, F. T. et al. **Desenvolvimento das técnicas de DNA-Stable Isotope Probing (SIP) para identificar dinâmicas e populações microbianas e seus genes funcionais responsáveis pela degradação de compostos orgânicos em amostras ambientais.** São Paulo: Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2010. 62p. Disponível em: <http://www.prosabmicrobiologia.org.br/rede/manuais>. Acesso em 10 de Setembro de 2010.

SCHEUTZ, C. et al. Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions. **Waste Management & Research**, v. 27, p. 409-455, 2009.

SCHLOSS, P. D.; Larget, B. R.; Handelsman, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5485-5492, 2005.

SEMRAU, J. D.; DISPIRITO, A.; YOON, S. Methanotrophs and copper. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, p. 496-531, 2010.

SHIVELY, J. M. et al. Carbon cycling: the prokaryotic contribution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 301-306, 2001.

SPALDING, M.; KAINUMA, M.; COLLINS, L. **World Atlas of Mangroves.** 2° edição. Washington: Earthscan, 2010. 336p.

STOECKER, K. et al. Cohn ' s *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 2363-2367, 2006.

TAKETANI, R. G. et al. Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 97, p. 401-411, 2010.

TAMURA, K. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TSUBOTA, B. T. *Methylothermus thermalis* gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic obligate methanotroph from a hot spring in Japan Printed in Great Britain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1877-1884, 2005.

VALENTINE, D. L. et al. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 316-323, 2007.

WALKER, A.; PARKHILL, J. Single-cell genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 176-177, 2008.

WARD, D.; WELLER, R.; BATESON, M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, v. 345, p. 63-65, 1990.

WARTIAINEN, I. et al. *Methylocystis rosea* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from Arctic wetland soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 541-547, 2006.

WISE, M. G.; MCARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L. J. Methanotroph diversity in landfill soil: Isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S ribosomal DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4887-4897, 1999.

WOLFGANG, L. et al. ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1363-1371, 2004.

WU, M. L. et al. Physiological role of the respiratory quinol oxidase in the anaerobic nitrite-reducing methanotroph '*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*'. **Microbiology**, v. 157, p. 890-898, 2011.

XIE, S. et al. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. **Biodegradation**, v. 22, p. 71-81, 2011.

ZEISS, C. A. et al. Accelerated methane oxidation cover system to reduce greenhouse gas emissions from MSW landfills in cold, semi-arid regions. **Water, Air and Soil Pollution**, vol. 176, p. 285-306, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A – Preparo do meio de cultura NMS

O preparo no meio NMS requer a mistura de várias soluções que devem ser esterilizadas separadamente, pois precipitam quando são misturadas antes da esterilização em autoclave. A seguir está a maneira de juntá-las e a composição de cada uma destas soluções.

Tabela A.1- Composição e modo de preparo do meio de cultura NMS (~1,2%NaCl).

Meio NMS (~1,2%NaCl)	
<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
Solução B	150mL
Solução C	100mL
Solução de CaCl ₂	20mL
Solução de Fe	2mL
Solução Traço de metais	0,5mL
Água Milli-Q	478mL
Água do Mar estéril	249mL
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Esterilizar em autoclave 478mL de água Milli-Q, em frasco de reagente com capacidade para 1L. - Trabalhar em capela de fluxo laminar e de acordo com as boas práticas de laboratório para garantir a assepsia. - Adicionar 249mL de água do mar estéril (autoclave) no frasco com a água Milli-Q. - Adicionar as demais soluções, já estéreis, misturando com movimentos suaves a cada adição. 	
<p>Nota: Caso seja necessária a utilização de provetas volumétricas, utilizar uma para cada solução, B e C.</p>	
<p>Fonte: Adaptado de ATCC (2011)</p>	

Tabela A.2- Composição e preparo da Solução B.

Solução B	
<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,537g
KH_2PO_4	0,272 g
Água Milli-Q	150 mL
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Em um frasco com tampa, misturar os reagentes em água. - Esterilizar em autoclave. - Armazenar em temperatura ambiente. 	
Fonte: Adaptado de ATCC (2011)	

Tabela A.3- Composição e preparo da Solução C.

Solução C	
<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1g
KNO_3	1g
Água Milli-Q	100 mL
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Em um frasco com tampa, misturar os reagentes em água. - Esterilizar em autoclave. - Armazenar em temperatura ambiente. 	
Fonte: Adaptado de ATCC (2011)	

Tabela A.4- Composição e preparo da Solução de Cloreto de Cálcio.

Solução de Cloreto de Cálcio	
<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
CaCl_2	1g
Água Milli-Q	100 mL
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Em um frasco com tampa, misturar os reagentes em água. - Esterilizar em autoclave. - Armazenar em temperatura ambiente. 	
Fonte: Adaptado de ATCC (2011)	

Tabela A.5- Composição e preparo da solução de ferro quelado.

Solução de Ferro quelado	
<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
EDTA	0,2 g
Cloreto de Ferro III	0,5 g
HCl concentrado	0,3 mL
Água Milli-Q q.s.p.	100,0 mL
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Misturar os reagentes em água Milli-Q. - Esterilizar a solução por filtração através de sistema Millipore com membrana de 22µm, e acondicionar preferencialmente em frasco tipo de antibiótico. - Envolver os frascos em papel alumínio e armazená-los à temperatura ambiente. 	
Fonte: Adaptado de ATCC (2011)	

Tabela A.6- Composição e preparo da solução traço de metais

Solução traço de metais	
<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>
FeSO ₄ .7H ₂ O	20,0 mg
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,0 mg
MnCl ₂ . 7 H ₂ O	0,3 mg
H ₃ BO ₃ . 4 H ₂ O	3,0 mg
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	2,0 mg
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,1 mg
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	0,2 mg
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,3 mg
Água Milli-Q	100mL
<i>Modo de Preparo</i>	
<ul style="list-style-type: none"> - Em um frasco com tampa, misturar os reagentes em água Milli-Q. - Esterilizar a solução em autoclave, e acondicionar preferencialmente em frascos tipo de antibiótico. - Envolver os frascos em papel alumínio e armazená-los à temperatura ambiente. 	
Fonte: Adaptado de ATCC (2011)	

APÊNDICE B - Resultados das comparações entre as sequências parciais do gene rRNA 16S, utilizando o aplicativo *Classifier*.

(continua)

Clone	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
DCL-50	Chloroflexi	86	Dehalococcoidetes	86	-		-		<i>Dehalogenimonas</i>	86
DCL-52	Proteobacteria	100	Deltaproteobacteria	100	Desulfobacterales	100	Desulfobacteraceae	100	<i>Desulfosarcina</i>	66
DCL-53	Proteobacteria	52	Deltaproteobacteria	39	Myxococcales	36	Polyangiaceae	31	<i>Byssovorax</i>	27
DCL-54	Acidobacteria	100	Acidobacteria_Gp16	100	-	-	-	-	<i>GP16</i>	100
DCL-56	Proteobacteria	100	Betaproteobacteria	100	Burkholderiales	96	Alcaligenaceae	40	<i>Derxia</i>	39
DCL-57	Chloroflexi	97	Anaerolineae	96	Anaerolineales	96	Anaerolineaceae	96	<i>Bellilinea</i>	79
DCL-58	Proteobacteria	100	Alphaproteobacteria	100	Sphingomonadales	100	Erythrobacteraceae	93	<i>Erythrobacter</i>	39
DCL-59	Bacteroidetes	100	Bacteroidia	71	Bacteroidales	71	Porphyromonadaceae	51	<i>Paludibacter</i>	36
DCL-60	Chloroflexi	100	Anaerolineae	100	Anaerolineales	100	Anaerolineaceae	100	<i>Bellilinea</i>	71
DCL-61	Actinobacteria	32	Actinobacteridae	25	Actinomycetales	23	Kineosporiaceae	11	<i>Quadrisphaera</i>	11
DCL-62	Chloroflexi	100	Anaerolineae	100	Anaerolineales	100	Anaerolineaceae	100	<i>Levilinea</i>	33
DCL-63	Actinobacteria	91	Actinobacteridae	90	Actinomycetales	90	Nocardiodaceae	88	<i>Pimelobacter</i>	87
DCL-66	Proteobacteria	100	Betaproteobacteria	100	Burkholderiales	100	Burkholderiales_ incertae_sedis	80	<i>Methylibium</i>	71
DCL-69	Proteobacteria	100	Betaproteobacteria	60	Rhodocyclales	60	Rhodocyclaceae	60	<i>Azovibrio</i>	55
DCL-70	Proteobacteria	100	Alphaproteobacteria	100	Sphingomonadales	100	Sphingomonadaceae	100	<i>Novosphingobium</i>	89
DCL-71	Chloroflexi	86	Anaerolineae	86	Anaerolineales	86	Anaerolineaceae	86	<i>Leptolinea</i>	40
DCL-72	Firmicutes	100	Erysipelotrichi	99	Erysipelotrichales	99	Erysipelotrichaceae	99	<i>Coprobaillus</i>	96

(continuação)

Clone	Filo	%	Classe	%	Ordem	%	Família	%	Gênero	%
DCL-73	Chlorobi	38	Chlorobia	38	Chlorobiales	38	Chlorobiaceae	38	<i>Chloroherpeton</i>	22
DCL-79	Chloroflexi	100	Anaerolineae	100	Anaerolineales	100	Anaerolineaceae	100	<i>Longilinea</i>	25
DCL-80	Chloroflexi	98	Dehalococcoidetes	98	-	-	-	-	<i>Dehalogenimonas</i>	98
DCL-81	Verrucomicrobia	99	Subdivision3	99	-	-	-	-	<i>Subdivision3_genera_incertae_sedis</i>	99
DCL-82	Proteobacteria	100	Alphaproteobacteria	85	Rhizobiales	85	Phyllobacteriaceae	80	<i>Hoeflea</i>	70
DCL-83	Proteobacteria	100	Betaproteobacteria	100	Hydrogenophilales	100	Hydrogenophilaceae	100	<i>Thiobacillus;</i>	100
DCL-84	Deferribacteres	100	Deferribacteres	100	Deferribacterales	100	Deferribacterales_incertae_sedis	100	<i>Caldithrix</i>	100
DCL-85	Proteobacteria	100	Deltaproteobacteria	100	Syntrophobacterales	100	Syntrophaceae	100	<i>Desulfobacca</i>	100
DCL-86	Proteobacteria	46	Deltaproteobacteria	33	Desulfuromonadales	8	Geobacteraceae	8	<i>Geothermobacter</i>	6
DCL-87	Bacteroidetes	100	Sphingobacteria	94	Sphingobacteriales	94	Saprospiraceae	87	<i>Haliscomenobacter</i>	87
DCL-88	Bacteroidetes	100	Bacteroidia	100	Bacteroidales	60	Marinilabiaceae	55	<i>Alkaliflexus</i>	43
DCL-89	Chloroflexi	100	Anaerolineae	100	Anaerolineales	100	Anaerolineaceae	100	<i>Bellilinea</i>	45

As sequências em questão foram obtidas em amostras de sedimento “impactado” do manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil), e a comparação foi realizada com sequências depositadas no banco de dados do RDP II, utilizando o aplicativo *Classifier*.

Fonte: Linhares (2011)

APÊNDICE C - Resultados das comparações entre as sequências parciais do gene rRNA 16S, utilizando o aplicativo *BLAST*.

(continua)

Clone	Cobertura %	ID%	Organismo	Trabalho	Nº acesso
DCL-50	99	96	Uncultured bacterium	Biogeographical distribution and diversity of microbes in methanehydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin - Inagaki et al., 2006.	AB177255
DCL-50	96	96	Uncultured Chloroflexi bacterium	Subseafloor microbial communities associated with rapid turbidite deposition in the Gulf of Mexico continental slope - Nunoura et al., 2009.	AB433050
DCL- 52	100	92	<i>Desulfosarcina</i> sp. SD1	Anaerobic oxidation of dimethylsulfide and methanethiol in mangrovesediments is dominated by novel sulfate reducing bacteria - Lyimo et al., 2008; não publicado.	FJ416305
DCL- 52	100	92	Uncultured deltaproteobacteria	Structure of bacterial communities along a hydrocarboncontamination gradient in a coastal sediment - Paisse et al., 2008.	AM882620
DCL-53	100	95	Uncultured Nitrospirae bacterium	Taxonomic and Functional Metagenomic Profiling of the Microbial Community in the Anoxic Sediment of a Sub-saline Shallow Lake - Ferrer et al., 2011.	HQ003656
DCL-54	99	97	Uncultured bacterium	Elevated atmospheric CO2 affects soil microbial diversity associated with trembling aspen - Lesaulnier et al., 2008.	EF018635
DCL-56	99	95	Uncultured bacterium	The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu - Ye et al., 2009.	FJ755776

(continuação)

Clone	Cobertura %	ID%	Organismo	Trabalho	Nº acesso
DCL-56	99	95	Uncultured bacterium	Biodegradation of methyl tert-butyl ether by enriched bacterial - Liu et al., 2009.	FJ713035
DCL-57	100	90	Uncultured Chloroflexi	16S rRNA analysis of mangrove soil (China) - Yan, 2006; não publicado	DQ811859
DCL-58	100	98	Uncultured alpha proteobacterium	16S rRNA analysis of mangrove soil (China) - Yan, 2006; não publicado	DQ811848
DCL-58	100	96	<i>Lutibacterium</i> sp. JL1057	Diversity of culturable heterotrophic bacteria in marine environments (China) - Wang; Jiao et al., 2006; não publicado	DQ985051
DCL-58	97	97	<i>Altererythrobacter aestuarii</i> strain KYW147	<i>Altererythrobacter namhicola</i> sp. nov. and <i>Altererythrobacter aestuarii</i> sp. nov., isolated from seawater - Park et al., 2011.	FJ997597
DCL-59	99	99	Uncultured Bacteroidetes bacterium	Diversity of Bacteroidetes in high altitude saline evaporitic basins in northern Chile - Dorador et al., 2008; não publicado.	FJ213814
DCL-59	99	98	Uncultured Cytophagales bacterium	The bacterial diversity from the semiarid 'Tablas de Daimiel National Park' wetland (Central Spain) unravelled - D'Auria et al., 2008; não publicado.	FJ517037
DCL-60	100	95	Uncultured bacterium	Bacterial community structure in the intertidal flat of Ganghwa island by 16S rRNA gene analysis - Cho et al., 2004; não publicado.	AY568768
DCL-61	100	96	Uncultured bacterium	Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, Southern China - Jiang et al., 2009.	FJ748806

(continuação)

Clone	Cobertura %	ID%	Organismo	Trabalho	Nº acesso
DCL-61	100	92	Uncultured bacterium	16S rRNA analysis of mangrove soil (China) - Yan, 2006; não publicado	EF125397
DCL-62	100	97	Uncultured bacterium	Bioremediation of Petroleum-Contaminated Saline-Alkali Soils Using Maize Straw and the Effect on Microbial Community Structure - Wang et al., 2010; não publicado.	HQ697693
DCL-62	99	96	Uncultured bacterium	Changes in a PCB Dechlorinating Bacterial Community in Ohio River Sediment Under Different Environmental Conditions - D'Angelo et al., 2010; não publicado	GU326057
DCL-63	87	89	Uncultured bacterium	Effect of benzene-like compounds on the structure of microbial community in Songhuajiang River sediments - Zhao et al., 2006; não publicado.	DQ444117
DCL-63	100	84	<i>Nocardioides</i> sp. AN3	Characterisation of new strains of atrazine-degrading <i>Nocardioides</i> sp. isolated from Japanese riverbed sediment using naturally derived river ecosystem - Satsuma, 2006.	AB183711
DCL-66	99	98	Uncultured beta proteobacterium	Rock biofilm from a gold mine with unusually high microbial diversity (Poland) - Tomczyk-Zak, 2008; não publicado.	FM253653
DCL-69	100	88	Uncultured bacterium	Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy - Macalady et al., 2006.	DQ415752
DCL-70	100	98	uncultured <i>Novosphingobium</i>	Microbiomic comparison of the intestine of the earthworm <i>Eisenia fetida</i> fed ergovaline - Rattray et al., 2010.	FJ542890

(continuação)

Clone	Cobertura %	ID%	Organismo	Trabalho	Nº acesso
DCL-70	100	97	<i>Sphingomonas sp</i> mtr-71	Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings - Grandlic et al., 2008)	DQ898300
DCL-71	100	88	Uncultured Chloroflexi	Ronneburg, former uranium-mining site	GU236046
DCL-72	100	98	Uncultured bacterium	Diversity of Microbial Community Responsible for Intermediates Degradation in Anaerobic Digestion System as Determined by 16S rDNA Sequence Analysis - Meepayung et al., 2009.	FJ799152
DCL-73	100	99	Uncultured bacterium	Using sludge fermentation liquid to improve wastewater short-cut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal via nitrite - Ji; Chen, et al., 2010.	HQ010810
DCL-79	100	96	Uncultured bacterium	Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin - Zhang et al., 2010; não publicado.	GU982768
DCL-80	100	89	Uncultured bacterium	Diversity and Distribution of Bacteria in Marine Sediment from the Westerns Pacific Ocean - Zhang et al., 2010; não publicado.	GU982899
DCL-81	99	86	Uncultured Verrucomicrobia bacterium	<i>Alnus trabeculosa</i> alters rhizosphere bacterial community of <i>Phragmites australis</i> in Chongxi tidal wetland, the Yangtze Estuary - Zhang et al., 2011; não publicado.	JN038865
DCL-82	100	94	Uncultured bacterium	Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem (Germany) - Stevens et al., 2005)	AY515417

(continuação)

Clone	Cobertura %	ID%	Organismo	Trabalho	Nº acesso
DCL-83	100	94	Iron-reducing bacterium enrichment culture clone FEA_2_D6	Degradation of 1,2-dichloroethane by microbial communities from river sediment at various redox conditions - Van der Zaan et al., 2009)	FJ802326
DCL-84	100	97	Uncultured bacterium	Identification of acetate-utilizing Bacteria and Archaea in methanogenic profundal sediments of Lake Kinneret (Israel) by stable isotope probing of rRNA - Schwarz et al., 2007.	AM181864
DCL-85	100	97	Uncultured bacterium	Applying stable isotope probing of phospholipid fatty acids and rRNA in a Chinese rice field to study activity and composition of the methanotrophic bacterial communities in situ - Qiu et al., 2008.	FJ437876
DCL-86	100	89	Uncultured bacterium	Bacterial diversity associated with the tube of a cold seep vestimentiferan - Duperron et al., 2008.	FM165273
DCL-87	100	94	Uncultured bacterium	Vertical distribution of prokaryotes and responses to their environment in Honghu Lake sediments - Zheng; Fang, 2010; não publicado.	HM243786
DCL-88	100	94	Uncultured bacterium	Phylogenetic Characterization of Polychlorinated Biphenyl Dechlorinating Consortia Under Different Anaerobic Treatments of Ohio River Sediments - D'Angelo et al., 2007.	EF392999
DCL-89	100	97	Uncultured bacterium	DNA-SIP identifies sulfate-reducing Clostridia as important toluene degraders in tar-oil-contaminated aquifer sediment - Winderl et al., 2010.	GU133267
DCL-89	100	98	Uncultured bacterium SHD-245	Microbial structure of an anaerobic bioreactor population that continuously dechlorinates 1,2-dichloropropane - Shlotelburg et al., 2002.	AJ278174

As sequências em questão foram obtidas em amostras de sedimento “impactado” do manguezal de Bertioga (São Paulo, Brasil), e a comparação foi realizada com sequências depositadas no banco de dados do RDPII, utilizando o aplicativo *Classifier*.

Fonte: Linhares (2011)