ANA CAROLINA DE ARAÚJO BUTARELLI

PERFIL TAXONÔMICO E FUNCIONAL DE MICRORGANISMOS METANOTRÓFICOS EM REGIÕES DE EXSUDAÇÃO DE METANO DO ATLÂNTICO SUDOESTE.

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
2022

ANA CAROLINA DE ARAÚJO BUTARELLI

PERFIL TAXONÔMICO E FUNCIONAL DE MICRORGANISMOS METANOTRÓFICOS EM REGIÕES DE EXSUDAÇÃO DE METANO DO ATLÂNTICO SUDOESTE.

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: Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Orientador: Prof(a). Dr(a). Vivian Helena Pellizari

Versão original

São Paulo
2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Butarelli, Ana Carolina de Araújo
Perfil taxonômico e funcional de microrganismos metanotróficos em regiões de exsudação de metano do atlântico sudoeste. / Ana Carolina de Araújo Butarelli; orientadora Vivian Helena Pellizari. -- São Paulo, 2022.
102 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Oxidação de Metano. 2. Methylomicrobium sp. . 3. Recuperação de MAGs. 4. Gás do efeito estufa. 5. Bacia de Santos. I. Pellizari, Vivian Helena, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Carolina de Araújo Butarelli

Título da Dissertação: Perfil taxonômico e funcional de microrganismos metanotróficos em regiões de exsudação de metano do Atlântico Sudoeste.

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Vivian Helena Pellizari

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

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1047/2019** referente ao projeto intitulado: **"Perfil taxonômico e funcional de microorganismos metanotróficos em regiões de exsudação de metano do atlântico sudoeste"** sob a responsabilidade de ***Ana Carolina de Araújo Butarelli*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Vivian Helena Pellizari,*** do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 03 de setembro de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP

Aos meus pais e à
minha irmã dedico.

AGRADECIMENTOS

A construção deste trabalho só foi possível graças à ajuda, colaboração e dedicação de todas as pessoas que fazem parte da minha e que, de alguma forma, dedicaram uma parte de si para que hoje eu pudesse alcançar mais um de meus sonhos. Gostaria de expressar meus sinceros agredecimentos à cada um que tornou este momento possível. Sou grata por cada pessoa que entrou na minha vida, por cada aprendizado, por cada colaboração acadêmica e por ter aprendido com tantas pessoas incríveis.

Agradeço, primeiramente à Deus e a minha família, em especial meus pais Ana Cristina Araújo e Edson Butarelli. Vocês são meu motivo para não desistir, meus maiores incentivadores e as pessoas que me ensinaram a dar sempre o melhor de mim. Agradeço por serem pais presentes, por me apoiarem e por terem tornado este momento possível apesar de todas as dificuldades que passamos, amo vocês.

À Ana Luiza, minha irmã, que é a minha alma gêmea. Te agradeço pelo apoio, por acreditar sempre em mim, por estar presente (memso que à distância) sendo a minha força em dias de dificuldade e por tornar este momento possível também. Te amo com tudo que eu tenho, obrigada por ser você e por dividir essa jornada comigo.

À minha orientadora, Drª Vivian Pellizari por ter aceitado a recém bióloga, vinda do Maranhão e me dado este voto de confiança. Serei sempre grata por todas as oportunidades que você me permitiu viver ao longo desses anos. Agradeço por poder aprender com a profssional e pessoa que você é. Obrigada pela amizade, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo incentivo.

À Shell Brasil, pela concessão da bolsa que me permitiu a estadia no estado de São Paulo e realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade e pela formação.

À Fernanda Nakamura, por ter sido minha maior incentivadora e a pessoa que me ensinou tudo sobre o cultivo e enriquecimento de batérias metanotróficas. Muito orbigada, Fê, pela amizade, pelos ensinanmentos e por ter sido tão paciente comigo nesses dois anos. Não tenho palavras pra agradecer tudo que você fez por mim.

À Rosa Gamba, por todos os ensinamentos, por ter me salvado várias vezes durante a realização dos experimentos deste trabalho e por ser esta companheira de trabalho incrível que alegra a vida de todos nós. Obrigada, Rosinha, pelo excelente trabalho que realiza e por ser um exemplo para todos nós.

Aos meus amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Amanda, Alice, Augusto, Cristina, Diana, Fabi, Fer, Fran, Juliana, Júlio, Lucas, Maria Carol, Nailah, Natascha, Rebeca, Renato e Will. Obrigada a todos por todos os momentos que compartilhamos, sejam eles de sofrência acadêmica ou de roles divertidíssimos. Sou grata pela amizade e pela ajuda de todos vocês ao longo destes anos.

Ao meu amigo Lucas Salomão que é, oficialmente, meu parceirinho acadêmico. Obrigada por dividir comigo esta caminhada, por estarmos crescendo juntos ao longo destes cinco anos e obrigada por estar presente apesar de todas as dificuldades. Estamos apenas começando nossa jornada de dominação do mundo.

À Alice, Juliana e Diana que foram grandes amigas durante esses anos e tornaram a pós graduação mais leve. Obrigada pela amizade, pela ajuda, por todas as risadas e pela amizade de vocês. Jamais esquecerei tudo que fizeram por mim, admiro demais vocês três.

À Maria Carolina que se tornou uma grande amiga ao longo destes anos e que esteve comigo nos momentos mais difíceis que enfrentei. Obrigada por ser esta pessoa que acolhe e que torna a vida das pessoas melhor.

À Rebeca que também se tornou uma grande amiga e foi a responsável pela doação do meu filho felino. Obrigada pelo apoio, pela amizade e por ter colocado o Tako na minha vida, jamais esquecerei o que você fez por mim.

Agradeço à comunidade maranhense em São Paulo, composta pelos meus amigos Robson, Marina, Ítalo, Lucas, Luiz, Bruno e Danilo. Vocês fazem a saudade de casa ser menor e são as melhores companhias de rolês. Obrigada pela amizade e por todo o apoio.

Agradeço também aos meus amigos da vida, Karina, Léo Nava, Thauana, Gal, Marlla, Catherine, Lucas Mateus, Raquel Riyuzo e Celso. Obrigada por cada palavra de apoio, por fazerem parte da minha vida, por estarem presentes e por me apoiarem, acima de tudo. Sem o apoio e ajuda de vocês, este trabalho não seria possível.

À minha avó, Nair Viana de Araújo (*in memoriam*). Obrigada, vó, por ter sido uma grande incentivadora, por estar presente e por ser uma pessoa incrível. Te perder foi uma das coisas mais difíceis que vivi, mas guardarei um pedacinho de você em mim pra sempre, este trabalho também é seu.

RESUMO

BUTARELLI, A.C.A. **Perfil taxonômico e funcional de microrganismos metanotróficos em regiões de exsudação de metano do Atlântico Sudoeste.** 2022. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O metano é um dos principais gases produzidos em sedimentos marinhos, podendo ter origem biótica ou abiótica. Esse importante gás do efeito estufa, quando liberado na coluna d'água, é mitigado graças à atividade de microrganismos metanotróficos, ou seja, microrganismos capazes de usar metano como única fonte de carbono e energia. Este trabalho foi realizado na região Bacia de Santos, que é uma bacia sedimentar localizada na região do talude do Atlântico Sudeste, representando a maior região produtora de petróleo e gás natural do país. O objetivo foi explorar a diversidade microbiana metanotrófica em amostras de sedimentos oriundos de regiões com potencial para serem áreas de exsudação ativa de metano, uma vez que apresentam as feições geológicas de montes carbonáticos e pockmarcks, através de técnicas dependentes e independentes de cultivo. As amostras foram coletadas em 10 pontos, e inoculadas em meio de cultura NMS + 3,5% NaCl e metano:ar (1:1) nas culturas aeróbias e metano:argônio (1:1) nas culturas anaeróbias, à 20 ºC, durante 8 meses. O DNA das culturas foi extraído e o gene 16S rRNA sequenciado pela plataforma Illumina Miseq. A cromatografia gasosa foi realizada para identificar se houve oxidação de metano. As análises de diversidade alfa e beta revelaram que não há diferença na riqueza das espécies, mas sim na estrutura das comunidades, de acordo com os tratamentos utilizados. O Filo Proteobacteria foi dominante na análise taxonômica dos consórcios, com destaque para a classe Gammaproteobacteria. Foram identificados 3 genêros de bactérias metanotróficas em quatro consórcios microbianos que tiveram consumo de metano confirmado por cromatografia gasosa, sendo eles *Methylomicrobium, Methylomonas e Methylovulum*. Essas amostras foram então enviadas para sequenciamento metagenômico para a recuperação de MAGs associadas à microrgansimos metanotróficos. Das 90 MAGs recuperadas, 2 foram anotadas taxonomicamente como pertencentes ao gênero *Methylomicrobium* sp. e que possivelmente são espécies novas, denominadas LECOM 001 e 002. Ambas as MAGs possuem genes associados ao ciclo do nitrogênio, ciclo do enxofre e somente em LECOM 002 o operon *pmo*ABC foi recuperado, indicando que ela pode sim oxidar metano. Esses MAGs ainda revelaram uma possível associação desses organismos à fixação de nitrogênio em regiões montes carbonáticos de mar profundo e são os primeiros registros de genomas deste gênero recuperados na Bacia de Santos. Estes resultados representam também novas evidências da presença de exsudação fria na região dos montes carbonáticos Alpha Crucis, motivando a continuidade da pesquisa de metanotróficos na região.

Palavras chave: Metanotrofia. *Methylomicrobium* sp.. Recuperação de MAGs. Gás do efeito estufa. Bacia de Santos.

ABSTRACT

BUTARELLI, A.C.A. **Taxonomic and functional profile of methanotrophic microorganisms in methane exudation regions of the Southwest Atlantic.** 2022. 102 p. Dissertation (Master in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Methane is one of the main gases produced in marine sediments, and may have a biotic or abiotic origin. This important greenhouse gas, when released into the water column, is mitigated thanks to the activity of methanotrophic microorganisms, that is, microorganisms capable of using methane as the only source of carbon and energy. This work was carried out in the Santos Basin region, which is a sedimentary basin located in the Southeast Atlantic slope region, representing the largest oil and natural gas producing region in the country. The objective was to explore the methanotrophic microbial diversity in sediment samples from regions with potential to be areas of active methane exudation, since they present the geological features of carbonate mounds and pockmarcks, through dependent and independent cultivation techniques. The samples were collected at 10 points, and inoculated in culture medium NMS + 3.5% NaCl and methane:air (1:1) in the aerobic cultures and methane:argon (1:1) in the anaerobic cultures, at 20 ºC, for 8 months. DNA from cultures was extracted and the 16S rRNA gene sequenced using the Illumina Miseq platform. Gas chromatography was performed to identify whether there was methane oxidation. The analysis of alpha and beta diversity revealed that there is no difference in species richness, but in the structure of communities, according to the treatments used. The Phylum Proteobacteria was dominant in the taxonomic analysis of the consortia, with emphasis on the class Gammaproteobacteria. Three genera of methanotrophic bacteria were identified in four microbial consortia that had methane consumption confirmed by gas chromatography, namely Methylomicrobium, Methylomonas and Methylovulum. These samples were then sent for metagenomic sequencing for the recovery of MAGs associated with methanotrophic microorganisms. Of the 90 MAGs recovered, 2 were taxonomically annotated as belonging to the genus Methylomicrobium sp. and that are possibly new species, named LECOM 001 and 002. Both MAGs have genes associated with the nitrogen cycle, sulfur cycle and only in LECOM 002 the pmoABC operon was recovered, indicating that it can indeed oxidize methane. These MAGs also revealed a possible association of these organisms to nitrogen fixation in deep sea carbonate mound regions and are the first records of genomes of this genus recovered in the Santos Basin. These results also represent new evidence of the presence of cold seepage in the region of the Alpha Crucis carbonate mounds, motivating the continuity of methanotrophic research in the region.

Keywords: Metanotrophy. *Methylomicrobium* sp.. Recovery of MAGs. Greenhouse gas. Santos Basin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos processos metabólicos envolvendo o metano em ambientes de *cold seep*.....23

Figura 2. Vias para a oxidação aeróbia do metano e assimilação do formaldeído. Abreviaturas: CytC, citocromo c; FADH, formaldeído desidrogenase; FDH, formato desidrogenase.....25

Figura 3: Três mecanismos de oxidação anaeróbica do metano (OAM). O primeiro método (A) é mediado por um consórcio de arqueas anaeróbias metanotróficas (ANME) dos clados 1,2a,2b e 2c e bactérias redutoras de sulfato (SRB). O segundo método (B) liga a oxidação do metano com a redução do nitrato, mediada por consórcios de ANME e bactérias Anammox. O terceiro mecanismo (C) também liga a oxidação do metano com a redução do nitrato, mas é mediado por ANME e bactérias NC10. Ao contrário dos dois primeiros mecanismos, as bactérias ANME archaea e NC10 competem por metano.....27

Figura 4. Taxonomia de bactérias oxidadoras de metano aeróbio isolados e cultivados. Em rosa, as bactérias metanotróficas pertencentes ao Filo Proteobacteria, em azul, as bactérias pertencentes ao Filo Verrucomicrobia e em amarelo, a bactéria metanotrófica pertencente ao Filo NC10. As colunas representam os diferentes níveis taxonômicos, da esquerda para direita Filo, Classe, Ordem, Família e Gênero.....28

Figura 5. Visão geral da geração de energia e oxidação do metano por clados metanotróficos conhecidos. (a) Via(s) de geração de energia e (b) metabolismo do metano. As morfologias típicas para um modelo em cada clado são mostradas. Aceptores de elétrons para respiração (azul) e genes marcadores (vermelho) são rotulados para cada via.....29

Figura 6. Mapa das áreas de coleta de amostras de sedimento apresentando as áreas denominadas 1, 2 e 3 na Bacia de Santos, São Paulo, Brasil.....31

Figura 7. Fotos dos *box-corers* após coleta de sedimento nos 10 pontos amostrais da bacia de Santos, São Paulo.....32

Figura 8. Fotos dos consórcios microbianos cultivados em tubos *Hungate*, selados e com válvulas para a troca semanal do gás do *headspace*. A imagem A representa os *Hungates* com culturas de *headspace* aeróbio e a imagem B representa as figuras de *headspace* anaeróbio.....34

Figura 9. Esquema representando de forma simplificada a metodologia de empregada neste trabalho.....45

Figura 10. Curva de rarefação para todas amostras sequenciadas dos consórcios microbianos. Todas as amostras alcançaram um platô na curva, indicando esforço amostral suficiente para as análises. As cores indicam as diferentes estações de coleta das amostras. No eixo y está representada a riqueza de espécies e no eixo x o tamanho amostral.....47

Figura 11. Índices de Simpson e Shannon para os tratamentos aplicados nos consórcios. Utilizando o teste de Kruskal-Wallis, o p = 0.53, ou seja, não há diferença significativa na comparação da diversidade alfa dos tratamentos aeróbio e anaeróbio.....48

Figura 12. Diversidade beta utilizando o índice de Bray-Curtis, plotado através do Escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) para representar graficamente a dissimilaridade entre os tratamentos aeróbio e anaeróbio.....50

Figura 13. Abundâncias relativas de Filos identificados nos consórcios com base na metataxonomia dos consórcios microbianos aeróbios e anaeróbios. As cores representam os 5 diferentes Filos identificados. No eixo y está plotada a abundância dos Filos e no eixo x a identificação de cada consórcio microbiano.....51

Figura 14. Abundâncias relativas dos gêneros representativos com base na metataxonomia dos consórcios microbianos cultivados em aerobiose e anaerobiose. As cores representam os diferentes gêneros identificados nos consórcios. No eixo y está plotada a abundância dos Filos e no eixo x a identificação de cada consórcio microbiano.....52

Figura 15. Diagrama de Venn representando as ASVs exclusivas dos consórcios aeróbios, anaeróbios e as compartilhadas entre os dois tratamentos.....53

Figura 16. Abundância diferencial entre os resultados de 16S rRNA dos consórcios incubados em meio NMS em condições aeróbias e anaeróbias para identificação de grupos microbianos abundantes ou diferencialmente presentes nos consórcios. As diferentes cores dos círculos representam as Famílias diferencialmente abundantes entre os dois tratamentos. No eixo y estão representados os Gêneros microbianos identificados nos consórcios e no eixo x a razão logarítmica dos valores diferencialmente expressões entre os dois diferentes tratamentos.....53

Figura 17. Inferência funcional realizada utilizando o gene 16S rRNA e o banco de dados do *software* FAPROTAX para avaliar as possíveis funções metabólicas que se destacam nos consórcios microbianos. Os círculos em rosa representam os consórcios aeróbios e os círculos em azul representam os consórcios anaeróbios. O tamanho dos círculos é determinado pela quantidade de ASVs atribuídas a determinado grupo funcional analisado.....55

Figura 18. Cromatografia gasosa mostrando o consumo de gás metano durante uma semana de medição em quatro consórcios microbianos. No eixo y está plotada a concentração de metano em nmol.L -1 e no eixo x o tempo de incubação do consórcio com o gás metano em horas.....56

Figura 19. Classificação taxonômica geral dos MAGs em níveis de filo e família. O Filo Proteobacteria está representado em turquesa, o filo Actinobacteriota em lilás e o Bacteroidota em rosa.....58

Figura 20. Presença de genes relacionados aos ciclos do metano, nitrogênio e enxofre, e genes redutase nos MAGs da Área 1. No eixo y estão representadas as MAGs e no eixo x os módulos metabólicos analizados.....65

Figura 21. Presença de genes relacionados aos ciclos do metano, nitrogênio e enxofre, e genes redutase nos MAGs da Área 2. No eixo y estão representadas as MAGs e no eixo x os módulos metabólicos analizados.....66

Figura 22. Imagem circular dos MAGs do gênero *Methylomicrobium* recuperados a partir do Metagenoma. Os círculos centrais indicam o conteúdo GC dos genomas e os mais externos as CDSs anotadas e os contigs, respectivamente.....69

Figura 23. Resultado do PHASTERpara os MAGs de *Methylomicrobium sp.* LECOM 001 (A) e LECOM 002 (B). A primeira figura indica a posição em que o cluster foi identificado e as informações acerca do contig em que foi identificado e tamanho. A segunda imagem representa uma descrição detalhada dos genes identificados nos clusters de profagos identificados.....70

Figura 24. Análise filogenômica contendo as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank.....73

Figura 25. Pangenoma comparando as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank. Em verde o bin identificado como a região core entre todos os genomas analizados. Em roxo (Bin 3) a região compartilhada apenas entre *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e em rosa (Bin 4) regiões compartilhadas entre *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e *Methylomicrobium* sp. wino1.....74

Figura 26. Análise comparativa do conteúdo gênico das MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 em comparação com os genomas de referência do GenBank. No eixo y estão as identificações das MAGs e no eixo x os genes analisados.....75

Figura 27. Resultado da análise comparativa das proteínas ortólogas entre as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank. À esquerda os quadros verdes indicam a

presença dos clusters e os cinzas indicam ausência. À direita a contagem de clusters compartilhados e as contagem de proteínas referentes a cada um deles.....78

Figura 28. Fotos das placas de Petri contendo Ágar Marinho para isolamento de bactérias heterotróficas de mar profundo. As figuras A e B representam os isolados obtidos a partir dos consórcios aeróbios e as figuras C e D representam isolados obtidos a partir dos consórcios anaeróbios.....79

Figura 29. Fotos do procedimento utilizado para o cultivo utilizando a metodologia de *roll tube*. A, tubos *Hungate* sendo vedados com *parafilm* para evitar contaminação; B, Meio de cultura com inóculo para o cultivo; C, rolando o tubo *Hungate* com inóculo para fixação do meio de cultura na parede do tubo; D, cultivos com o meio fixado na parede do tubo para incubação em estufa; E, isolados cultivados em meio de cultura NMS líquido obtidos a partir de colônias formadas no *roll tube*.....80

Figura 30. Árvore de Neighbour-joining mostrando as posições filogenéticas dos isolados e representantes de alguns outros taxa relacionados, com base nas sequências do gene 16S rRNA. Os valores de bootstrap (expressos como porcentagens de 10.000 replicações) são mostrados nos pontos de ramificação.....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das amostras de sedimento coletadas através de box-corer, com descrição da área coletada, estação, tipo de amostra e localização.....32

Tabela 2. Identificação dos genomas de referencia baixados do NCBI para análises comparativas com as MAGs recuperadas.....40

Tabela 3. Identificação das sequencias do gene 16S rRNA baixadas do banco de dados do Genbank para a construção da árvore filogenética com a sequencias de isolados sequenciados.....43

Tabela 4. Número de ASVs identificadas em cada um dos consórcios microbianos.....46

Tabela 5. Valores de Shannon e Simpson, por amostra, para as culturas aeróbias e anaeróbias.....49

Tabela 6. Valores totais de reads geradas, por amostras, após o sequenciamento metageômico e após a filtragem por qualidade (processamento).....57

Tabela 7. Qualidade dos contigs montados com metaSPAdes. (Todas as estatísticas são baseadas em contigs de tamanho >=500 pb) 58

Tabela 8. Identificação das MAGs recuperadas a partir do sequenciamento metagenômico. Estão contidas informações acerca da qualidade, contaminação, completude e classificação taxonômica a partir do bando de dados GTDB-tk.....59

Tabela 9. Características do genoma de *Methylomicrobium* sp. cepas LECOM 001 e LECOM002.....68

Tabela 10: Valores de DDH, ANI e AAI comparando as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank.....71

Tabela 11. Quantidade de proteínas, clusters e singletons identificados nos genomas de referência e nos genomas das MAGs 001 e 002..... 77

Tabela 12. Número de isolados obtidos a partir dos cultivos utilizando a metodologia de *roll tube*. A primeira coluna apresenta a identificação dos consórcios de onde foram obtidos os isolados, a segunda coluna apresenta a quantidade de isolados recuperados a partir da incubação em NMS e ágar sem a adição de NaCl e a terceira coluna apresenta a quantidade de isolados recuperados a partir da incubação em NMS e ágar com a adição de NaCl a 3,5%.....81

Tabela 13. Dados de quantificação de DNA das amostras oriundas do isolamento de micorganimos a partir da técnica de roll tube. Segunda, terceira e quarta coluna fazem referência aos dados de quantificação em Denovix e a última em Qubit.....81

SUMÁRIO

SUMÁRIO **15**

1 INTRODUÇÃO **17**

2 OBJETIVOS **20**

2.1 Geral 20

2.2 Específicos 20

3 REVISÃO DE LITERATURA **21**

3.1 O gás metano e suas fontes 21

3.2 Microrganimos metanotróficos e seu metabolismo 23

3.3 Taxonomia e filogenia dos microrganismos metanotróficos 27

3.4 Metagenomica no estudo de microrganismos metanotróficos 30

4 MATERIAIS E MÉTODOS **31**

4.1 Área de estudo e de coleta de amostras 31

4.2 Cultivo de consórcios metanotróficos 34

4.2.1 Cromatografia gasosa 35

4.3 Análise de diversidade e taxonomia a partir do gene barcode 16S rRNA 37

4.3.1 Amplificação e sequenciamento do gene do 16S rRNA por Illumina Miseq 37

4.3.2 Análise bioinformática 37

4.4 Sequenciamento metagenômico dos consórcios microbianos 39

4.4.1 Reconstrução de genomas microbianos usando reads metagenômicos: genomas montados em metagenoma (MAGs) 39

4.4.2 Genômica comparativa entre os MAGs do gênero Methylomicrobium *40*

4.5 Isolamento de microrganismos a partir dos consórcios 41

4.5.1 Isolamento utilizando Ágar marinho *41*

4.5.2 Isolamento utilizando a técnica de Roll tube *42*

4.5.2.1 Extração de DNA, PCR e sequenciamento 42

4.5.2.2 Análise bioinformática dos isolados *43*

5 RESULTADO E DISCUSSÃO **46**

5.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise bioinformática 46

5.4 Diversidade microbiana nos consórcios metanotróficos 48

5.5 Composição taxonômica dos consórcios e abundância diferencial 50

5.5.1 Inferência funcional utilizando o FAPROTAX 54

5.6 Cromatografia gasosa 56
5.7 Metagenomas dos consórcios enriquecidos com microrganismos metanotróficos 57
5.6.1 Montagem e recuperação de MAGs 57
5.8 Isolamento a partir dos consórcios metanotróficos..... 78
5.8.1 Cultivo dos consórcios metanotróficos 78
5.8.2 Isolamento de microrganismos metanotróficos utilizando a técnica de roll tube 79
6. SÍNTESE E RECOMENDAÇÕES 83
7 CONCLUSÕES 86
8 REFERÊNCIAS 87

1 INTRODUÇÃO

Em ecossistemas marinhos, as bactérias metanotróficas desempenham um papel fundamental na oxidação do metano, o que impede que grandes concentrações desse gás do efeito estufa cheguem à atmosfera. Porém, a existência desses grupos em determinados habitats está diretamente ligada à um conjunto complexo de fatores físico-químicos (oxigênio, pH, nutrientes, metais, temperatura, porosidade e granulometria do sedimento, etc.) que são capazes de modular a sobrevivência e a atividade deste grupo (TATE, 2015; DISPIRITO et al., 2016). Além dos fatores fisioquímicos, microrganismos metanotróficos apresentam associações bióticas importantes para sua manutenção em determinados habitats, como o de mar profundo, principalmente com microrganismo heterotróficos associados aos ciclos do nitrogênio e enxofre.

Desde o primeiro isolamento de microrganismos metanotróficos, relatado em 1906 (BAKTERIEN, 1906), o conhecimento acerca da diversidade e das características de crescimento das culturas metanotróficas aumentaram significativamente, devido aos novos enriquecimentos e isolados obtidos em uma ampla variedade de ambientes. A maioria das bactérias metanotróficas aeróbias conhecidas pertencem às classes Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria (HANSON e HANSON, 1996) e, avanços na metodologia utilizada para sua pesquisa, incluindo o cultivo e isolamento desses organismos, possibilitaram que grupos microbianos de outros filos como Verrucomicrobiota e Methylomirabilota fossem posteriormente identificados. A dificuldade em conseguir estudar estes microrganismos está atrelada às diferentes associações bióticas e abióticas que possuem, dificultando seu isolamento e cultivo *in vitro*.

Embora as melhorias nas tecnologias de sequenciamento utilizadas em técnicas independentes de cultivo tenham aumentado nosso conhecimento da microbiota de mar profundo, o uso desses métodos em conjunto com técnicas dependentes de cultivo pode fornecer informações mais sensíveis e completas sobre essas comunidades. Além disso, o uso de técnicas dependentes e independentes de cultivo garantem que organismos viáveis sejam identificados através do gene 16S rRNA, auxiliando em uma melhor compreensão das comunidades de baixa biomassa. Também vale ressaltar que, ser capaz de preservar as culturas microbianas como estoques, permite futuras investigações dos

membros individuais dessas comunidades, além do posterior isolamento desses microrganismos, que permitem estudos mais aprofundados acerca do grupo-alvo, bem como o sequenciamento genômico de isolados.

Além de serem importantes no ciclo global do metano, as bactérias aeróbias metanotróficas são de interesse biotecnológico, visto que podem ser usadas para processos de biodegradação de poluentes orgânicos, já que a enzima chave para metanotrofia nesses organismos, a metano monooxigenase, catalisa diversas reações de oxidação, por exemplo, de solventes clorados como o tricloroetileno (STRONG; XIE; CLARKE, 2015). Alguns biopolímeros como o polihidroxibutirato, produtos metabólicos como ácidos orgânicos, vitaminas, pigmentos ou lipídios (para a produção de biodiesel) podem ser produzidos a partir do metano através da ação de microrganismos metanotróficos (KNIEF, 2015; STRONG; XIE; CLARKE, 2015).

No Brasil, habitats de exsudação de metano (*cold seeps*) ativos foram apenas descritos na Bacia de Pelotas em 2013 (MILLER et al., 2015). Na Bacia de Santos e no Sul do país já foram identificados mais de 2 mil *pockmarcks* (MAHIQUES et al., 2017; DOS SANTOS et al., 2018), formados pela expulsão de gás no fundo marinho em especial o metano (RODRIGUES et al., 2017; PROTILHO-RAMOS et al, 2018). No entanto não há dados sobre a contribuição dessas áreas para a emissão totais de gases de efeito estufa para a atmosfera. Apesar do registro da presença de montes carbonáticos (MALY et al., 2019) e áreas de exsudação de óleo (BELTRÂO et al., 2009), a ocorrência de exsudação fria e consequentemente seu microbioma não foram ainda estudados.

Regiões como a cadeia de montes carbonáticos Alpha Crucis são de grande interesse para o estudo de microrganismos metanotróficos, visto que carbonatos autigênicos podem ser precipitados através de processos biogeoquímicos mediado por um consórcio de metanotróficas e bactérias redutoras de sulfato (JUDD et al., 2020). O trabalho de Bendia et al., 2021 explorou a diversidade de microrganismos na região e fez a primeira descrição da comunidade microbiana presente nos montes carbonáticos, porém, neste trabalho, apenas técnicas independentes de cultivo foram empregadas e microrganismso metanotróficos não foram identificados, mesmo sendo uma região diretamente associada ao extravasamento de metano.

Esta dissertação foi desenvolvida no âmbito da cooperação de pesquisa acordada entre a SHELL Brsil Petróleo Ltda. e o IOUSP, para a realização do projeto intitulado " Avaliação da Biologia e Geoquímica de Exsudações de Óleo e Gás na Costa Sudeste do Brasil (BIOIL)", que tem como objetivo principal mapear áreas de exsudações e a respectiva caracterização da fauna de microrganismos extremófilos, acessando a interação entre comunidades quimiossintéticas e a química da área de exsudação, dentro desse contexto esta dissertação apresenta os objetivos apresentados a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho tem como objetivo pesquisar a ocorrência e diversidade de microrganismos metanotróficos nas amostras de sedimento coletadas na margem continetal do sudeste brasileiro.

2.2 Específicos

- Pesquisar a ocorrência de microrganismos metanotróficos através de metodologias dependentes de cultivo;

- Caracterizar a diversidade taxonômica dos microrganismos presentes nos consórcios a partir do sequenciamento do gene marcados 16S rRNA;

- Caracterizar a diversidade funcional de microrganismos metanotróficos através de análise metagenômica;

- Obter isolados de bactérias metanotróficas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O gás metano e suas fontes

O metano é um alcano simples, consistindo em uma molécula tetraédrica e apolar, formada por um átomo de carbono central (C) e quatro átomos de hidrogênio (H) (CRABTREE, 1995). Essa molécula pode ser encontrada em diversas localidades do planeta, possui diferentes origens e se apresenta como o hidrocarboneto mais abundante na atmosfera. Este gás possui maior capacidade de retenção de calor em relação ao CO_2 (estimada em até 34 vezes maior) em um prazo de 100 anos e 86 vezes maior em um período de 20 anos [Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC), 2018].

A origem biológica do metano está diretamente associada a degradação anaeróbia da matéria orgânica por meio de um processo denominado metanogênese, que requer uma rede de organismos (sintróficos) para fornecer as arqueias metanogênicas compostos como H_2, CO_2 ou acetato, processo esse que ocorre na ausência de O_2 (CABEZAS, de ARAUJO et al. 2015), possibilitando a produção do biogás com uma composição típica de 40-70% (v / v) de CH_4, 30-60% (v / v) CO_2 e 1- 5% (v / v) outros gases (por exemplo, NH_3, H_2S e H_2 (DEMIREL, SCHERER et al., 2010).

Durante a degradação da matéria orgânica, comumente chamada de digestão anaeróbica, um número limitado de grupos arqueais são conhecidos por produzir metano no estágio final deste processo, ou seja, metanogênese, usando CO2, hidrogênio, acetato ou metilado compostos como substratos acoplados à geração de energia para crescimento e fixação de carbono (CONRAD et al., 2020, GUERRERO-CRUZ et. al, 2021).

As arqueais metanogênicas estão presentes em diversos ambientes, como pântanos, turfeiras, solos de cultivo de arroz, pecuária (fermentação entérica em ruminantes), aterros sanitários, em regiões bentônicas e de acoplamento bento-pelágico dos oceanos, assim como em áreas de fontes hidrotermais e exsudação fria e em sub-superfície e cupins; representando aproximadamente 70% de todas as fontes de emissões de metano para a atmosfera (GUERRERO-CRUZ et. al, 2021). Atualmente, as arqueias metanogênicas têm representantes em 4 superfilos reconhecidos: Euryarchaeota, TACK (Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota e Korarchaeota), DPANN

(Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota e Nanohaloarchaeota) e o superfilo Asgard (BERGHUIS et al., 2019; MACLEOD et al., 2019)

Além de fontes biogênicas, também são conhecidas fontes termogênicas (da lenta transformação de matéria orgânica em combustíveis fósseis) e fontes pirogênicas (de biomassa e queima de biocombustíveis) como importantes contribuintes para a produção global de CH_4 (NEEF VAN WEELE et al., 2010).

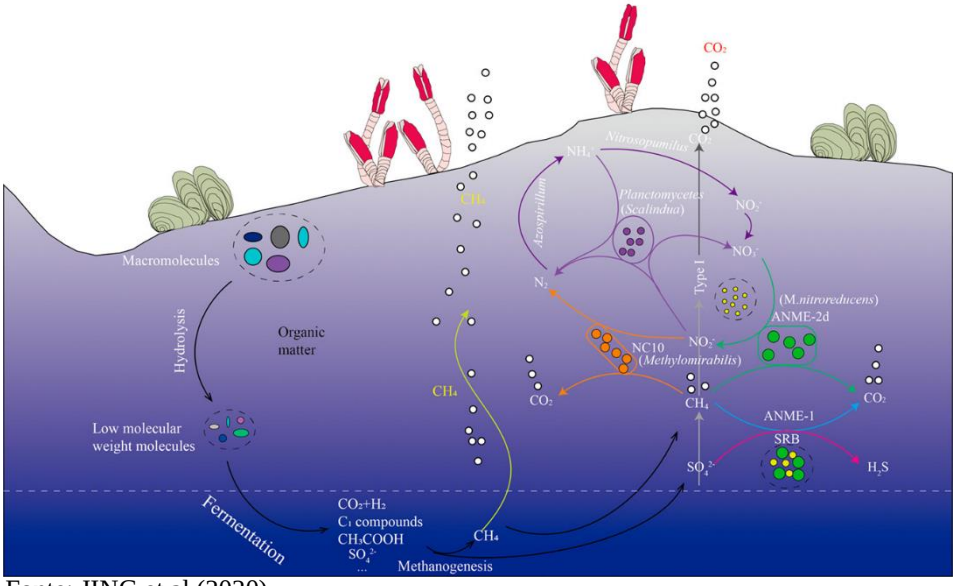
O metano (CH_4) é um importante gás do efeito estufa, sendo 24 vezes mais potente do que o dióxido de carbono, e contribuindo com cerca de 40% do aquecimento global em uma escala de 20 anos (IPCC 2014). Constantemente, grandes quantidades de metano são liberadas na atmosfera, estando associadas à produção de gás e petróleo e pela produção biológica em áreas úmidas naturais e agrícolas, aterros sanitários, tratamento de águas residuais e sistemas de produção agrícola, lagos e do fundo dos oceanos (DEAN et al. 2018). No entanto, uma grande parte desse metano, antes de atingir a atmosfera, é mitigado pela atividade das bactérias oxidantes de metano (BOM) que utilizam o metano como fonte de carbono e energia (BODELIER e STEENBERGH, 2014).

No oceano, o metano que é liberado representa uma quantidade relativamente pequena para o orçamento atmosférico líquido global e, a origem desse metano pode variar, podendo ser via diagênese mediada por microrganismos, produção abiótica de metano por meio da reação de serpentinização, uma reação rocha / água que ocorre em sistemas hidrotérmicos associados às cristas meso-oceânicas e centros de disseminação, vazamentos de depósitos de petróleo próximos à superfície e decomposição de hidratos de metano (REEBURGH, 2007). Esse metano pode ser liberado na coluna d'água através de diferentes fontes, como escoamento costeiro, por difusão de sedimentos anóxicos ricos em orgânicos e através de áreas de exsudação (Figura 1), fontes hidrotermais, *pockmarcks* e vulcões de lama que emitem fluidos ou bolhas ricas em metano.

Apesar da adição de quantidades significativas de metano à coluna d'água, as reações de oxidação aeróbia e anaeróbia mediadas por microrganismos consomem efetivamente o metano adicionado, de modo que a maior parte do que é liberado, também é oxidado. Em sedimentos marinhos aeróbios de subsuperfície a oxidação do metano utilizando oxigênio é a grande responsável pela retirada deste hidrocarboneto da coluna d'água, porém, a profundidade de penetração do oxigênio nos sedimentos marinhos é limitada (HENSEN, ZABEL, 2000), o que restringe a área onde bactérias metanotróficas marinhas

conseguem oxidar aerobiamente o metano. Dessa forma, a oxidação anaeróbia do metano, dependente de sulfato, por exemplo, também é um processo importante para a oxidação desse hidrocarboneto e que pode ser realizada por associações entre arqueias e bactérias redutoras de sulfato, principalmente em regiões anóxicas do sedimento marinho, já que a profundidade de penetração do sulfato alcança essas regiões (KRÜGER et al., 2005).

Figura 1. Representação esquemática dos processos metabólicos envolvendo o metano em ambientes de *cold seep*.



Fonte: JING et al (2020)

3.2 Microrganimos metanotróficos e seu metabolismo

Bactérias metanotróficas são um subconjunto de um grupo de bactérias conhecidas como metilotróficas. As bactérias metilotróficas são microrganismos que utilizam compostos de um carbono mais reduzidos do que o ácido fórmico como fontes de carbono e energia e assimilam o formaldeído como a principal fonte de carbono celular. Dentro desse conjunto, as bactérias metanotróficas são organismos únicos, capazes de utilizar metano como única fonte de carbono e energia (HANSON e HANSON, 1996).

Microrganismos metanotróficos realizam a oxidação do metano para aproveitar a energia sob condições óxicas e anóxicas, podendo utilizar uma variedade de aceptores de elétrons. A metanotrofia foi um processo relatado, inicialmente, em 1906 como exclusivamente dependente de oxigênio e por muito tempo se manteve assim. Durante

quase um século acreditou-se que o processo metanotróficos era exclusivamente aeróbico, sendo esta a única via biológica para oxidar o metano e os responsáveis por tal processo, eram microrganismos do filo Proteobacteria (WHITTENBURY et al., 1970; HANSON e HANSON, 1996). Descobertas recentes, mais especificamente nas últimas duas décadas, ampliaram a visão sobre os processos que envolvem a metanotrofia, através da identificação de microrganismos que pertencem a outros Filos e que são capazes de realizar tal processo e até mesmo no domínio Archaea, capazes de oxidar o metano anaerobicamente usando aceptores de elétrons alternativos como sulfato, nitrito, nitrato, ferro e manganês (KNITEL e BOETIUS, 2009).

3.2.1 Metanotrofia aeróbia

As bactérias metanotróficas aeróbias podem ser divididas em dois grupos fisiológicos distintos (Figura 2). Metanotróficas do tipo I (*Methylomonas*, *Methylocaldum*, *Methylosphaera*, *Methylomicrobium* e *Methylobacter*) que assimilam o formaldeído produzido a partir da oxidação do metano (via metanol) usando a via do monofosfato de ribulose (ANTHONY, 1986). Metanotróficas do tipo II (*Methylocystis* e *Methylosinus*) utilizam a via da serina para a assimilação do formaldeído, possuem membranas intracitoplasmáticas dispostas ao redor da periferia da célula e contêm predominantemente ácidos graxos (HANSON, 1996).

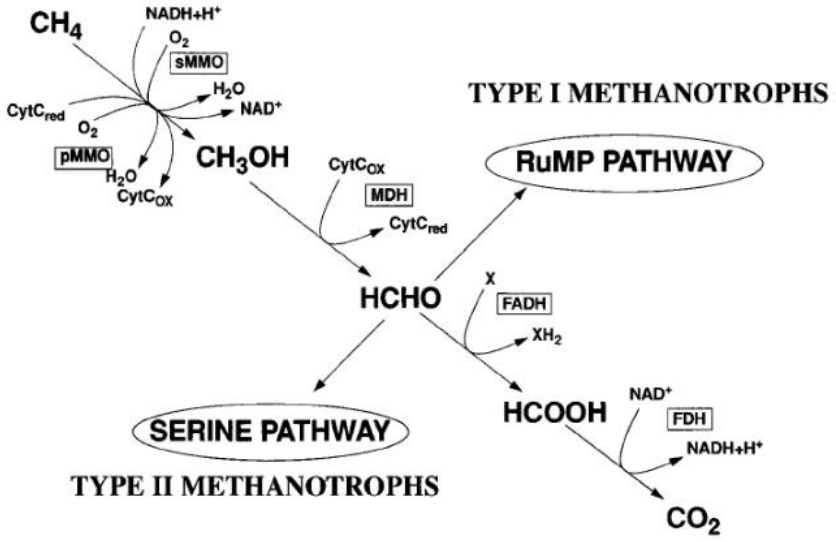
A enzima responsável pela oxidação do metano é a metano monooxigenase (MMO). Existem duas formas desta enzima: um complexo enzimático citoplasmático solúvel (sMMO) e uma enzima particulada ligada à membrana (pMMO). As mais bem caracterizadas são as enzimas sMMO de *Methylococcus capsulatus* (DALTON, 1993) e *Methylosinus trichosporium* (LIPSCOMB, 1994).

O complexo enzimático sMMO consiste em três componentes. A proteína A é uma hidroxilase que consiste em três subunidades de aproximadamente 60, 45 e 20 kDa, dispostas em uma conformação $\alpha 2\beta 2\gamma 2$. As subunidades α é onde acredita-se que aconteça a da reação de monooxigenação. A proteína B, uma proteína de acoplamento de 16 kDa, facilita o fluxo de elétrons e / ou as interações entre as proteínas A e C. A proteína C (38 kDa) é o componente redutase do sMMO e catalisa a transferência de equivalentes redutores de NADH para a hidroxilase (MURRELL; MCDONALD; BOURNE, 1998).

A enzima pMMO consiste em três polipeptídeos pMMO putativos de 47, 27 e 25 kDa, os dois primeiros dos quais foram previamente observados como polipeptídeos principais

presentes quando as células expressavam um MMO ligado à membrana. Os genes que codificam os polipeptídeos pMMO de 27 e 45 kDa, designados *pmoA* e *pmoB*, estão ligados no cromossomo desse organismo. Outro gene encontra-se a 5 'de *pmoA* e *pmoB*, este é designado *pmoC*, codificando um polipeptídeo putativo de cerca de 20 kDa que pode ser outro componente de pMMO (MURRELL; MCDONALD; BOURNE, 1998).

Figura 2. Vias para a oxidação aeróbia do metano e assimilação do formaldeído. Abreviaturas: CytC, citocromo c; FADH, formaldeído desidrogenase; FDH, formato desidrogenase.



Fonte: Hanson e Hanson (1996).

3.2.2 Metanotrofia anaeróbia

O processo de metanotrofia anaeróbia foi registrado, pela primeira vez em sedimentos marinhos, em zonas conhecidas pela presença de sulfato (KNITTEL e BOETIUS, 2009). Porém, nesta época, nenhum cultivo havia sido realizado, portanto, o processo não havia sido totalmente caracterizado e o conhecimento sobre a capacidade de arqueias de realizarem este processo ainda era desconhecido.

Pouco depois, a microbiologia por trás desse processo foi descrita como processo de oxidação anaeróbica de metano dependente de sulfato (S-dAOM) por um consórcio microbiano composto por bactérias redutoras de sulfato (SRB) e arqueias metanotróficas

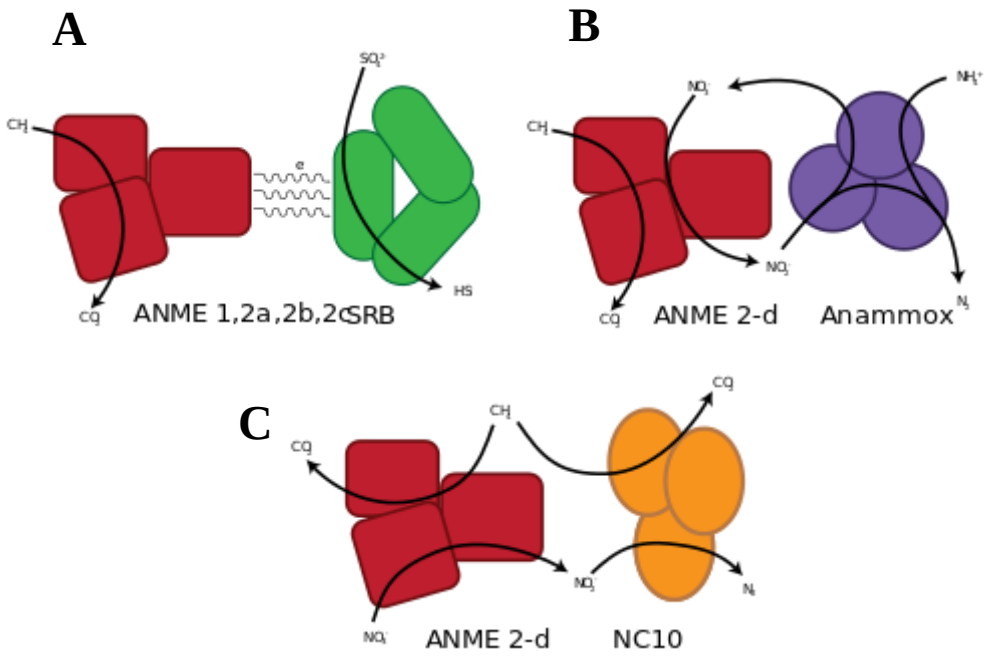
(BOETIUS et al., 2000). As Arqueias Metanotróficas Anaeróbias (ANME) foram confirmadas logo após, atualmente classificadas como ANME 1, 2, 3 (BOETIUS et al., 2000; ORPHAN et al., 2001; NIEMANN et al., 2006).

Ao contrário dos metanotróficos bacterianos, as arquéias metanotróficas ou *Archaeal ANaerobic MEthanotrophs* (ANME) invertem o caminho usado pelos metanogênicos, oxidando o metano na ausência de oxigênio molecular. A oxidação do metano por arquéias pode ser realizada utilizando diferentes aceptores de elétrons, incluindo sulfato, nitrato, nitrito, ácidos húmicos, ferro ou manganês (SMITH e WRIGHTON, 2019). Esses organismos prosperam em ambientes anóxicos e, como os metanogênicos, estão sujeitos à toxicidade do oxigênio (CAI et al., 2018). A variação nos aceptores de elétrons, entradas de metano ou diferenças de biomassa podem explicar parcialmente as taxas altamente variáveis de oxidação anaeróbica de metano para esses taxa nos ecossistemas (KNITEL e BOETIUS, 2009).

Todas as linhagens ANME atualmente conhecidas são membros da classe Methanomicrobia do filo Euryarchaeota. Dentro da Methanomicrobia, o grupo ANME-1 parece ser uma ordem distinta, várias linhagens de ANME-2 formam um clado monofilético dentro da ordem Methanosarcinales, enquanto o ANME-3 provavelmente representa um gênero específico dentro da família Methanosarcinaceae (KNITEL e BOETIUS, 2009; TIMMERS et al., 2017).

A oxidação anaeróbia do metano (OAM) é ocorre em diferentes ambientes e pode ser realizada por uma gama de microrganismos, dentre eles mesófilos, mas também psicrófilos, termófilos, halófilos, acidófilos e alcófilos. Durante a OAM, o metano é oxidado através da utilização de diferentes aceptores finais de elétrons e este processo pode ocorrer sozinho ou em sintrofia com um organismo. As ANME podem se associar com bactéris reutoras de sultato (SRB) e realizar um tipo de metanotrofia anaeróbia conhecida como OMA induzida por sulfato, onde formam-se pequenos agregados entre as SRB e ANME e a a oxidação do metano ocorre através da disponibilização dos aceptores de elétrons após a redução do sulfato. Além dessa associação, a metanotrofia anaeróbia também pode acontecer associada à redução do nitrato e do nitrito, realizadas em associação com *Methanoperedens nitrorreducens* e Candidatus *Methylomirabilis oxyfera*, respectivamente (Figura 3) (SMITH & WRIGHTON, 2019).

Figura 3: Três mecanismos de oxidação anaeróbica do metano (OAM). O primeiro método (A) é mediado por um consórcio de arqueas anaeróbias metanotróficas (ANME) dos clados 1,2a,2b e 2c e bactérias redutoras de sulfato (SRB). O segundo método (B) liga a oxidação do metano com a redução do nitrato, mediada por consórcios de ANME e bactérias Anammox. O terceiro mecanismo (C) também liga a oxidação do metano com a redução do nitrato, mas é mediado por ANME e bactérias NC10. Ao contrário dos dois primeiros mecanismos, as bactérias ANME archaea e NC10 competem por metano.



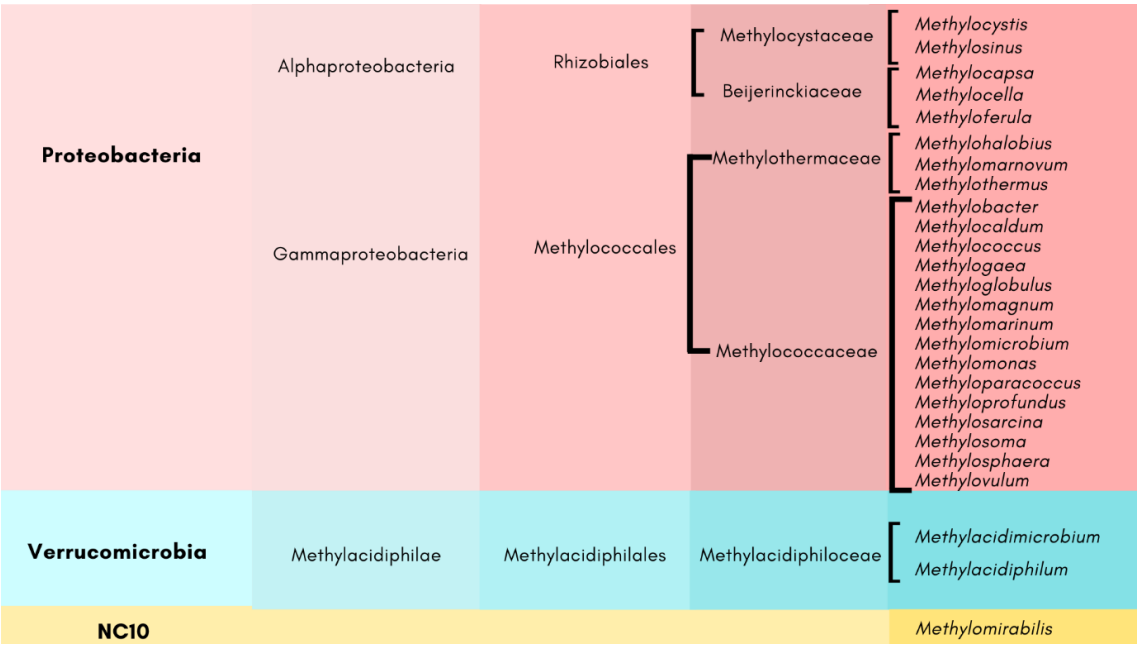
Modificado de: RAGHOEBARSING et al, 2006

3.3 Taxonomia e filogenia dos microrganismos metanotróficos

A maioria das bactérias metanotróficas foram inicialmente classificadas como pertencentes as classes alfa e gamaproteobactéria (KNIEF, 2015) e caracterizadas como gêneros e espécies diferenciadas com base em sua filogenia e caracteres morfológicos (Figura 4), que delimitam suas diferentes estratégias de vida e habitats (HO, 2013). No entanto, com o avanço das técnicas de sequenciamento (*next-generation sequencing* - NGS) e nas metodologias de análise de dados (identificação taxonômica molecular, filogenias robustas com vários genes marcadores concatenados, recuperação de genomas através de metagenomas e outros) novos grupos de microrganismos metanotróficos foram identificados e, apesar de não terem sido isolados, foi possível acessar a informação genômica desses organismos (MURRELL; MCDONALD; BOURN, 1998; DEDYSH, 2009; KNIEF, 2015; SETIAWAN; VERSANTVOORT et al., 2018; SUDIANA, 2019).

Os estudos realizados com os isolados cultivados expandiram a taxonomia das bactérias metanotróficas e permitiram incluir o Filo Methylomirabilota, anteriormente *candidatus* NC10, representados pelas bactérias do gênero *Methylomirabilis,* como organismos capazes de realizar a oxidação anaeróbia do metano dependente de nitrito (WU, et al. 2011), e o Filo Verrucomicrobiota (DEDYSH, 2009) com representantes *Methylacidimicrobium* (VAN TEESELING et al., 2014) e *Methylacidiphilum* (ANVAR et al., 2014).

Figura 4. Taxonomia de bactérias oxidadoras de metano aeróbio isolados e cultivados. Em rosa, as bactérias metanotróficas pertencentes ao Filo Proteobacteria, em azul, as bactérias pertencentes ao Filo Verrucomicrobia e em amarelo, a bactéria metanotrófica pertencente ao Filo NC10. As colunas representam os diferentes níveis taxonômicos, da esquerda para direita Filo, Classe, Ordem, Família e Gênero.

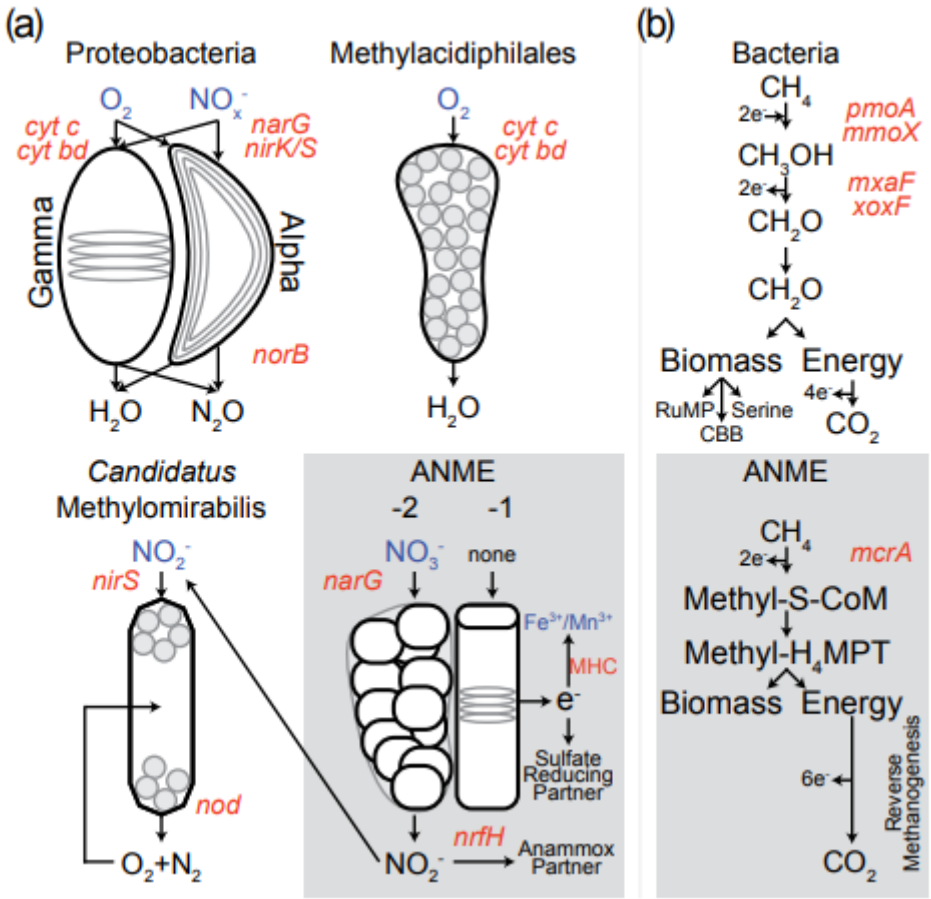


Fonte: Atualizado de Dedysh (2009)

A aplicação de técnicas de biologia molecular e do sequenciamento do gene *barcode* 16S rRNA permitiu que relações filogenéticas dentro de gêneros de metanotróficos fossem exploradas. A observação de que os metanotróficos podem ser separados em grupos filogenéticos coerentes que compartilham características fisiológicas comuns é importante para o uso da tecnologia de sonda 16S rRNA no estudo da ecologia dessas bactérias. Além do 16S rRNA, outros genes marcadores (Figura 5) tem sido utilizado para elucidar as relações filogenéticas entre os grupos e para a identificação taxonômica molecular, como os genes relacionados às partes genes

estruturais *sMMO*, os genes que codificam *pMMO* e *AMO* e suas diferentes partes estruturais (MURRELL; MCDONALD; BOURNE, 1998).

Figura 5. Visão geral da geração de energia e oxidação do metano por clados metanotróficos conhecidos. (a) Via(s) de geração de energia e (b) metabolismo do metano. As morfologias típicas para um modelo em cada clado são mostradas. Aceptores de elétrons para respiração (azul) e genes marcadores (vermelho) são rotulados para cada via.



Fonte: SMITH & WRIGHTON, 2019

Embora um número alto de sequências de *pmoA* ambientais recuperados de metagenomas possa ser vinculado a representantes metanotróficos anteriormente cultivados, ainda há uma grande fração da diversidade de bactérias metanotróficas que ainda não foi isolada e nem cultivada (KNIEF, 2015). Consequentemente, a taxonomia das bactérias oxidadoras de metano aeróbio, provavelmente ainda se expandirá com o aumento dos esforços de amostragem em diferentes habitats e com o uso de diferentes ferramentas de análise de dados.

3.4 Metagenomica no estudo de microrganismos metanotróficos

A metagenômica *shotgun* tem funcionado como uma ferramenta poderosa e importante para explorar as funções das comunidades microbianas e determinar sua composição filogenética, taxonômica e funcional ao longo dos últimos anos (PARKS et al., 2017). Esta técnica se torna interessante pois é capaz de eliminar alguns vieses e alguns artefatos que podem estar associados a técnicas que utilizam o sequenciamento de amplicons, por exemplo. Explorando apenas genes marcadores, como os genes ribossomais, algumas falhas na metodologia podem ser identificadas, como viés de primer (KLINDWORTH et al., 2013), quimerismo de sequências (EDGAR et al., 2011) e até a subamostragem em bancos de dados curados para posterior identificação taxonômica dos microrganismos de interesse. Neste sentido, a metagenômica traz uma abordagem que contempla informações adicionais acerca do objeto amostral que se deseja estudar, possibilitando explorar com maiores detalhes e acessar o conteúdo gentético completo, ou quase completo, das comunidades de interesse.

Dentre os integrantes dessas comunidades de interesse estão os microrganismos metanotróficos, que desempenham papéis ecológicos importantes em diversos ambientes, desde a oxidação de gases do efeito estufa até a degradação de poluentes orgânicos, produção de uma variedade de precursores industriais e até possível atividade biotecnológica, auxiliando na biorremediação de metais como cobre (YOON et al., 2010; PURI et al., 2015; STRONG et al., 2015; PAPADOPOULOU et al, 2019). Em combinação com outras técnicas químicas e de imagem a metagenômica atuou como ferramenta determinante para as descobertas acerca deste grupo ao longo dos últimos anos.

Hoje, com o poder de recuperar genomas quase completos (MAGs ou Metagenome-assembled genomes) a partir do sequenciamento genômico total, o cultivo axênico não é mais um requisito obrigatório para investigação das capacidades metabólicas dos organismos (SOLDEN et al.,2016), o que torna a ferramenta ainda mais interessante para o estudo de comunidades microbianas metanotróficas, visto que o cultivo das mesmas é um tarefa árdua, já que esses microrganismos mantém relações sintróficas com outros heterotróficos. Um bom exemplo são as ANME, pois não há até o momento um epresentante da ANME em cultura axênica e informações genômicas para

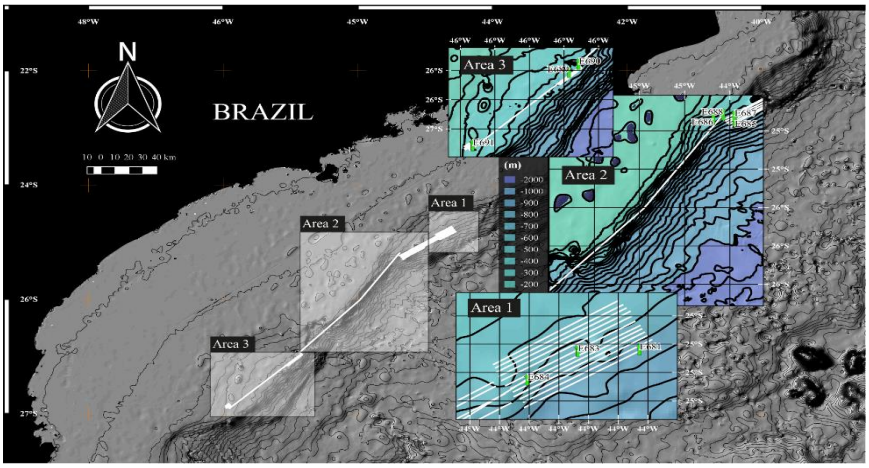
este grupo foram obtidas pela primeira vez em 2005, através da metagenômica (MEYERDIERKS et al., 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e de coleta de amostras

A Bacia de Santos situa-se na região sudeste da margem continental brasileira, ocupando cerca de 350.000 km^2. É uma bacia sedimentar que abrange o litoral dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, limitando-se ao norte com a Bacia de Campos pelo Alto de Cabo Frio e ao Sul com a Bacia de Pelotas pela Plataforma de Florianópolis (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL - ANP, 2016). As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas em novembro de 2019 a bordo do navio *Alpha Crucis* do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO / USP) durante o desenvolvimento do projeto BIOIL. As amostras foram coletadas em três áreas (Figura 6), na região sudoeste do Atlântico da Bacia de Santos, Sudeste do Brasil. Essas áreas representam regiões geológicas com formações geológicas onde com frequência existem exsudações de metano. Por essa razão foram escolhidas para esse estudo.

Figura 6. Mapa das áreas de coleta de amostras de sedimento apresentando as áreas denominadas 1, 2 e 3 na Bacia de Santos, São Paulo, Brasil.



Toda a área indicada na Figura 6 é rica em montes carbonáticos, formando o “Alpha Crucis Ridge”, conforme descrito em Maly et al. (2019). As áreas e estações de amostragem são descritas na **Tabela 1**. Amostras de sedimento foram coletadas em triplicatas de *box-corer* de 50 x 50 x 50 por estação. A água foi drenada antes da abertura do *box-corer* e quatro núcleos de 7 x 20 cm foram coletados para análise microbiana.

Além disso, também foram coletadas amostras com *gravity-corer* na estação 686, que compreendeu a profundidade de sedimento de 350 cm (Figura 7). Os núcleos foram extrudados e subamostrados em profundidades de 0-15 cm, armazenados em tubos *Hungate* com retirada de todo ar do *headspace*, adição de Argônio e preservadas a 5 ° C.

Figura 7. Fotos dos *box-corers* após coleta de sedimento nos 10 pontos amostrais da bacia de Santos, São Paulo.

Também foram coletadas amostras de uma esponja do gênero *Aphrocallistes* sp. e um coral do gênero *Enallopsammia* sp. para descrição das comunidades microbianas metanotróficas associadas. Para esta análise, coletamos seções vivas e mortas da esponja do ponto amostral 685, *box-corer* 3 e o coral do ponto amostral 681, *box-corer* 1 que foram armazenadas em água marinha, com *headspace* preenchido com argônio e armazenadas a 5 ° C para posterior incubação em meio de cultura. O material foi enviado ao Laboratório de Ecologia Microbiana do Instituto Oceanográfico (LECOM-IO / USP), São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil.

Tabela 1. Descrição das amostras de sedimento coletadas através de box-corer, com descrição da área coletada, estação, tipo de amostra e localização.

Área de coleta	*ID Estação*	*Método de coleta*	*Tipo de amostra*	*Latitude*	*Longitude*	*Profundidade*
Área 1	*St.* 681	Box-corer 1	Coral	24˚ 31.422’	043˚ 55.825’	810 m
Área 1	*St.* 681	Box-corer 1	Sedimento	24˚ 31.422’	043˚ 55.825’	810 m
Área 1	*St.* 681	Box-corer 2	Sedimento	24˚ 31.399’	043˚ 55.872’	744 m
Área 1	*St.* 681	Box-corer 3	Sedimento	24˚ 31.328’	043˚ 55.849’	740 m

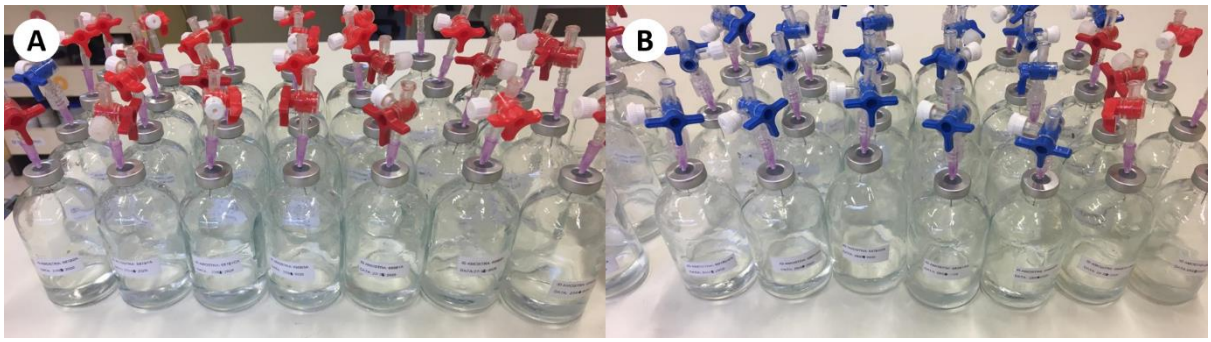
Área 1	*St.* 683	Box-corer 1	Sedimento	24˚ 37.452’	044˚ 00.878’	852 m
Área 1	*St.* 683	Box-corer 2	Sedimento	24˚ 37.449’	044˚ 00.883’	865 m
Área 1	*St.* 683	Box-corer 3	Sedimento	24˚ 37.449’	044˚ 00.885’	865 m
Área 1	*St.* 684	Box-corer 1	Sedimento	24˚ 40.281’	044˚ 04.943’	820 m
Área 1	*St.* 684	Gravity-corer	Sedimento	24˚ 40.248’	044˚ 04.913’	200m
Área 2	*St.* 685	Box-corer 1	Sedimento	24˚ 55.946’	044˚ 28.419’	592 m
Área 2	*St.* 685	Box-corer 3	Esponja morta	24˚ 55.939’	044˚ 28.449’	-
Área 2	*St.* 685	Box-corer 3	Esponja viva	24˚ 55.939’	044˚ 28.449’	-
Área 2	*St.* 686	Box-corer 1	Sedimento	24˚ 55.200’	044˚ 35.483’	581 m
Área 2	*St.* 686	Box-corer 2	Sedimento	24˚ 55.228’	044˚ 35.406’	577 m
Área 2	*St.* 686	Box-corer 3	Sedimento	24˚ 55.247’	044˚ 35.415’	578 m
Área 2	*St.* 686	Gravity-corer	Sedimento	24˚ 55.251’	044˚ 35.408’	350 m
Área 2	*St.* 687	Box-corer 1	Sedimento	24˚ 54.012’	044˚ 28.467’	675 m
Área 2	*St.* 687	Box-corer 2	Sedimento	24˚ 53.997’	044˚ 28.536’	665 m
Área 2	*St.* 687	Box-corer 3	Sedimento	24˚ 54.065’	044˚ 28.506’	677 m
Área 2	*St.* 688	Box-corer 1	Sedimento	24˚ 53.536’	044˚ 32.181’	564 m
Área 2	*St.* 688	Box-corer 2	Sedimento	24˚ 53.534’	044˚ 32.141’	563 m
Área 2	*St.* 688	Box-corer 3	Sedimento	24˚ 53.517’	044˚ 32.122’	563 m
Área 3	*St.* 689	Box-corer 1	Sedimento	26˚ 15.742’	045˚ 42.869’	869 m
Área 3	*St.* 689	Box-corer 2	Sedimento	26˚ 15.’770'	045˚ 42.858’	870 m
Área 3	*St.* 690	Box-corer 1	Sedimento	26˚ 11.560’	045˚ 38.728’	762 m
Área 3	*St.* 690	Box-corer 2	Sedimento	26˚ 11.553’	045˚ 38.728’	739 m
Área 3	*St.* 690	Box-corer 3	Sedimento	26˚ 11.560’	045˚ 38.723’	736 m
Área 3	*St.* 691	Box-corer 1	Sedimento	26˚ 53.216’	046˚ 24.732’	519 m
Área 3	*St.* 691	Box-corer 2	Sedimento	26˚ 53.219’	046˚ 24.730’	516 m

4.2 Cultivo de consórcios metanotróficos

As amostras de sedimento coletadas em todos os pontos amostrais foram utilizadas para o cultivo de microrganismos metanotróficos (Figura 8). Foram realizadas culturas aeróbias e anaeróbias em meio de cultura NMS com adição de cobre (WHITTENBUR, et al., 1970). O meio foi preparado contendo, por litro, 1g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g de KNO_3, 0,2g $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,1 mL 3.8% (w/v) solução Fe-EDTA, 0,5 mL 0.1% (w/v) $NaMo \cdot 4H_2O$, 1mL Elemento traço (solução, por litro: 500 mg $FeSO_4.7H_2O$, 400 mg $ZnSO_4.7H_2O$, 20 mg $MnCl.7H_2O$, 50 mg $CoCl_2.6H_2O$, 10 mg $NiCl_2.6H_2O$, 15 mg H_3BO_3, 250 mg EDTA). Após a autoclavagem, foram adicionados: 10 mL, por litro de Solução de Fosfato (26 g KH_2PO_4 e 62 g $NaHPO_4.7H_2O$ em 1L de solução estoque); 1,4 mg de $CuCl_2$ $2H_2O$ por litro de meio e 10 mL de extrato de solo preparado a partir do sedimento de mar profundo, obtido de acordo com a metodologia de HAMAKI et. al (2005). O *headspace* das culturas aeróbias foi composto de metano:ar na proporção de 1:1 e nas culturas anaeróbias o *headspace* foi composto por metano:argônio na proporção de 1:1.

As amostras de coral e esponja que foram coletadas e armazenas em água marinha também foram incubadas com meio NMS. O material foi fragmentado com pinça estéril e adicionado ao meio de cultura líquido, tendo o *headspace* das culturas aeróbias composto de metano:ar na proporção de 1:1 e nas culturas anaeróbias, foi composto por metano:argônio na proporção de 1:1. Todos os gases foram injetados de forma asséptica por filtro 0.22 µm acoplado à seringa.

Figura 8. Fotos dos consórcios microbianos cultivados em tubos *Hungate*, selados e com válvulas para a troca semanal do gás do *headspace*. A imagem A representa os *Hungates* com culturas de *headspace* aeróbio e a imagem B representa as figuras de *headspace* anaeróbio.



Durante a suspensão das atividades laboratoriais devido ao COVID-19 no ano de 2020 as culturas foram submetidas a 3 estratégias de armazenamento. Primeiramente, os

40 mL de cada cultura foram armazenados da seguinte forma: 20 mL foram armazenados em tubos Falcon no ultra congelador (-80 ºC) para posterior extração do DNA; 7 mL foram armazenados em um tubo Falcon com 3 mL de glicerol 100% para preservação celular e 13 mL foram mantidos nos tubos *Hungate* na tentativa de manter o crescimento. Adicionamos mais metano ao *headspace* e reduzimos a temperatura da BOD para 5 ºC para reduzir o metabolismo microbiano e favorecer a preservação dos consórcios (Figura 9).

4.2.1 Cromatografia gasosa

O gás do *headspace* foi trocado semanalmente, para manutenção do metano (única fonte de carbono disponibilizada) nas culturas, com base na curva de consumo do gás. A composição do gás do *headspace* (CH_4) foi determinada usando um cromatógrafo gasoso (GC6850, Agilent Technologies) equipado com uma coluna de 20m x 0,2 mm. O detector de ionização de chama (FID) usado para determinação de CH_4 possui aquecimento a 220 ° C, pressão de 143 kPa, N_2 como um gás de arraste, pressão de H_2 de 75 kPa, pressão do ar de 50 kPa e tempo de retenção de 2,5 minutos.

A medição do metano foi baseada na metodologia de Nakayama e colaboradores (2011) e Marani e Alvalá (2007). Uma curva padrão de metano, foi gerada pela diluição de CH_4 puro 99,9% (White Martins) em ar ambiente, de 1:1 a 1:10, e a fórmula foi utilizada para a conversão dos dados da área de GC em porcentagem. Após estabelecido o padrão, a leitura do gás ocorreu com a retirada de alíquotas de 1mL da atmosfera do frasco, por meio de agulhas e seringas de 1mL estéreis, e injeção no cromatógrafo para detecção do valor de metano, sendo todas as amostras medidas em triplicata técnica. A cada dia diferente de medição, um CH_4 puro foi medido em triplicata e o valor foi descontado do valor da curva, gerando um fator de correção que é então aplicado para padronizar as amostras analisadas em dias diferentes. Entre cada medição das alíquotas foi passado 0,1 mL de ar ambiente no cromatógrafo, para evitar a contaminação cruzada entre as amostras e evitar resíduos nas seringas utilizadas para medição.

A concentração de metano foi obtida com o cálculo da média da área do gás padrão (NAKAYAMA et al., 2011; RAFAEL, 2018):

$$\textbf{\textit{Cpadrão}} = \frac{\textbf{\textit{Vinjetado x p}}}{\textbf{\textit{Vmolar}}}$$

Em que:

Volume injetado (***Vinjetado***) = 1 x 10^{-4} L

Pureza do gás (***p***) = 0,995

Volume molar (***Vmolar***) = 22,4 L

Desse modo, a Concentração padrão (Cpadrão) = 0,004441964 mol/L ou 4,441964 mmoles/L

A partir desse resultado, a concentração de metano do *headspace* dos frascos foi medida da seguinte maneira:

$$\textbf{\textit{Cmetano}} = \frac{\textbf{\textit{Aamostra x Cpadrão}}}{\textbf{\textit{Apadrão}}}$$

Em que:

Cmetano = concentração de metano (mmoles/L)

Aamostra = área da amostra

Apadrão = área do padrão

Cpadrão: Concentração molar padrão (4,441964 mmoles/L)

Assim, com os resultados das concentrações de metano medidos, expressos em mmol/L ou mM, foram construídos gráficos de consumo de metano dos cultivos enriquecidos.

4.3 Análise de diversidade e taxonomia a partir do gene barcode 16S rRNA

4.3.1 Amplificação e sequenciamento do gene do 16S rRNA por Illumina Miseq

O DNA das culturas foi extraído utilizando o *DNeasy PowerBiofilm kit* (MoBio, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração, aproximadamente 15 mL das culturas de células, que foram mantidas na BOD, foi concentrado em centrífuga refrigerada a 20ºC (12.000 g, durante 15 minutos). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com a solução lise do kit. Após extração, o DNA foi quantificado utilizando Qubit dsDNA HS Assay (Thermo-Fisher Scientific, Estados Unidos).

O gene 16S rRNA foi sequenciado através da plataforma Illumina Miseq *paired-end*, usando os *primers* 515F-\y 5´-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3´, 926R 5´-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3´ (QUINCE et al., 2011; PARADA; NEEDHAM; FUHRMAN, 2015), que tem como alvo as regiões V3-V4 do gene.

4.3.2 Análise bioinformática

As sequências do gene 16S rRNA foram analisadas, primeiramente, quanto a sua qualidade através do *software* FastQC (ANDREWS et al., 2010). As análises bioinformáticas foram realizadas utilizando o software Qiime 2, versão 2020.11, seguindo o *pipeline* do site. As sequências brutas foram importadas para o QIIME 2 (v.2020.2, https://docs.qiime2.org/) usando o *script qiime tools import* através de um *manifest file*. As sequências foram sumarizadas através do comando *qiime demux sumarize* e o *software* DADA2 foi usado para obter as variantes de sequências observadas (ASVs) (CALLAHAN et al., 2016). Através da análise da qualidade gerada pelo FastQC, tanto as sequências *foward* quanto as sequências *reverse* foram truncadas na posição 240 e os *barcodes* foram retirados, utilizando o *script qiime dada2 denoise-paired*. A taxonomia foi assinada através do *script qiime feature-classifier* utilizando o banco de dados SILVA v138 (QUAST et. al, 2012). As distâncias filogenéticas foram calculadas usando o *script qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree,* usando o alinhador MAFFT (KATOH et al., 2009).

As métricas de diversidade alfa e beta foram calculadas por meio *do script qiime diversity core-metrics-phylogenetic* que calcula métricas centrais de diversidade. No pacote *phyloseq* (MCMURDIE; HOLMES, 2013) do R (versão 3.6.3) foram calculados os índices de Simpson e Shannon, sendo Shannon utilizado para explorar a riqueza das amostras e Simpson para explorar o componente da equitabilidade (KIM et al., 2017) e foram visualizados via box-plot. Para determinar se houve diferenças significativas na riqueza e equabilidade, foi realizado o teste Kruskal-Wallis. A diversidade beta foi medida pela distância Bray-Curtis e visualizada via NMDS (escala multidimensional não métrica) usando o pacote *phyloseq* (versão 3.6.3). Para determinar se houve diferenças na dissimilaridade do tratamento aplicado às culturas, foram realizados os testes Permanova. Para identificar as ASVs que são abundantes diferencialmente entre os tratamentos, foi utilizado o *software* DESeq2, que realiza análise de expressão diferencial para dados de contagem de sequência (LOVE et al., 2014).

As previsões de processos ecológicos com base na metataxonomia foram realizadas utilizando a ferramenta FAPROTAX (LOUCA et al., 2016), porém com banco de dados editado, através da adição de 21 novas funções. Resumidamente, o banco de dados FAPROTAX_1.2.4, disponível em http://www.zoology.ubc.ca/louca/FAPROTAX, foi editado da seguinte forma: a)adição de táxons e papéis ecológicos baseados em culturas do Banco de dados IJSEM (Barberan, 2016), a busca manual de papéis ecológicos em publicações de diferentes níveis de taxonomia (de Filo a Espécie) no banco de dados LPSN (PARTE, 2018); b) pesquisas de função única / gene no NCBI (https: // www .ncbi.nlm.nih.gov / search /); c) táxons cultivados e não cultivados em referências na base de dados SILVA (YILMAZ et al., 2014); táxons adicionais de isolados, relatórios de genoma e relatórios de genoma montados por metagenoma. O banco de dados editado, FAPROTAX_ed_March_2021, está disponível em https://github.com/fmnakamura/faprotax_db_edition.

Gráficos de barra, mostrando a distribuição dos táxons nas amostras, gráfico de Venn, e gráficos de bolhas com a distribuição das funções metabólicas previstas pelo FAPROTAX também foram realizados no programa R, utilizando os pacotes Phyloseq, *ggplot2* e *vegan*.

4.3 Sequenciamento metagenômico dos consórcios microbianos

Um total de 5 consórcios microbianos foram selecionados para sequenciamento metagenômico, sendo eles: 685B1A e 686B3A, 684B1AN, 688B3AN, 683B3A. Estes consórcios foram selecionados com base nos resultados obtidos nas análises metataxonômicas realizadas.

As amostras de DNA total foram submetidas ao sequenciamento metagenômico *shotgun* utilizando o Kit Illumina DNAPrep (Illumina, San Diego, CA) e a plataforma NextSeq2x 100 p, gerando uma média de 50 milhões de clusters ou 100 milhões de *reads* pareadas.

4.3.1 Reconstrução de genomas microbianos usando reads metagenômicos: genomas montados em metagenoma (MAGs)

As amostras foram mantidas separadas para a montagem e recuperação dos MAGs, a fim de evitar a combinação de *contigs* de diferentes consórcios em um mesmo MAG. Todas as análises foram realizadas na plataforma online do Kbase (https://www.kbase.us/). Após a etapa de corte usando o *software* Trimmomatic v 0.36 (BOLGER;LOHSE; USADEL, 2014) o *software* MetaSPAdes v3.15.3 (NURK et al, 2017) foi usado para montagem metagenômica com comprimento mínimo de *contig*s de 2.000 pb.

A etapa de *binning* foi realizada usando três *softwares*: MaxBin2 v2.2.4 (WU et al, 2014), CONCOCT v1.1 (ALNEBERG et al, 2013) e MetaBAT2 v.2.3.0 (KANG et al, 2015). O passo seguinte consistiu em melhorar a qualidade do *binning* usando atribuições de consenso. Para isso, foi utilizado *o software* DAS-Tool v.1.0.7 (SIEBER et al, 2018) com o *output* dos *softwares* MaxBin2, MetaBAT2 e CONCOCT.

A qualidade dos *bins* foi analisada com o *software* CheckM v. 1.1.3 (PARKS et al., 2015), que se baseia na representação de conjuntos de genes marcadores específicos de linhagem. Os *bins* foram classificadas como *bins* de alta qualidade (>90% completo, <5% de contaminação), *bins* de qualidade média (>70% completo, <10% de contaminação),

bins de baixa qualidade (<50% completo e <10% contaminação), de acordo com os padrões de qualidade de MAGs sugeridos no trabalho de Bowers et al. (2017).

Todos os MAGs foram anotados taxonomicamente usando o *software* GTDB tk v.2.0.0 (PARKS et al, 2018), que é um kit de ferramentas de *software* para atribuir classificações taxonômicas objetivas à genomas microbianos. Ele foi projetado para trabalhar com avanços recentes que permitem centenas ou milhares de genomas montados em metagenoma (MAGs) obtidos diretamente de amostras ambientais. Também pode ser aplicado a genomas isolados e de célula única. A anotação dos *contigs* para a predição das regiões codificantes (CDSs) foi feita utilizando o banco de dados do RAST v1.073 (AZIZ et al., 2008), PATRIC (DAVIS et al., 2020) e do PGAP (TATUSOVA et al., 2016).

A anotação funcional dos MAGs foi realizada utilizando o banco de dados KEGG por meio do *software* DRAM (SHAFFER et al., 2020). Genes relacionados aos ciclos do metano, nitrogênio e enxofre foram selecionados para serem explorados durante as análises.

4.4.2 *Genômica comparativa entre os MAGs do gênero Methylomicrobium*

Dentre os MAGs recuperados, dois foram assinados taxonomicamente como pertencentes a grupos de bactérias metanotróficas, esses MAGs foram selecionados para análises genômicas comparativas com outros quatro genomas disponíveis no banco de dados do GenBank. Os números de acessos e o ambiente de origem de cada um dos genomas estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação dos genomas de referencia baixados do NCBI para análises comparativas com as MAGs recuperadas.

Número de Acesso	Genoma de Referência	Ambiente
NZ_JPOJ00000000.1	*Methylomicrobium agile*	Cultura pura
Z_CM001475.1	*Methylomicrobium album* BG8	Solo
NZ_AZUN00000000.1	*Methylomicrobium lacum* LW14	Aquático
NZ_CP024202.1	*Methylomicrobium sp. wino1*	Cultura de enriquecimento inoculada com sedimento marinho

As informações gerais sobre os genomas como tamanho, conteúdo GCe outro foram obtidas através da anotação dos mesmos e anotação de sequências de profagos nos genomas a ferramenta *online* PHASTER (ARNDT et al., 2016) foi utilizada.

Para realizar a comparação entre os MAGs e os genomas de referência foram utilizadas as ferramentas ANI (Identidade Média de Nucleotídeos), AAI (Identidade Média de Aminoácidos) e DDH (hibridização *in silico* DNA-DNA). O cálculo dos valores de ANI e AAI foi realizado no site "*Kostas Lab*" (http://enve-omics.ce.gatech.edu/g-matrix/) e o cálculo da distância do DDH foi realizado no site genoma a genoma (GGDC) (http://ggdc.dsmz.de/home.php).

A análise do pangenoma foi realizada com o *pipeline* do anvi'o v. 7 para realizar comparação entre os genomas de referência e os MAGs, identificar a região *core* e identificar *singletons*. A análise de filogenômica foi realizada através do *software Insert Genome Into SpeciesTree - v2.2.0* (disponível no Kbase), que permite a construção de uma árvore de espécies utilizando um conjunto de 49 genes *core* universais definidos por famílias de genes COG (*Clusters of Orthologous Groups*). Ele combina o(s) genoma(s) fornecido(s) pelo usuário com um conjunto de genomas relacionados que estão depositados na base de dados RefSeq do Kbase (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010).

Para determinar o conteúdo de genes únicos e compartilhados entre os genomas de microrganismos metanotróficos, *clusters* de genes ortólogos foram analisados utilizando o programa *OrthoVenn2* (XU et al, 2019). A anotação funcional dos 6 MAGs foi realizada utilizando o banco de dados do KEGG por meio do *software* DRAM (SHAFFER et al., 2020) na busca de vias metabólicas completas, comparação de genes de interesse e busca de genes de metanotrofia.

4.4 Isolamento de microrganismos a partir dos consórcios

4.4.1 Isolamento utilizando Ágar marinho

Para isolar bactérias heterotróficas marinhas dos consórcios o meio de cultura empregado foi o Ágar Marinho (Difco). O volume de 100 µl de cultura foi adicionado à placa e distribuído com alça de Drigalski flambada. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 48 hrs. Após a formação de colônias, as mesmas foram retiradas utilizando alça de platina flambada e esgotadas em novas placas de Petri contendo um

novo meio de cultura e foram novamente incubadas em temperatura ambiente por 48 hrs. Os microrganismos isolados que cresceram foram preservados em glicerol 50% e armazenados em freezer -20 ºC.

4.4.2 Isolamento utilizando a técnica de Roll tube

Para isolar microrganismos metanotróficos utilizando meio sólido, uma adaptação da técnica de *Roll tube* foi utilizada. 100 µL de cultura em meio líquido NMS foram transferidos para 10 mL de meio NMS sólido aquecido, ágar 1,5%, em frasco *Hungate* de 100 mL. Os frascos foram girados horizontalmente no gelo, até o meio solidificar na parede dos tubos, seguido do fechamento com batoques de butila, vedados com *parafilm* e selados com lacres de alumínio (HUNGATE, 1969).

A concentração de metano utilizada no headspcae to tubo foi determinado de acordo com as bactérias metanotróficas identificadas nos mesmos, seguindo a literatura descrita a seguir. Para os consórcios onde foram identificados metanotróficas do gênero *Methylomicrobium*, o *headspace* de metano foi preenchido com uma atmosfera 1:1 metano:ar e as culturas foram incubadas à 40 ºC (BRANTNER et al., 2000). Para o consórcio onde foi identificado *Methylomonas*, o *headspace* de metano foi preenchido com uma atmosfera 4:1 metano:ar e as culturas foram incubadas à 40 ºC (RAHALKAR et al, 2018). Para o consórcio onde foram identificados metanotróficas do gênero *Methylovulum*, o *headspace* de metano foi preenchido com uma atmosfera 4:1 metano:ar e as culturas foram incubadas à 20 ºC (MATEOS-RIVERA et al., 2018). Após 20 dias de incubação, as colônias desenvolvidas na parede do frasco foram coletadas com uma alça de platina, e transferidas para meio líquido NMS e incubadas a 20 °C.

4.4.2.1 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Dos isolados obtidos através da técnica de *Roll tube*, 6 isolados foram selecionados para a extração de DNA e identificação taxonômica molecular. O DNA das bactérias isoladas foi extraído utilizando o kit *Quick-dna fungal/bacterial miniprep kit - zymo research - d6005* de acordo com os protocolos do fabricante. Para obter o gene 16S rRNA o DNA foi amplificado por PCR utilizando os *primers* universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). A

PCR foi realizada utilizando Gotaq Mix Hot Start Master Mix segundo o protocolo do fabricante. Na reação, foram adicionados 0,25 µL de cada *primer* (10 µM) e 2 µL de DNA (a 10 ng) template. As condições de PCR para amplificação do DNA de interesse foram: temperatura de desnaturação inicial de 95°C, 3 min; seguida por 30 ciclos de 94°C, 1 min; 53°C, 30 segundos; 72°C, 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. O produto de PCR foi purificado utilizando o kit *DNA Clean and Concentrator* (Zymo Reserach), segundo as especificações do fabricante ea mesma foi confirmada através de gel de agarose e *Low Mass DNA Ladder* (Thermo Fisher). Após essa etapa, o mesmo foi enviado para sequenciamento do tipo Sanger em uma facility.

4.4.2.2 *Análise bioinformática dos isolados*

As *reads* obtidas após o sequenciamento (*forward* e *reverse*) foram avaliadas quanto a sua qualidade através do *software* FastQC (ANDREWS et al., 2010), foram trimadas e tiveram os *contigs* gerados através do *software Codoncode Aligner* (RICHTERICH, 2004). As sequencias foram submetidas ao BLASTn do NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para identificação e *dowload* das sequencias para o alinhamento. As melhores sequencias de referencia (com base em valores de identidade e *e-value*) foram baixadas do GenBank e foram incluídos apenas gêneros pertencentes à família Alcanivoricaceae, além do grupo externo (*Pseudomonas stutzeri*). Os números de acesso das mesmas estão contidos na Tabela 3.

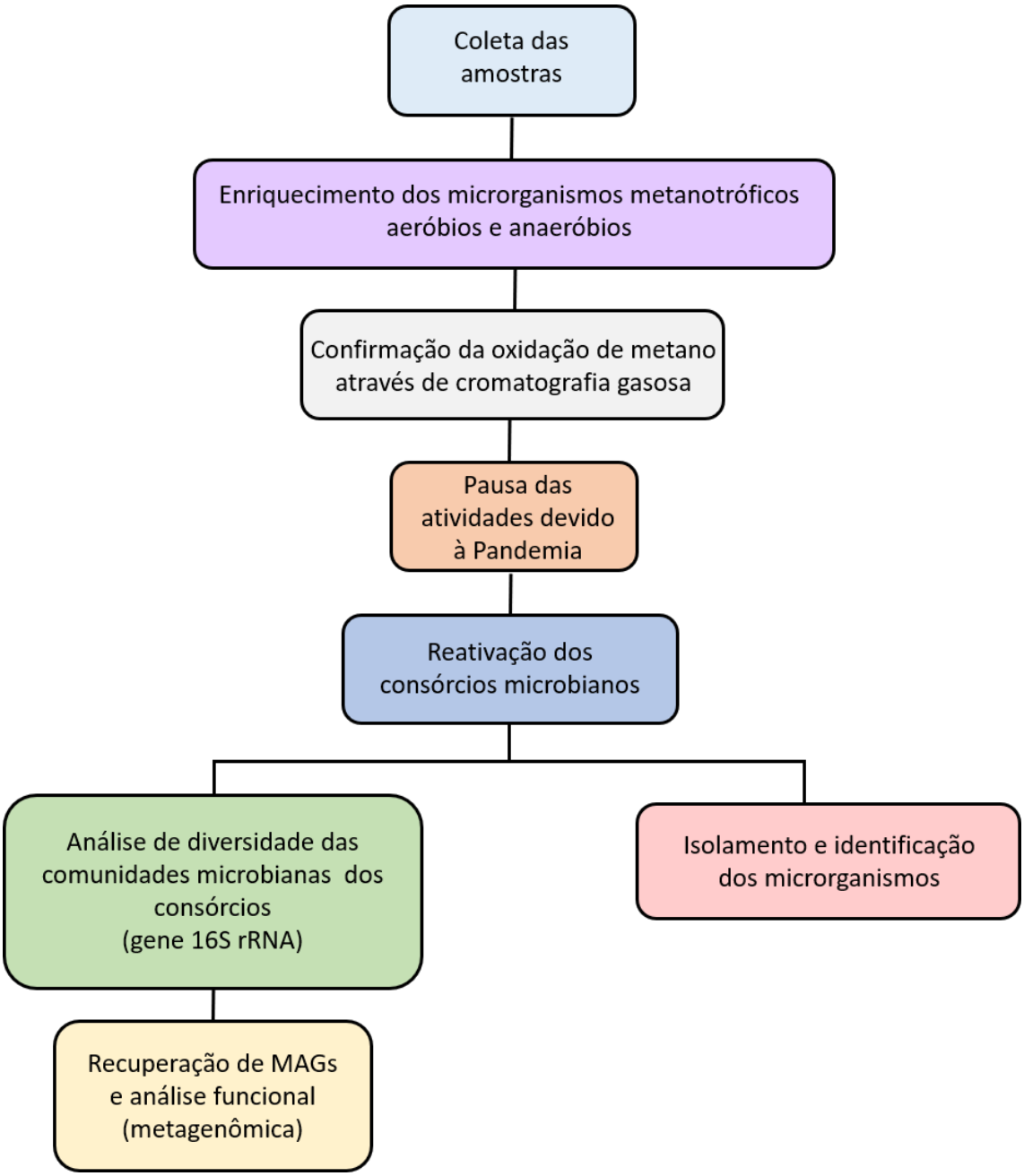
Tabela 3. Identificação das sequencias do gene 16S rRNA baixadas do banco de dados do Genbank para a construção da árvore filogenética com a sequencias de isolados sequenciados.

Taxonomia	Número de acesso
Alcanivorax balearicus strain MACL04	AY686709.1
Alcanivorax borkumensis	Y12579.1
Alcanivorax dieselolei strain B-5	AY683537.1
Alcanivorax dieselolei strain UVAD	KJ849833.1
Alcanivorax dieselolei strain S1025	MF139136.1
Alcanivorax sp. strain KX64203	KU954765.1
Alcanivorax gelatiniphagus strain MEBiC08158	JQ937289.1
Alcanivorax hongdengensis strain A-11-3	EU438901.2
Alcanivorax indicus strain SW127	MH279472.1
Alcanivorax marinus strain R8-12	KC415169.1
Alcanivorax nanhaiticus strain 19-m-6	KM453740.1
Alcanivorax pacificus W11-5	DQ659451.2

Alcanivorax sp. strain MT13131	MF187461.2
Alcanivorax venusti strain ISO4	AF328762.1
Alcanivorax xenomutans	HE601937.2
Kangiella japonica strain KMM 3899	NR_112923.1
Kangiella marina strain KM1	NR_109475.1
Kangiella profundi strain FT102	NR_136491.1
Kangiella sediminilitoris strain BB-Mw22	NR_109548.1
Ketobacter alkanivorans strain GI5	NR_164618.1
Ketobacter alkanivorans strain MT0-50	MW675213.1
Ketobacter nezhaii strain GYS_M3H	MN299327.1
Pseudomonas stutzeri ATCC 17588	AF094748.1

As sequencias foram alinhadas usando o alinhador MAFFT (KATOH & STANDLEY, 2016) usando os parâmetros default de alinhamento e a árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA foi gerada usando o teste de "*Neighbor-joining*". As distâncias genéticas para essas análises foram calculadas usando o modelo de dois parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980), e a análise usou 10000 de *bootstrap*. A árvore foi gerada utilizando o *software* MEGA v.11 (KUMAR, 2016).

Figura 9. Esquema representando de forma simplificada a metodologia de empregada neste trabalho.



5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA e análise bioinformática

Do total de 4.831.030 *reads* brutas, oriundas do sequenciamento dos 55 consórcios microbianos, foram mantidas 3.652.588 (75,6%) *reads* após o filtro de qualidade, apresentando uma amplitude de 90.326 ± 28.728 *reads* entre as amostras. Após o controle de qualidade, 384 ASVs foram geradas, com uma amplitude de 60 ± 28 entre as amostras (Tabela 4).

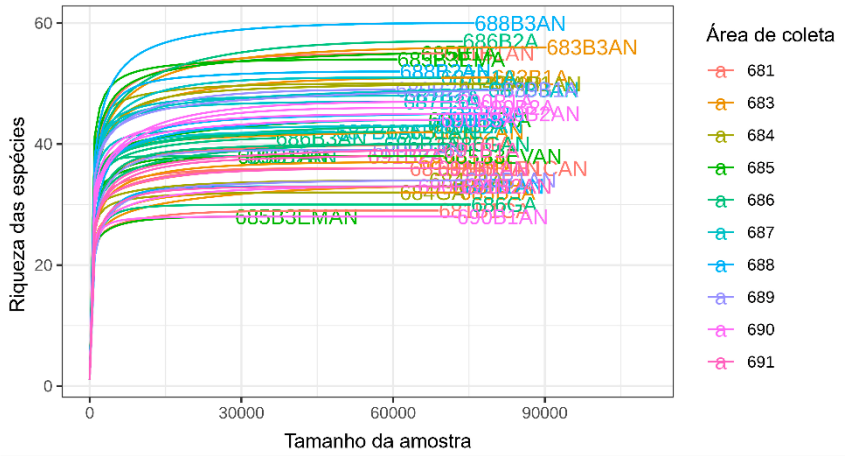
Tabela 4. Número de ASVs identificadas em cada um dos consórcios microbianos.

Amostra	Nº ASVs Observadas
681B1A	40
681B1AN	55
681B1CA	29
681B1CAN	36
681B2A	36
681B2AN	36
683B1A	51
683B1AN	37
683B2A	33
683B2AN	42
683B3A	32
683B3AN	56
684B1A	34
684B1AN	50
684GA	32
684GAN	50
685B1A	55
685B1AN	38
685B3EMA	54
685B3EMAN	28
685B3EVA	44
685B3EVAN	38
686B1A	43
686B1AN	42
686B2A	57
686B2AN	38
686B3A	40
686B3AN	41
686GA	30
686GAN	40
687B1A	51
687B1AN	42
687B2A	48

687B2AN	43
687B3A	47
687B3AN	49
688B1A	44
688B1AN	33
688B2AN	52
688B3A	45
688B3AN	60
689B1A	49
689B1AN	34
689B2A	49
689B2AN	39
690B1A	47
690B1AN	28
690B2A	46
690B2AN	45
690B3A	44
690B3AN	33
691B1A	39
691B1AN	36
691B2A	38
691B2AN	33

Todas as amostras que tiveram seu DNA sequenciado apresentaram platô na curva de rarefação (Figura 10), ou seja, o esforço amostral e de sequenciamento foram suficientes para representar os táxons presentes nos consórcios microbianos.

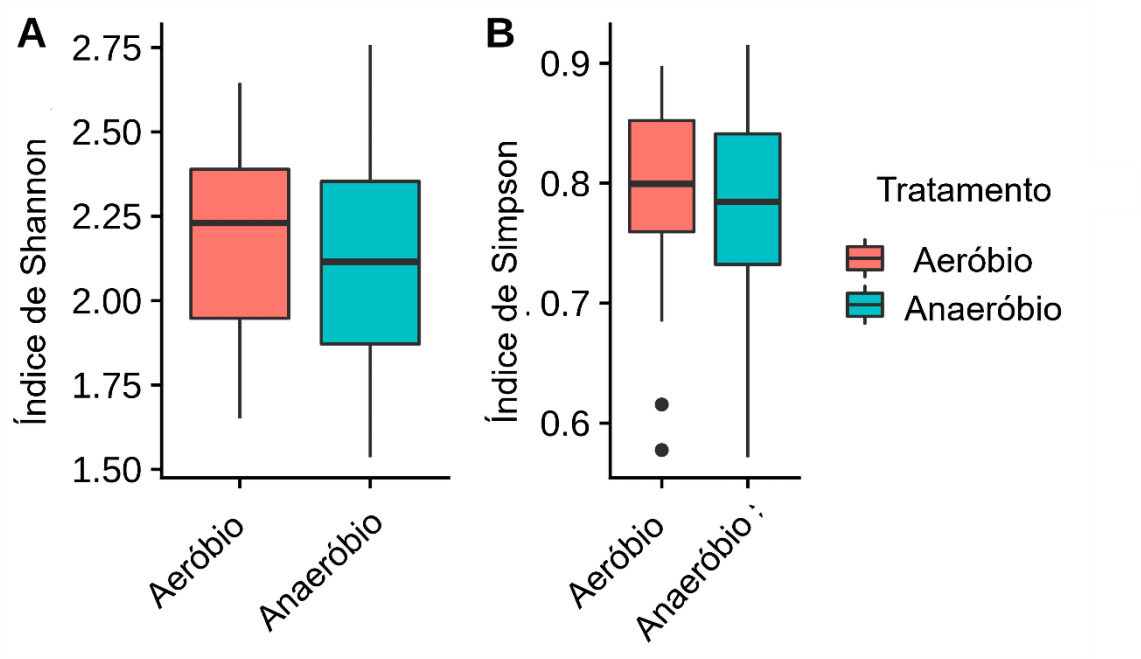
Figura 10. Curva de rarefação para todas amostras sequenciadas dos consórcios microbianos. Todas as amostras alcançaram um platô na curva, indicando esforço amostral suficiente para as análises. As cores indicam as diferentes estações de coleta das amostras. No eixo y está representada a riqueza de espécies e no eixo x o tamanho amostral.



5.4 Diversidade microbiana nos consórcios metanotróficos

Para explorar a diversidade alfa nos tratamentos aplicados aos consórcios (aerobiose e anaerobiose) foram utilizados os índices de Shannon e Simpson, sendo o índice de Shannon utilizado para enfatizar o componente de riqueza de espécies e o índice de Simpson utilizado para enfatizar o componente da equitabilidade, ou seja, a proporção dos indivíduos de cada uma das espécies presentes em uma comunidade em relação ao total de indivíduos desta mesma comunidade (NAGRENDRA, 2002).

Figura 11. Índices de Simpson e Shannon para os tratamentos aplicados nos consórcios. Utilizando o teste de Kruskal-Wallis, o p = 0.53, ou seja, não há diferença significativa na comparação da diversidade alfa dos tratamentos aeróbio e anaeróbio.



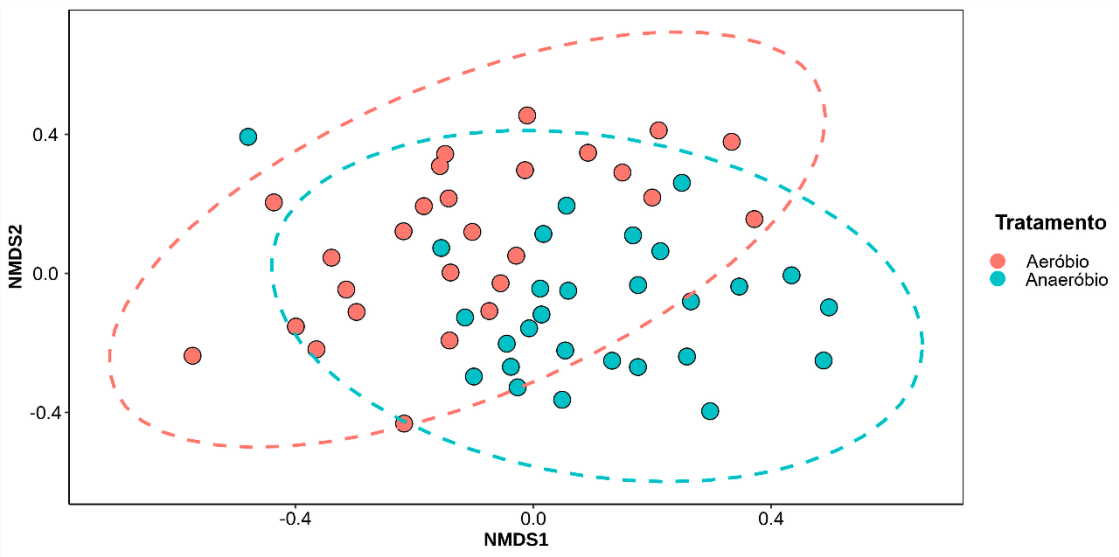
Os tratamentos apresentaram valores de índices de Shannon e Simpson bem próximos (Figura 11 e Tabela 5), indicando que não há uma diferença significativa entre a riqueza das espécies (p = 0,53) e nem na proporção de ocorrência de cada espécie (p = 0,53). Esse já era um resultado esperado, visto que o meio de cultura utilizado para o crescimento microbiano é mínimo, ou seja, altamente seletivo para grupos microbianos associados ao metano.

Tabela 5. Valores de Shannon e Simpson, por amostra, para as culturas aeróbias e anaeróbias.

Aeróbias			**Anaeróbias**		
Amostra	*Shannon*	*Simpson*	*Amostra*	*Shannon*	*Simpson*
681B1A	1.830974	0.723566	**681B1AN**	2.344082	0.815813
681B1CA	1.912588	0.763772	**681B1CAN**	1.640053	0.574944
681B2A	1.98288	0.754875	**681B2AN**	1.81923	0.74877
683B1A	2.38996	0.83213	**683B1AN**	1.53103	0.569364
683B2A	2.424681	0.875452	**683B2AN**	1.870781	0.728134
683B3A	1.933726	0.729706	**683B3AN**	2.000382	0.722901
684B1A	2.576767	0.897203	**684B1AN**	2.176977	0.792099
684GA	2.345583	0.860046	**684GAN**	2.682358	0.8733
685B1A	2.652182	0.88591	**685B1AN**	2.080875	0.761722
685B3EMA	2.248892	0.781573	**685B3EMAN**	1.921413	0.758025
685B3EVA	2.307763	0.80203	**685B3EVAN**	2.530303	0.893706
686B1A	1.815604	0.703482	**686B1AN**	2.123871	0.761834
686B2A	2.422364	0.855379	**686B2AN**	2.092272	0.776768
686B3A	2.190403	0.831649	**686B3AN**	1.913572	0.759575
686GA	1.688259	0.683451	**686GAN**	2.047279	0.803465
687B1A	2.536935	0.881005	**687B1AN**	2.292561	0.820691
687B2A	2.642726	0.897233	**687B2AN**	2.244234	0.809776
687B3A	2.369809	0.846744	**687B3AN**	2.601546	0.86218
688B1A	2.36668	0.84987	**688B1AN**	1.763494	0.73235
688B3A	2.135702	0.821664	**688B2AN**	2.758853	0.91548
689B1A	2.392481	0.831283	**688B3AN**	2.664531	0.892049
689B2A	2.227322	0.775695	**689B1AN**	1.744684	0.699637
690B1A	1.666027	0.581911	**689B2AN**	2.181877	0.835459
690B2A	1.715883	0.614852	**690B1AN**	2.365345	0.876094
690B3A	2.059475	0.773798	**690B2AN**	2.274309	0.833814
691B1A	1.947299	0.77681	**690B3AN**	2.433902	0.885791
691B2A	1.992291	0.781672	**691B1AN**	1.879762	0.716267
			691B2AN	1.554243	0.588911

Para explorar a diversidade beta foi utilizado o índice de Bray-Curtis, que consiste em uma métrica de similaridade ou dissimilaridade (distância) na abundância das espécies. Em qualquer um dos casos seus valores vão do máximo de um ao mínimo de zero. Utilizou-se o Escalonamento Multidimensional não-métrico (nMDS) para representar graficamente a dissimilaridade entre os tratamentos (Figura 12).

Figura 12. Diversidade beta utilizando o índice de Bray-Curtis, plotado através do Escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) para representar graficamente a dissimilaridade entre os tratamentos aeróbio e anaeróbio.

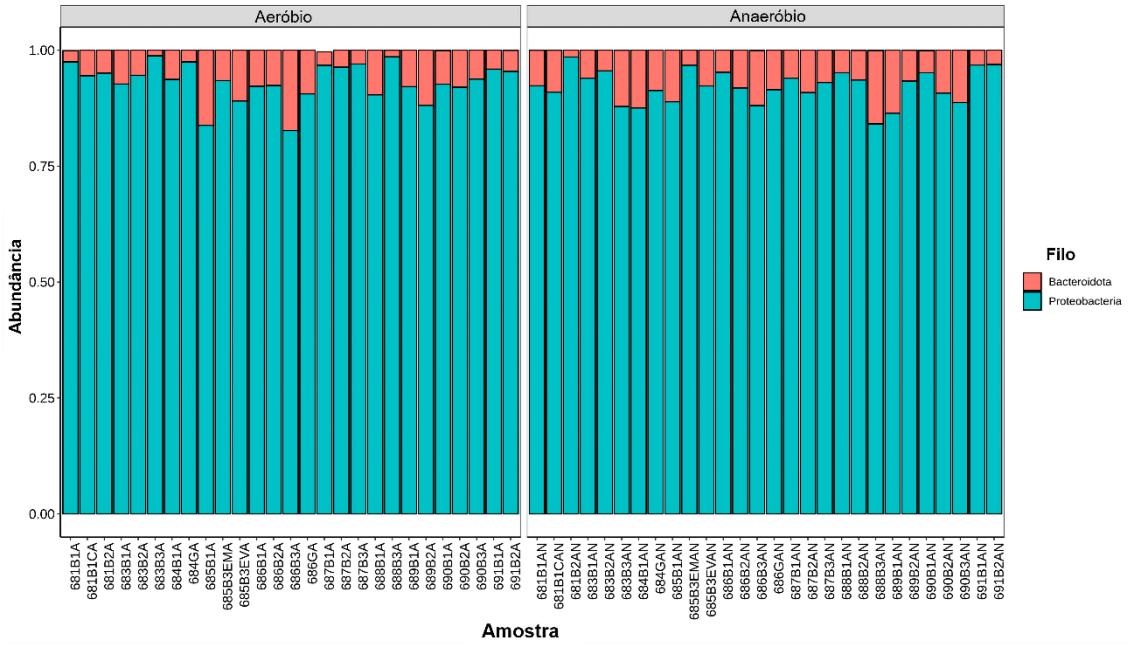


Através da análise da diversidade Beta usando a métrica de Bray-Curtis foi possível identificar que as amostras são dissimilares quando falamos do tratamento aplicado às culturas. A dissimilaridade foi testada quanto à sua significância estatística através de uma PERMANOVA. A composição microbiana das culturas aeróbias apresentou diferença significativa ($p = 0,001$) em relação à composição microbiana das culturas anaeróbias, indicando que o tratamento aplicado foi responsável por gerar uma variação na composição das comunidades microbianas que cresceram nos consórcios.

5.5 Composição taxonômica dos consórcios e abundância diferencial

A composição microbiana dos consórcios foi composta majoritariamente pelo filo Proteobacteria (92,6%), acompanhados dos filos Bacteroidota (7,29%) e Firmicutes, Actinobacteriota e Bdelovibrionota somando menos de 1% da abundância dos Filos. A baixa diversidade de Filos e maior abundância de Proteobacteria, que é o grupo que compreende a maior parte das bactérias metanotróficas relacionadas ao metano, destaca o sucesso em cultivar *in vitro* o grupo-alvo do estudo. A composição dos Filos para cada uma das culturas está ilustrada na Figura 13.

Figura 13. Abundâncias relativas de Filos identificados nos consórcios com base na metataxonomia dos consórcios microbianos aeróbios e anaeróbios. As cores representam os 2 diferentes Filos identificados. No eixo y está plotada a abundância dos Filos e no eixo x a identificação de cada consórcio microbiano. Gráfico plotado apenas com os grupos que apresentaram abundâcia > 1%.



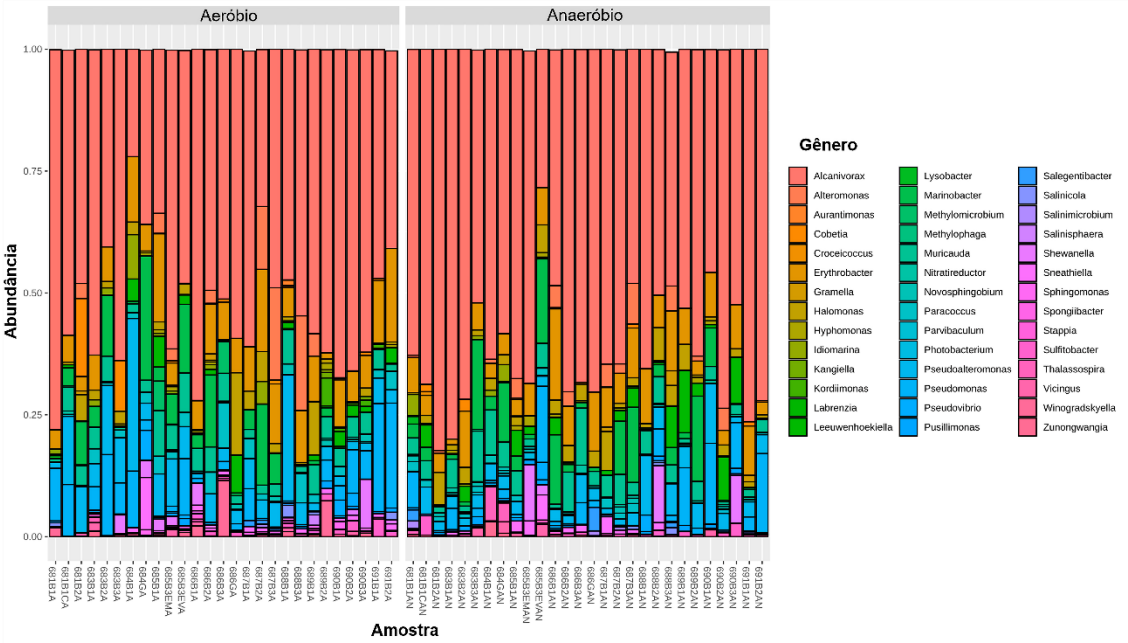
O Filo Proteobacteria é um dos mais diversos do Domínio Bactéria, estando presentes na maioria dos ecossistemas da Terra, incluindo o mar profundo (HUBER et al., 2007). Nessas regiões esse grupo bacteriano é um dos maiores responsáveis pela manutenção do ciclo do carbono através da produção primária associada à oxidação do enxofre e do metano (SWAN et al., 2011), bem como a heterotrofia (ARÍSTEGUI, et al., 2009).

O filo Bacteroidetes também é um dos grupos bacterianos mais abundantes em ecossistemas aquáticos, contribuindo com cerca de 4% a 22% do total de bactérias em diferentes ecossistemas marinhos (ACINAS et al., 2015), tendo destaque por apresentar grupos bacterianos envolvidos no processamento de matéria orgânica em todo o oceano.

Analisando níveis taxonômicos mais específicos, como o de gênero (Figura 14), foi possível identificar três diferentes bactérias oxidadoras de metano, sendo eles *Methylomicrobium*, *Methylomonas* e *Methylovulum*, além de bactérias conhecidas como metilotróficas e que podem realizar o processo de oxidação aeróbia do metano facultativamente, sendo eles, *Methylobacterium e Methylophaga* (DEDYSH; DUNFIELD; TROTSENKO, 2004; ANTONY et al., 2012).

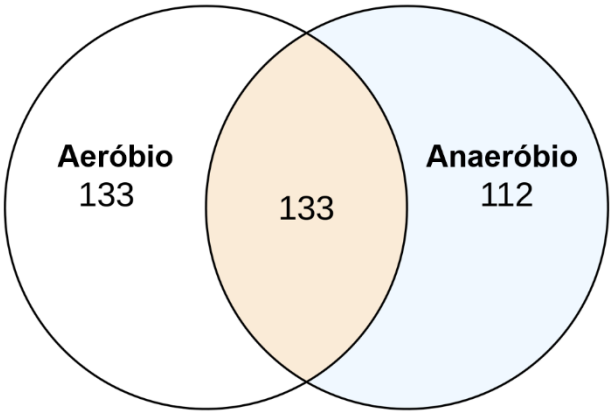
Um gênero bacteriano que apresentou destaque por ter sido identificado em todos os consórcios, em maior abundância, foi *Alcanivorax*, grupo pertencente ao Filo Proteobacteria. São bactérias hidrocarbonoclásticas obrigatórias devido à sua preferência em metabolizar hidrocarbonetos e derivados de petróleo bruto (YAKIMOV et al., 2019). Estes organismos possuem a capacidade de se multiplicar rapidamente e se tornarem os mais abundantes em ecossistemas impactados, como por exemplo derramamentos de óleo (KASAI et al., 2002).

Figura 14. Abundâncias relativas dos gêneros representativos com base na metataxonomia dos consórcios microbianos cultivados em aerobiose e anaerobiose. As cores representam os diferentes gêneros identificados nos consórcios. No eixo y está plotada a abundância dos Filos e no eixo x a identificação de cada consórcio microbiano.



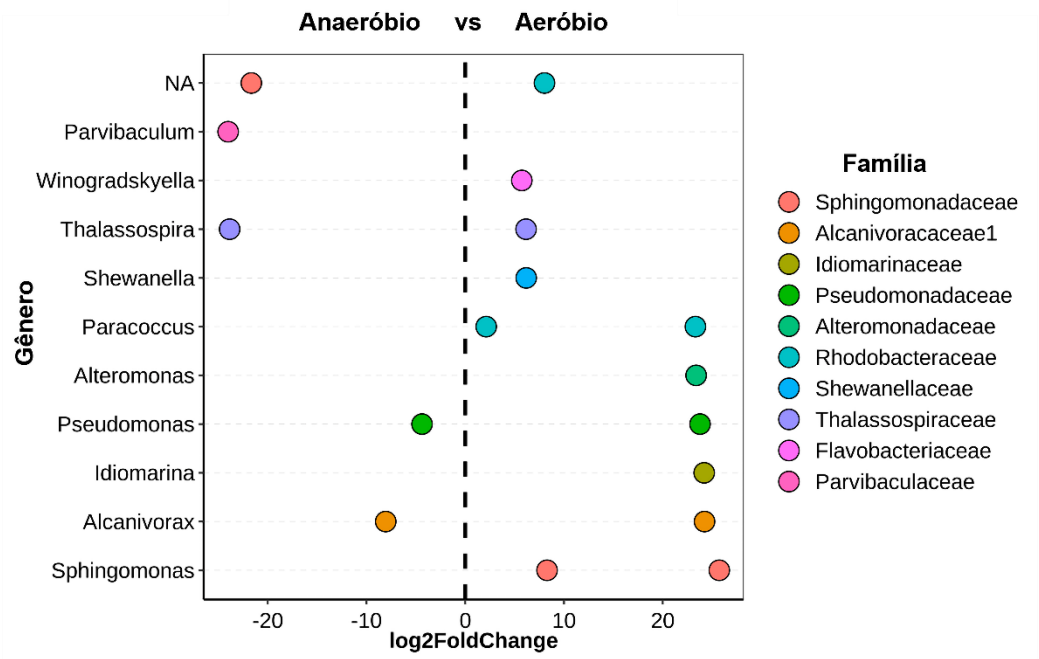
A distribuição dos grupos microbianos, apesar de não apresentarem diferenças em sua diversidade alfa, apresentaram variação quanto à diversidade beta, ou seja, há diferença na composição microbiana presente nos diferentes tipos de cultura. As culturas aeróbias apresentaram 133 ASVs exclusivas, enquanto as culturas anaeróbias apresentaram 112 ASVs exclusivas e 133 compartilhadas entre todos os consórcios (Figura 15).

Figura 15. Diagrama de Venn representando as ASVs exclusivas dos consórcios aeróbios, anaeróbios e as compartilhadas entre os dois tratamentos.



Utilizando a abordagem de abundância diferencial, foi possível identificar quais grupos microbianos estavam diferencialmente presentes ou abundantes nos consórcios. Um total de 10 gêneros foram identificados como abundantes diferencialmente (p>0,05) nos tratamentos aplicados, sendo os gêneros *Thalassospira*, *Pseudomonas* e *Alcanivorax* encontrados nos dois tratamentos, porém, com diferentes abundâncias (Figura 16).

Figura 16. Abundância diferencial entre os resultados de 16S rRNA dos consórcios incubados em meio NMS em condições aeróbias e anaeróbias para identificação de grupos microbianos abundantes ou diferencialmente presentes nos consórcios. As diferentes cores dos círculos representam as Famílias diferencialmente abundantes entre os dois tratamentos. No eixo y estão representados os Gêneros microbianos identificados nos consórcios e no eixo x a razão logarítmica dos valores diferencialmente expressões entre os dois diferentes tratamentos.



O gênero *Parvibaculum* foi identificado apenas nas culturas anaeróbias, e são um grupo interessante que, anteriormente, já foi isolado de fluídos de fontes hidrotermais e contempla bactérias oxidantes de alcanos (ROSARIO-PASSAPERA et al., 2012). Os gêneros *Winogradskyella*, *Shewanella*, *Paracoccus*, *Alteromonas*, *Idiomarina* e *Shingomonas* foram identificados, exclusivamente, nos consórcios aeróbios. Dois desses gêneros se destacam por suas capacidades metabólicas, sendo eles *Shewanella* e *Paracoccus*.

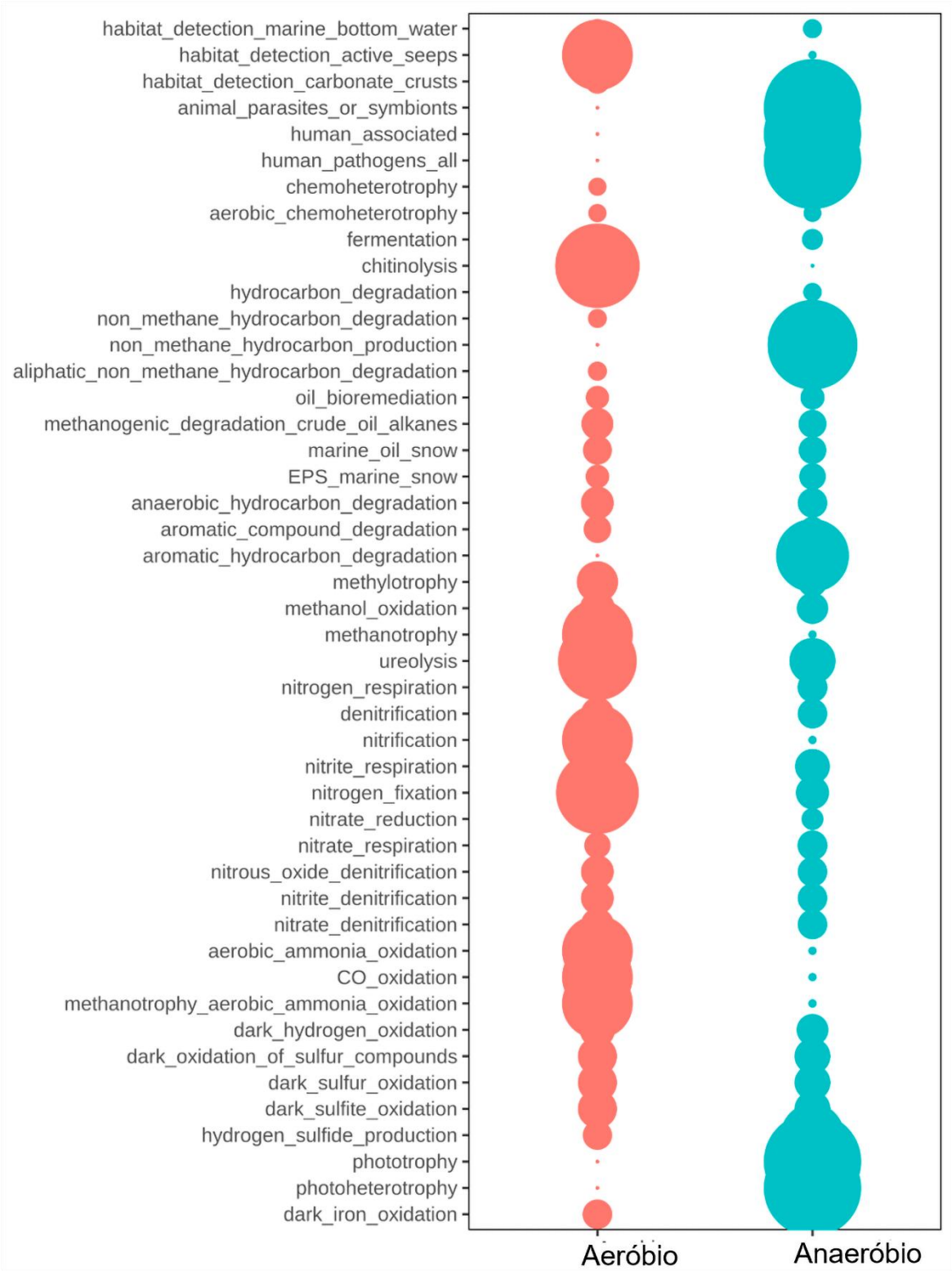
As bactérias do gênero *Shewanella*, atualmente são conhecidas como heterotróficos e podem utilizar uma variedade de outros aceptores de elétrons para a respiração, incluindo tiossulfato, sulfito ou enxofre elementar (BURNS; DICHRISTINA, 2009), bem como fumarato (PINCHUK et al., 2011). Alguns membros desse gênero, como a espécie *Shewanella oneidensis*, têm a capacidade de utilizar diversos metais como aceptores de elétrons, como manganês, cromo, urânio e ferro (TIEDJE, 2002).

A característica metabólica que caracteriza o gênero *Paracoccus* é a capacidade de converter nitrato em nitrogênio molecular que algumas espécies possuem. Além disso, a maioria das espécies pode usar nitrato e seus produtos de redução como aceptor de elétrons alternativo ao oxigênio durante o crescimento respiratório anaeróbio. As características unificadoras das espécies incluem um modo de crescimento obrigatoriamente respiratório e o uso de ribulose bifosfato carboxilase / oxigenase para fixar carbono durante o crescimento metilotrófico ou quimiolitotrófico (KATAYAMA; HIRAISHI; KURAISHI, 1995; BAKER et al., 1998).

5.5.1 Inferência funcional utilizando o FAPROTAX

Na análise de predição metabólica funcional a partir do gene 16S rRNA, foi possível identificar que os metabolismos identificados variaram de acordo com o tratamento aplicado aos consórcios microbianos (Figura 17). Consórcios aeróbios, se destacaram pela presença de metabolismos relacionados à processos fermentativos, degradação de hidrocarbonetos, metanotrofia, ureólise, processos relacionados ao ciclo do nitrogênio, como desnitrificação, nitrificação, fixação de nitrogênio, redução de nitrato, assim como oxidação aeróbia de amônia. Consórcios anaeróbios, se destacaram pela presença de metabolismos relacionados à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, quimioheterotrofia e metilotrofia.

Figura 17. Inferência funcional realizada utilizando o gene 16S rRNA e o banco de dados do *software* FAPROTAX para avaliar as possíveis funções metabólicas que se destacam nos consórcios microbianos. Os círculos em rosa representam os consórcios aeróbios e os círculos em azul representam os consórcios anaeróbios. O tamanho dos círculos é determinado pela quantidade de ASVs atribuídas a determinado grupo funcional analisado.



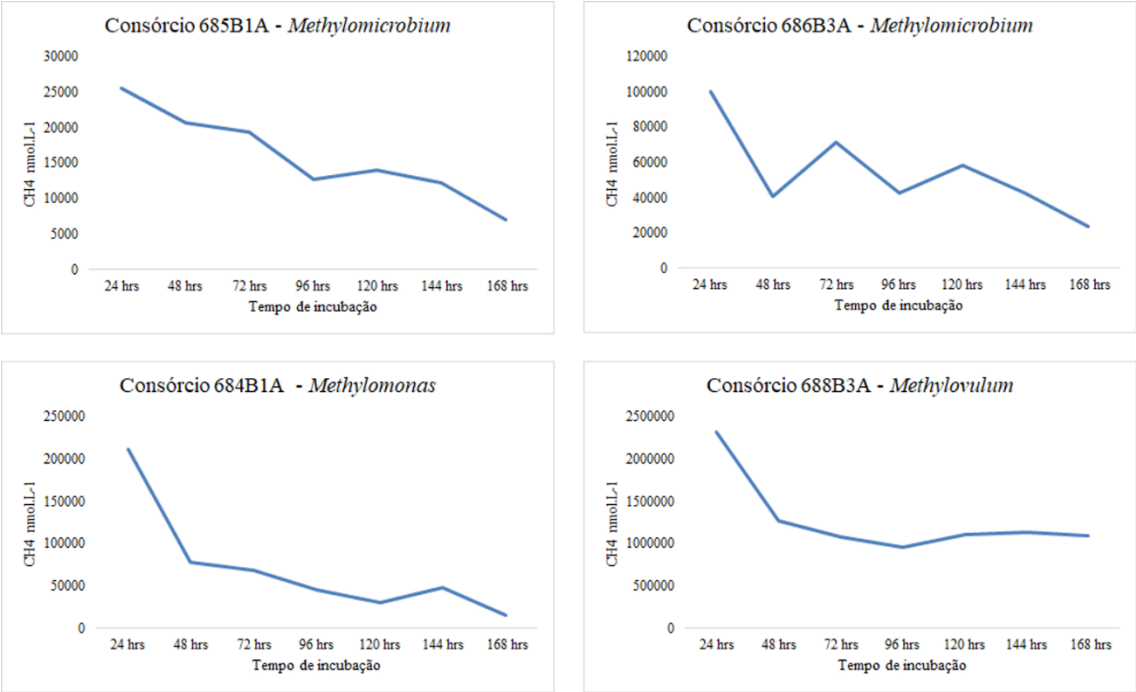
5.6 Cromatografia gasosa

Todos os consórcios apresentaram consumo do gás metano em 1 semana, tempo este que foi definido para a reposição do gás de todos os consórcios, visto que o metano era a única fonte de carbono disponibilizada para os microrganismos. Todas as curvas de metano estão apresentadas no anexo deste trabalho e apenas os consórcios onde bactérias metanotróficas foram detectadas estão destacadas na Figura 18.

A pandemia afetou significativamente os experimentos de cromatografia gasosa, pois algumas amostras que foram armazenadas para posterior quantificação de metano foram perdidas devido a impossibilidade de acessar a universidade. As amostras perdidas estão indicadas com asteriscos nos gráficos contidos no anexo.

A cromatografia foi utilizada para avaliar se a única fonte de carbono que estava sendo disponibilizada para nos consórcios com meio mínimo estava sendo utilizada. Nos consórcios onde foram identificadas bactérias oxidadoras de metano (Figura 18), o consumo do CH_4 variou bastante, porém, houve consumo no período de uma semana.

Figura 18. Cromatografia gasosa mostrando o consumo de gás metano durante uma semana de medição em quatro consórcios microbianos. No eixo y está plotada a concentração de metano em nmol.L -1 e no eixo x o tempo de incubação do consórcio com o gás metano em horas.



5.7 Metagenomas dos consórcios enriquecidos com microrganismos metanotróficos

5.6.1 Montagem e recuperação de MAGs

Os consórcios 685B1A e 686B3A, ambos da área 2 de incubação aeróbia, foram selecionados para o sequenciamento metagenômico pois através da análise metataxonômica doi possível identificar previamente a presença do gênero de bactéria metanotrófica *Methylomicrobium*; o consórcio 684B1AN, da área 1 de incubação anaeróbia, onde foi possível identificar o gênero *Methylomonas*; o consórcio 688B3AN também da área 2 de incubação anaeróbica, onde foi possível identificar o gênero *Methylovulum*, e o consórcio 683B3A, pois a análise metataxonômica realizada anteriormente revelou o enriquecimento de microrganismos que possuem metabolismos capazes de utilizar diferentes aceptores de elétrons para a respiração e envolvidos em diferentes processos ecológicos.

Após o sequenciamento dos cinco metagenomas individualmente, 355540109 reads foram geradas no total, o valor de reads geradas por amostra pode ser visto na Tabela 6, bem como o resultado das reads mantidas após a filtragem por qualidade.

Tabela 6. Valores totais de reads geradas, por amostras, após o sequenciamento metageômico e após a filtragem por qualidade (processamento).

Amostras	Nº total de reads	Nº de reads pós filtragem
685B1A	65017782	64297341
686B3A	74157411	73376395
684B1AN	65894265	65079769
688B3AN	74383372	73515119
683B3A	76087279	75106427

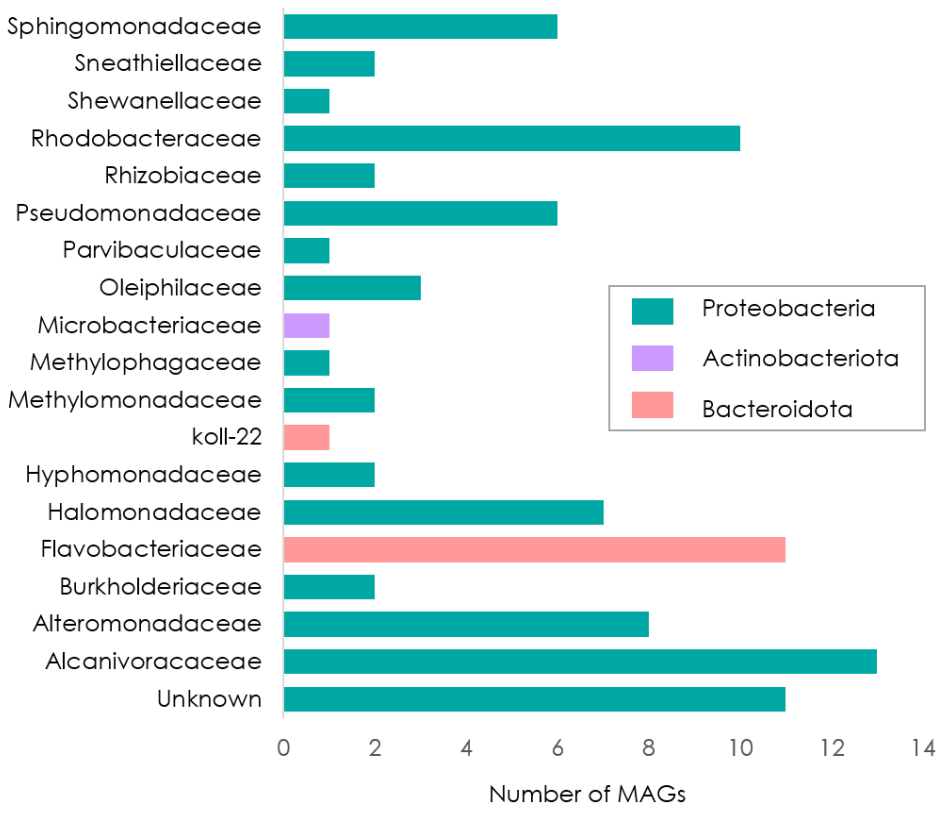
O resultado obtido após a montagem revelou que o número de *contigs* variou entre 2053 e 6159, o percentual de conteúdo de GC variou de 51,63% a 56,65% e os valores de L50 e N50 variaram de 102 a 408 e 151495 a 46552, respectivamente. Todos os parâmetros analisados na avaliação da montagem estão registrados na Tabela 7.

Tabela 7. Qualidade dos contigs montados com metaSPAdes. (Todas as estatísticas são baseadas em contigs de tamanho >=500 pb).

Amostras	Número de contigs	Tamanho total (pb)	Maior contig (pb)	Conteúdo GC (%)	N50	L50
685B1A	5595	105525954	810464	51.63	58167	408
686B3A	3525	79133215	1120593	56.36	96857	172
684B1AN	6159	87859964	765301	56.65	46552	346
688B3AN	4708	91733532	1885074	54.97	97869	190
683B3A	2053	61374229	1011355	56.34	151495	102

Obtivemos o total de 90 MAGs, sendo estes 78 MAGs de alta qualidade, 8 MAGs de qualidade média e 4 MAGs de baixa qualidade (Tabela 8). A anotação taxonômica revelou a presença de 18 famílias do Domínio Bacteria (Figura 19), distribuídas em 3 Filos diferentes (Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria). 74 MAGs foram assinadas taxonomicamente como pertencentes ao Filo Proteobacteria, seguidas de 14 do Filo Bacteroidota e uma do Fila Actinobacteriota, distribuídas nas classes Gammaproteobacteria (46 MAGs), Alphaproteobacteria (27 MAGs), Bacteroidia (13 MAGs) e Actinobacteria (1 MAG).

Figura 19. Classificação taxonômica geral dos MAGs em níveis de filo e família. O Filo Proteobacteria está representado em turquesa, o filo Actinobacteriota em lilás e o Bacteroidota em rosa.



Treze MAGs foram classificados como pertencentes à família Alcanivocaceae, todos do gênero *Alcanivorax* sp. (Figura 19), grupo associado a um interessante potencial enzimático, capaz de degradar hidrocarbonetos e poliéster (Zadjelovic et al, 2020). Este resultado é interessante visto que a região de coleta das amostras (sedimento associado à carbonatos) contemplam áreas de reservatório e exploração de óleo, o que torna favorável a presença e diversidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.

Dois MAGs taxonomicamente atribuídos ao gênero *Methylomicrobium* sp. foram recuperados dos consórcios microbianos. Este grupo microbiano é de interesse por ser classificado como halotolerante, alcalifílico e metanotrófico obrigatório. Atualmente, na base de dados do Genbank, sendo apenas seis genomas desse gênero foram depositados, apenas um de origem marinha, associada ao sedimento de mar profundo, e nenhum associado à ambientes carbonáticos marinhos, como os encontrados neste trabalho, o que destaca a importância de explorar cada vez mais esses genomas. As informações sobre os MAGs de *Methylomicrobium* recuperados dos consórcios estão contidas na Figura 22 e na Tabela 9.

Tabela 8. Identificação das MAGs recuperadas a partir do sequenciamento metagenômico. Estão contidas informações acerca da qualidade, contaminação, completude e classificação taxonômica a partir do bando de dados GTDB-tk.

						Classificação Taxonômica - GTDB						
Consórcio	**MAG_ID**	**Bin**	**Qual.**	**Comp. %**	**Cont. %**	**Dominio**	**Filo**	**Classe**	**Ordem**	**Familia**	**Gênero**	**Espécie**
683B3A	MAG_00001	bin.001	high	99.14	0.44	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Cobetia	Cobetia amphilecti
683B3A	MAG_00002	bin.002	high	99.92	11.26	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Shewanellaceae	Shewanella	Shewanella sp001957125
683B3A	MAG_00003	bin.003	high	100	0.41	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter	Erythrobacter_A sp001635685
683B3A	MAG_00004	bin.004	high	99.5	0.66	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda	Muricauda sp010468565
683B3A	MAG_00005	bin.005	high	98.51	0.19	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax xenomutans
683B3A	MAG_00006	bin.006	high	99.53	1.01	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_A stutzeri_O
683B3A	MAG_00007	bin.007	high	100	0.91	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Hyphomonas	Hyphomonas sp000682735
683B3A	MAG_00008	bin.008	high	99.43	1.32	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas aquamarina
683B3A	MAG_00009	bin.009	high	99.39	9.77	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	Paracoccus sp002294185
683B3A	MAG_00010	bin.010	high	95.54	0.37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax sp900107995
683B3A	MAG_00011	bin.011	high	99.16	0.23	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Pseudoalteromonas	Pseudoalteromonas lipolytica
683B3A	MAG_00012	bin.012	high	99.67	0.75	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter	Erythrobacter_A sp002695185
683B3A	MAG_00013	bin.013	high	95.58	0.14	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas_A sp003205815
683B3A	MAG_00014	bin.014	high	98.14	0.37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax sp002354605
684B1AN	MAG_00015	bin.001	high	99.67	0.66	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda	Muricauda sp010468565
684B1AN	MAG_00016	bin.002	low	54.86	2.02	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Nitratireductor	Nitratireductor sp002697745
684B1AN	MAG_00017	bin.003	high	100	0.19	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax xenomutans
684B1AN	MAG_00018	bin.004	high	98.31	0	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	Paracoccus sp002294185
684B1AN	MAG_00019	bin.005	high	97.09	0.98	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas aquamarina
684B1AN	MAG_00020	bin.006	high	100	0	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	koll-22	UBA5081	UBA5081 sp002415785
684B1AN	MAG_00021	bin.007	high	98.51	6.85	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium	Novosphingobium indicum
684B1AN	MAG_00022	bin.008	high	98.58	0	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Pusillimonas	Pusillimonas_A maritima
684B1AN	MAG_00023	bin.009	high	99.57	0.76	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter_A	Erythrobacter_A sp002895025
684B1AN	MAG_00024	bin.010	high	99.57	1.2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Oleiphilaceae	Marinobacter	Marinobacter_A sp002717955

684B1AN	MAG_00025	bin.011	high	91.34	6.95	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Idiomarina	Idiomarina loihiensis
684B1AN	MAG_00026	bin.012	medium	73.38	0.79	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Halomonas_C	Halomonas_C zincidurans
684B1AN	MAG_00027	bin.013	low	56.56	1.53	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	CAU-1492	CAU-1492 sp002210165
684B1AN	MAG_00028	bin.014	high	95.56	1.51	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Nitrosococcales	Methylophagaceae	Methylophaga	Methylophaga sp002696735
684B1AN	MAG_00029	bin.015	high	99.16	0.23	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Pseudoalteromonas	Pseudoalteromonas lipolytica
684B1AN	MAG_00030	bin.016	high	99.59	0.96	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas_A	Pseudomonas_A sp003205815
684B1AN	MAG_00031	bin.017	high	99.57	0	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Parvibaculales	Parvibaculaceae	Parvibaculum	Parvibaculum sp002480495
685B1A	MAG_00032	bin.001	high	96.76	0.93	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax xenomutans
685B1A	MAG_00033	bin.002	high	95.36	0.72	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Winogradskyella	Winogradskyella sp002682935
685B1A	MAG_00034	bin.003	high	99.62	0.29	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Leeuwenhoekiella	Leeuwenhoekiella blandensis
685B1A	MAG_00035	bin.004	high	96.89	1.41	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Alteromonas	Alteromonas mediterranea
685B1A	MAG_00036	bin.005	high	95.68	0.05	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Vicingaceae	UBA5081	UBA5081 sp002415785
685B1A	MAG_00037	bin.006	high	91.19	0.04	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Pusillimonas_A	Pusillimonas_A
685B1A	MAG_00038	bin.007	high	99.68	1.56	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Hyphomonas	-
685B1A	MAG_00039	bin.008	high	98.91	0.55	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter_A	Erythrobacter_Asp002895025
685B1A	MAG_00040	bin.009	high	99.39	0.73	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	Paracoccus sp002294185
685B1A	MAG_00041	bin.010	high	99.37	0.37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	-
685B1A	MAG_00042	bin.011	high	99.34	2.57	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda	Muricauda beolgyonensis
685B1A	MAG_00043	bin.012	high	99.49	3.12	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Idiomarina	Idiomarina baltica
685B1A	**MAG_00044**	**bin.013**	**high**	**99.25**	**2.53**	**Bacteria**	**Proteobacteria**	**Gammaproteobacteria**	**Methylococcales**	**Methylomonadaceae**	**Methylomicrobium_A**	**-**
685B1A	MAG_00045	bin.014	medium	80.49	0.14	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas aquamarina
685B1A	MAG_00046	bin.015	high	98.6	1.16	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Oleiphilaceae	Marinobacter	Marinobacter salarius
685B1A	MAG_00047	bin.016	low	54.32	1.6	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas_A	-

685B1A	MAG_00048	bin.017	high	94.91	0.51	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Alteromonas	Alteromonas macleodii
685B1A	MAG_00049	bin.018	high	98.26	0.43	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sneathiellales	Sneathiellaceae	Sneathiella	Sneathiella sp002694385
685B1A	MAG_00050	bin.019	medium	89.28	3.84	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax sp002354605
685B1A	MAG_00051	bin.020	high	99.93	0.35	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter	Erythrobacter_A citreus
686B3A	MAG_00052	bin.001	high	93.24	3.05	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Nitratireductor	Nitratireductor sp002697745
686B3A	MAG_00053	bin.002	medium	86.36	0.37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax sp900107995
686B3A	MAG_00054	bin.003	high	98.68	0.34	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter_A	Erythrobacter_A sp002895025
686B3A	MAG_00055	bin.004	high	97.98	0.64	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	CAU-1492	CAU-1492 sp002210165
686B3A	MAG_00056	bin.005	high	100	0.96	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas_A	Pseudomonas_A sp003205815
686B3A	MAG_00057	bin.006	high	100	0.19	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax xenomutans
686B3A	MAG_00058	bin.007	high	99.34	2.24	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda	Muricauda beolgyonensis
686B3A	MAG_00059	bin.008	high	99.01	0.17	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Winogradskyella	Winogradskyella sp002682935
686B3A	**MAG_00060**	**bin.009**	**high**	**98.91**	**2.53**	**Bacteria**	**Proteobacteria**	**Gammaproteobacteria**	**Methylococcales**	**Methylomonadaceae**	**Methylomicrobium_A**	**-**
686B3A	MAG_00061	bin.010	high	99.39	0.08	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus	Paracoccus sp002294185
686B3A	MAG_00062	bin.011	medium	85.29	0	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax sp002354605
686B3A	MAG_00063	bin.012	high	97.54	0.08	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Sulfitobacter	Sulfitobacter sp002731875
686B3A	MAG_00064	bin.013	high	98.66	0.3	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Brevirhabdus	-
686B3A	MAG_00065	bin.014	high	99.49	0.23	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Pseudoalteromonas	Pseudoalteromonas lipolytica
686B3A	MAG_00066	bin.015	high	98.99	2.75	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda	-
686B3A	MAG_00067	bin.016	high	99.58	0.79	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Stappiaceae	Stappia	Stappia sp003610575
686B3A	MAG_00068	bin.017	high	99.57	0.43	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sneathiellales	Sneathiellaceae	Sneathiella	Sneathiella sp002694385

686B3A	MAG_00069	bin.018	medium	81.65	0.93	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Cobetia	Cobetia amphilecti
688B3AN	MAG_00070	bin.001	high	98.94	0.69	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	CAU-1492	CAU-1492 sp002210165
688B3AN	MAG_00071	bin.002	high	98.71	0.46	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Halomonas	Halomonas aquamarina
688B3AN	MAG_00072	bin.003	high	99.67	0.66	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Muricauda	Muricauda sp010468565
688B3AN	MAG_00073	bin.004	medium	71.23	1.42	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Pusillimonas	Pusillimonas_A maritima
688B3AN	MAG_00074	bin.005	high	99.16	0.23	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Pseudoalteromonas	Pseudoalteromonas lipolytica
688B3AN	MAG_00075	bin.006	high	99.62	0.54	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Leeuwenhoekiella	Leeuwenhoekiella palythoae
688B3AN	MAG_00076	bin.007	high	98.88	0.93	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax xenomutans
688B3AN	MAG_00077	bin.008	high	100	0.09	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Oleiphilaceae	Marinobacter	Marinobacter hydrocarbonoclasticus
688B3AN	MAG_00078	bin.009	high	95.62	0.73	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Salegentibacter	Salegentibacter mishustinae
688B3AN	MAG_00079	bin.010	high	99.78	0.52	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas_D	Pseudomonas_D aestusnigri
688B3AN	MAG_00080	bin.011	high	99.11	3.59	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	-
688B3AN	MAG_00081	bin.012	high	99.9	0.63	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Brevirhabdus	-
688B3AN	MAG_00082	bin.013	high	98.57	0.51	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Lysinimonas	Lysinimonas_A sp002325245
688B3AN	MAG_00083	bin.014	high	100	1.22	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Alteromonas	Alteromonas macleodii
688B3AN	MAG_00084	bin.015	high	99.47	0.57	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Alteromonas	-
688B3AN	MAG_00085	bin.016	high	99.62	0.38	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Gramella	-
688B3AN	MAG_00086	bin.017	high	98.92	0.43	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Halomonadaceae	Salinicola	Salinicola lusitanus
688B3AN	MAG_00087	bin.018	high	99.82	0.41	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Erythrobacter	Erythrobacter_A citreus
688B3AN	MAG_00088	bin.019	low	53.16	0.16	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Sulfitobacter	Sulfitobacter sp001634775
688B3AN	MAG_00089	bin.020	high	97.77	0.56	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivorax sp002354605
688B3AN	MAG_00090	bin.021	medium	84.29	4.75	Bacteria	Proteobacteria	Alphproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Nitratireductor	Nitratireductor sp002697745

5.6.2. Anotação Funcional das MAGs

A anotação funcional das MAGs teve como objetivo obter um panorama metabólico das MAGs recuperdas tanto da área de coleta 1 (cadeia de montes carbonáticos Tupana) quando da área de coleta 2 (cadeia de montes carbonáticos Alpha Crucis) visto que o DRAM utiliza o *software* Prodigal para detectar quadros de leitura abertos (ORFs), prever suas sequências de aminoácidos e, em seguida, pesquisa todas essas sequências em vários bancos de dados, fornecendo assim todas as ocorrências do banco de dados em um único arquivo de saída.

Genes marcadores relacionados à metanotrofia (*pmo*) foram identificados em *Bins* taxonomicamente sinalizados como pertencentes ao gênero *Methylomicrobium* somente na área 2, referente à cadeia de montes carbonáticos Alpha Crucis. Este gênero é conhecido por oxidar metano aerobiamente a metanol, usando o complexo enzimático do metano monooxigenase (pMMO). Primeiro o metano é convertido em metanol e depois metabolizado através da via RuMP para produção de piruvato para crescimento celular (HU et al., 2020). Não foram identificados genes marcadores para a metanogênese (*mmo*) em nenhum dos MAGs recuperados em nenhuma das duas áreas. Porém, foram identificados genes associados à conversão de CO_2 em metano e na conversão de acetado em CH_4 nas MAGs recuperadas em ambas as áreas. As MAGs associadas a esses processos pertencem aos gêneros *Methylophaga*, *Shewanella*, *Cobetia*, *Halomonas* e *Alcanivorax*, entre outros (Figuras 20 e 21). A conversão de trimetilamina em dimetilamina também foi um processo identificado e está associada aos gêneros *Paracoccus*, *Nitratireductor* e *Pseudoceanicola* (Figura 20 e 21).

Com relação ao metabolismo do nitrogênio *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Sneathiella*, *Pseudoalteromonas*, Rhizobiales e *Marinobacter* apresentaram genes relacionados à conversão de nitrato em nitrito. Também foram detectados genes associados a conversão de óxido nítrico em óxido nitroso em alguns gêneros como *Alcanivorax, Methylophaga, Marinobacter, Pseudomonas* e *Alteromonas*. Genes associados à oxidação de nitrito em nitrato também foram identificados, em especial nos grupos *Alteromonas*, UBA5081 e *Muricauda*.

Figura 20. Presença de genes relacionados aos ciclos do metano, nitrogênio e enxofre, e genes redutase nos MAGs da Área 1. No eixo y estão representadas as MAGs e no eixo x os módulos metabólicos analizados.

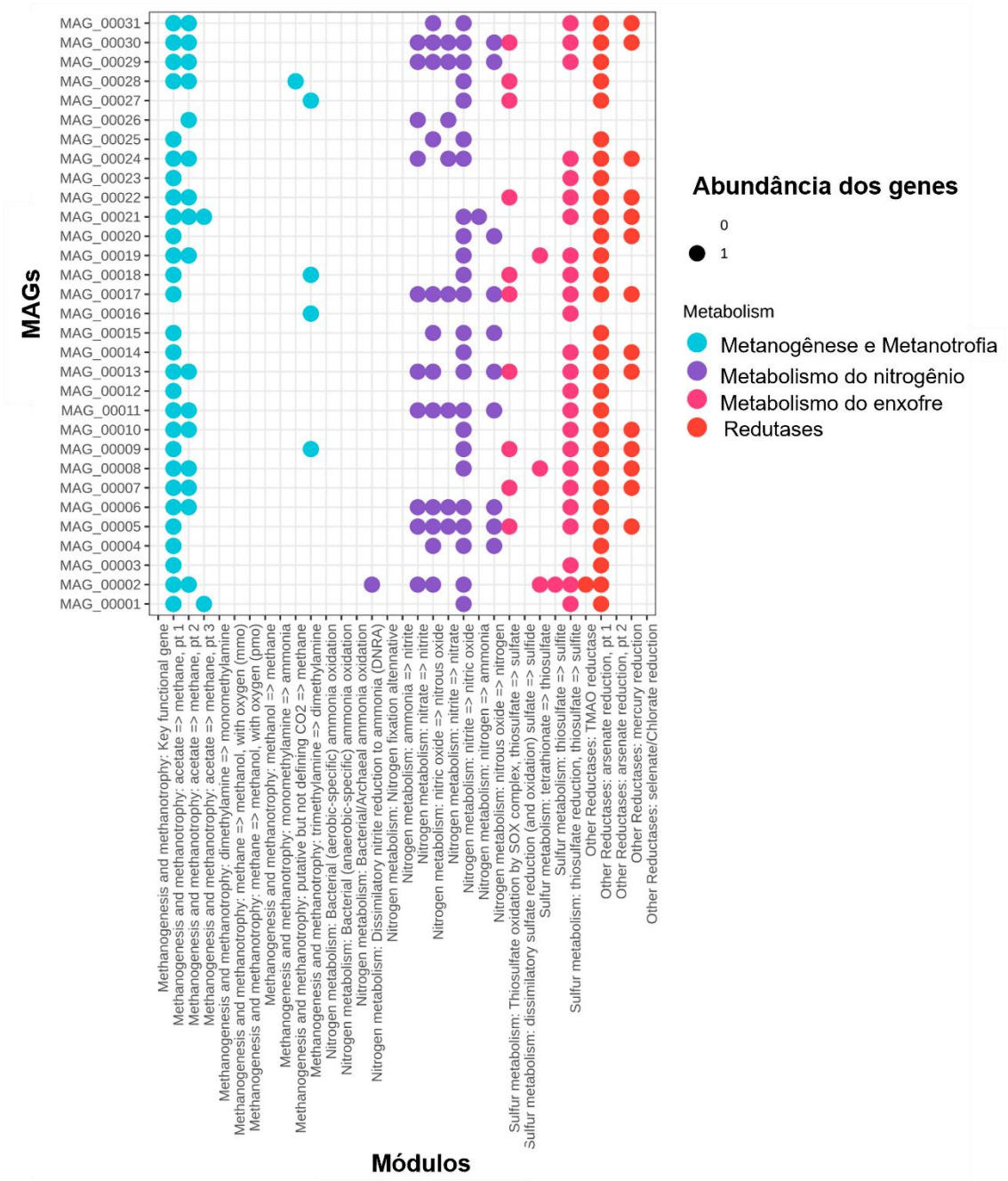
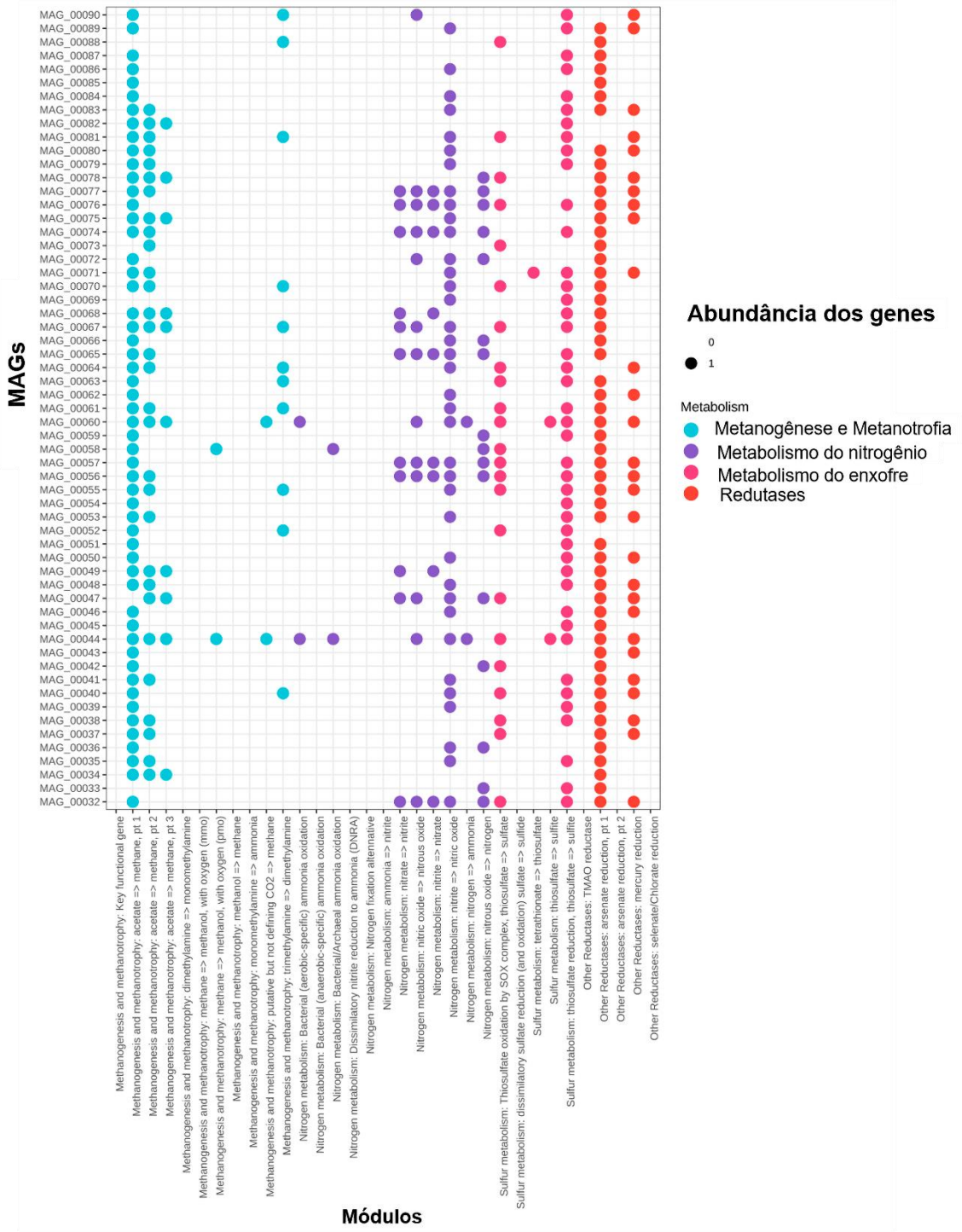


Figura 21. Presença de genes relacionados aos ciclos do metano, nitrogênio e enxofre, e genes redutase nos MAGs da Área 2. No eixo y estão representadas as MAGs e no eixo x os módulos metabólicos analizados.



No metabolismo do enxofre, os grupos *Alcanivorax*, *Hyphomonas*, Gammaproteobacteria, *Paracoccus*, *Muricauda* e Nitratireductor apresentaram genes associados à oxidação do tiossulfato (Figuras 20 e 21). Também foram identificados genes para conversão de tetrationato em tiossulfato em MAGs dos grupos *Halomonas*, *Shewanella*, *Paracoccus* e *Pseudomonas*.

Além de metabolismos centrais como os do carbono, nitrogênio e enxofre, também foram encontrados alguns genes correspondentes a redutases, ou seja, enzimas que catalisam reações de redução. Dentre aos genes identificados, destacam-se redutases que atuam na redução de compostos como arsenato, mercúrio e selenato/clorato. Dentre os grupos que possuem esses genes estão *Cobetia*, *Shewanella*, *Erythrobacter*, *Muricauda*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Hyphomonas* e *Halomonas*.

5.6.2 Análise genômica dos MAGs de Methylomicrobium sp.

Durante o enriquecimento com metano dos consórcios, organismos metanotróficos foram enriquecidos com sucesso e, a partir da metodologia de incubar sedimento marinho de mar profundo em meio mínimo em uma atmosfera enriquecida com metano e ar atmosférico. As amostras bem sucedidas no enriquecimento e recuperação de MAGs associadas a grupos de microorganismo associados à metanotofia foram referentes aos pontos de coleta 685 e 686, ambos localizados na região do monte carbonático Alpha Crucis.

Esta região foi descrita pela primeira vez no trabalho de Maly et al. (2019), localizado no talude superior do Oceano Atlântico Sudoeste, Bacia de Santos, margem sul do Brasil, com base na interpretação da batimetria multifeixe e dados sísmicos de alta resolução. Esta é a primeira megaestrutura carbonática descrita ao longo da margem da região do Atlântico Sudoeste e indica-se que a estrutura está conectada com gigantescos reservatórios de hidrocarbonetos (JACKSON et al., 2014). Esses reservatórios estariam constantemente extravasando fluidos e gases ricos em hidrocarbonetos e os dados acústicos sugerem a presença de chaminés de gás e atividade de infiltração recente (provavelmente metano) (MALY et al., 2019).

Essas informações acerca das características dos montes carbonáticos justificariam a presença desses microrganismos no sedimento associado aos carbonatos e indicam que os mesmos podem desempenhar um papel ecológico importante nessa região, atuando

como integrantes da microbiota local capazes de oxidar parte dos fluidos ricos em hidrocarbonetos que possivelmente sejam enriquecidos com metano na região do monte Alpha Crucis.

De 75 MAGs recuperadas e classificadas como de alta qualidade, duas foram classificadas taxonomicamente como pertencentes ao gênero *Methylomicrobium* sp. (Tabela 8) e foram denominadas como *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 (MAG_00060) e *Methylomicrobium* sp. LECOM 002 (MAG_00044).

5.6.2.1 Características genômicas gerais

Ambas as MAGs apresentaram alto valor de completude, sendo 98.91% correspondente à *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 99.25% à *Methylomicrobium* sp. LECOM 002 e baixos valores de contaminação 2.53% e 2.5% respectivamente, segundo Bowers et al. (2017) que classifica MAGs de alta qualidade como aqueles que apresentam completudes > 90% e valores de contaminação < 5% (Tabela 9).

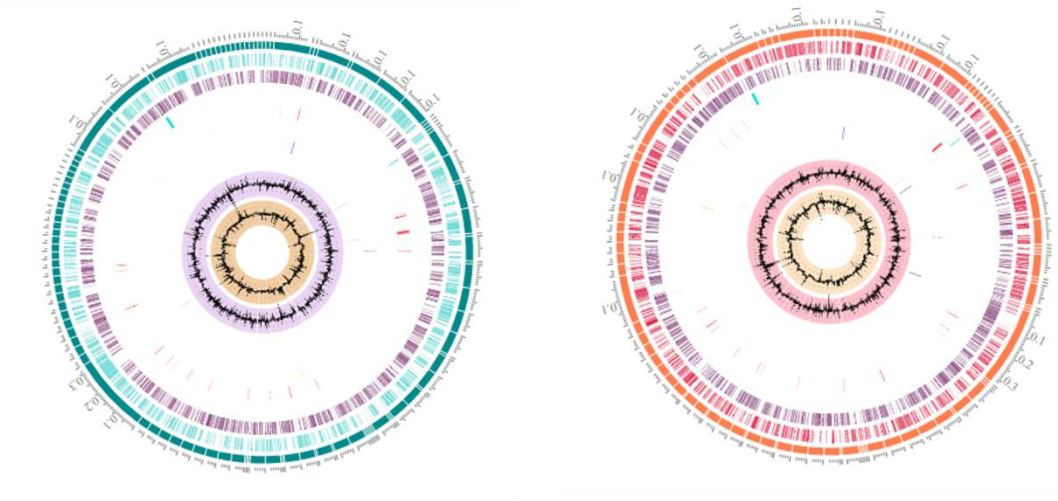
Tabela 9. Características do genoma de *Methylomicrobium* sp. cepas LECOM 001 e LECOM002.

Características	**Cromossomo**	**Cromossomo**
Taxonomia	*Methylomicrobium sp.* LECOM 001	*Methylomicrobium sp.* LECOM002
Número de contigs	112	100
L50	18	19
N50 (pb)	91203	77223
Completude	98.91%	99.25%
Contaminação	2.53%	2.5%
Conteúdo GC	48.31%	48.2%
Tamanho estimado do cromossomo (pb)	5020519	5027165
Genes codificantes de proteínas (CDS)	5084	5109
Número de proteínas hipotéticas	2183	2206
RNAs t	38	39

CRISPR repetidores	278	278
CRISPR espaçadores	276	276
Fagos	1	1

Os genomas recuperados são cromossomos circulares (Figura 22) de 5020519 pb e (LECOM 001) e 5027165 pb (LECOM 002), com um teor de 48.31% e 48.2% de conteúdo GC, respectivamente (Tabela 9). Esses valores foram parecidos quando comparados com o conteúdo GC de outros genomas do mesmo gênero, como 48,6% de *Methylomicrobium* sp. wino1, e das cepas de referência *M. alcaliphilum* 20ZT (48,8%) e *M. buryatense* 5G (48,7%), por exemplo (YU et al, 2018).

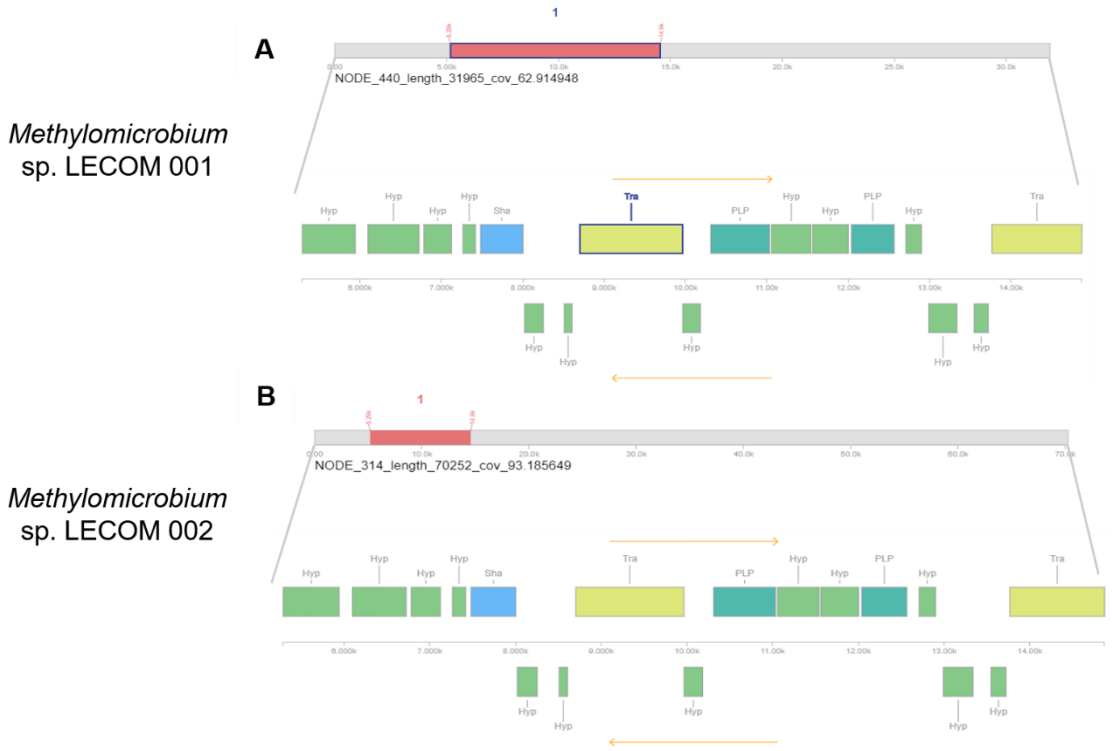
Figura 22. Imagem circular dos MAGs do gênero *Methylomicrobium* recuperados a partir do Metagenoma. Os círculos centrais indicam o conteúdo GC dos genomas e os mais externos as CDSs anotadas e os contigs, respectivamente.



MAG 60 – *Methylomicrobium* LECOM 001 **MAG 44 – *Methylomicrobium* LECOM 002**

Através da anotação, foi previsto um total de 5084 CDSs (Conding DNA sequences ou Regiões codificantes de DNA) correspondente à *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 5109 CDSs à *Methylomicrobium* sp. LECOM 002. As proteínas hipotéticas anotadas totatlizaram 2183 e 2206, respectivamente (Tabela 9), representando uma alta taxa de CDSs que ainda são desconhecidas, não foram exploradas e nem depositadas em bancos de dados de proteínas, gerando um *gap* no conhecimento acerca do conteúdo genético desses microrganismos de mar profundo que ainda são pouco amostrados e pouco estudados.

Figura 23. Resultado do PHASTER para os MAGs de *Methylomicrobium sp.* LECOM 001 (A) e LECOM 002 (B). A primeira figura indica a posição em que o cluster foi identificado e as informações acerca do contig em que foi identificado e tamanho. A segunda imagem representa uma descrição detalhada dos genes identificados nos clusters de profagos identificados.



A análise do PHASTER para a identificação de clusters de profagos nos genomas foi bem sucedida para ambos. No MAG LECOM 001 foi identificada uma região de profago incompleta, no *contig* 440, com 9583 pb (iniciando na base 5290 e terminando na base 14873) com conteúdo GC de 52.59% (Figura 23 A). No MAG LECOM 002 foi identificada também uma região de profago incompleta, no *contig* 314, com 9583 pb (iniciando na base 5290 e terminando na base 14873) com conteúdo GC de 52.58% (Figura 23 B).

Ambas as regiões são compostas por muitas CDSs correspondentes a proteínas hipotéticas, porém, foram identificadas 2 CDSs anotadas como correspondentes a uma tranposase com 1262 pb em ambos os MAGs (e-value: 2.42e-36) e outra com 1106 pb (e-value: 1.41e-23). Também foram identificadas duas regiões correspondentes às proteínas de ligação de fagos (PLP-phage link protein) uma com 722 pb (e-value: 1.29e-38) e outra com 527 pb (e-value: 4.14e-07). Uma proteína de cauda (SHA) contendo 524 pb (e-value: 8.43e-22) também foi identificada em ambos os *clusters*.

5.6.3 Análises comparativas com os genomas de Methylomicrobium sp.

Com as novas metodologias de sequenciamento metagenômico e recuperação de MAGs surge também a necessidade uma definição de espécie genômica para esses genomas recém descobertos, como é neste caso. A taxonomia genômica consiste em análises comparativas entre os genomas de interesse e os genomas de referência, através de análises como análise de árvores filogenômicas, identidade média de aminoácidos (AAI), identidade média de nucleotídeos (ANI), assinaturas genômicas, análises metabólicas, análise do genoma central e pangenomas (THOMPSON et al. 2013).

Tendo em vista essa abordagem comparativa, os genomas de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 foram comparados quanto ao ANI, AII e DDH com os genomas de referência disponíveis no GenBank e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de DDH (hibridização *in silico* DNA-DNA), ANI (identidade média de nucleotídeos) e AAI (identidade média de aminoácidos) comparando as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank.

		Methylomicrobium sp. LECOM 001			*Methylomicrobium sp.* LECOM002		
Acess Number	**Reference genome**	**DDH (%)**	**ANI (%)**	**AAI (%)**	**DDH (%)**	**ANI (%)**	**AAI (%)**
NZ_JPOJ00000000.1	*Methylomicrobium agile*	17.40	75.0	61.63	17.60	74.96	61.62
Z_CM001475.1	*Methylomicrobium album* BG8	17.30	75.17	61.74	17.60	75.25	61.73
NZ_AZUN00000000.1	*Methylomicrobium lacum* LW14	18.40	75.54	61.79	18.70	75.48	61.79
NZ_CP024202.1	*Methylomicrobium sp. wino1*	49.80	92.63	92.94	66.50	92.65	93.0
	Methylomicrobium sp. LECOM002	100	100	99.97	-	-	-
	Methylomicrobium sp. LECOM 001	-	-	-	100	100	99.97

Organismos considerados pertencentes à mesma espécie microbiana compartilham > 95% de identidade média de nucleotídeos (ANI), > 95% de identidade

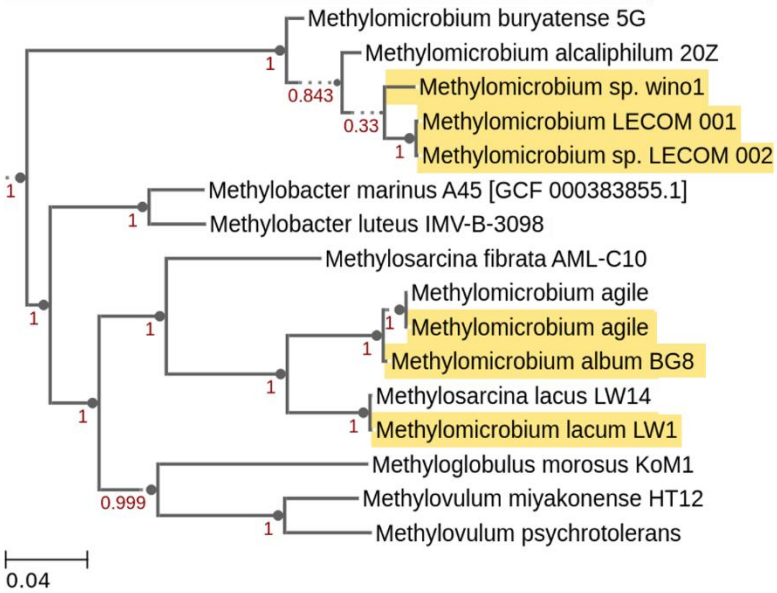
média de aminoácidos (AAI) e > 70% de semelhança (*in silico*) de hibridização genoma-para-genoma (DDH) (RODRIGUEZ-R & KONSTANTINIDIS, 2014).

As MAGs recuperadas em nossos enriquecimentos apresentaram valores de DDH inferiores 70% quando comparadas om todas os genomas de referencia e obtiveram 100% de DDH na comparação entre elas, indicando que, provavelmente LECOM 001 e 002 pertencem a mesma espécie. Quanto aos valores de ANI, nenhum genoma obteve valor >95% de ANI quando comparado com nossas MAGs, o que mais se aproximou foi o da *Methylomicrobium* sp. wino1 com 92.63 de ANI quando comparado com a LECOM 001 e 92.65 de ANI quando comparado com a LECOM 002. Este resultado é interessante pois o genoma de *Methylomicrobium* sp. wino1 foi uma MAG recuperada através do sequenciamento metagenômico de enriquecimentos metanotróficos de sedimento marinho, coletados na Coréia e, neste trabalho, os autores sugerem que esta seja uma nova espécie marinha de *Methylomicrobium* sp. (YU et al., 2018). Os valores de AAI também foram inferiores a 95% em todas as comparações feitas com os genomas de referência.

Esses dados sugerem que as MAGs recuperadas em nossos enriquecimentos sejam espécies novas do gênero *Methylomicrobium* sp., com semelhanças genômicas com a MAG recuperada de ambiente marinho, mas ainda assim, apresentando características únicas. São os primeiros registros de MAGs desse gênero recuperadas a partir de enriquecimento em regiões de montes carbonáticos de mar profundo.

A análise de filogenômica indicou que as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 formaram um clado consistente com 100 de *bootstrap* com outras 3 MAGs do mesmo gênero, com destaque para *Methylomicrobium* sp. wino1 e *Methylomicrobium* alcaliphilum 20Z (VUILLEUMIER et al., 2012) que são MAGs que foram recuperados a partir de sedimento marinho e são encontradas em ambientes com alta salinidade (Figura 24). Essa análise reforça as semelhanças genômicas entre ambas as MAGs (LECOM 001 e 002) e delas com a *Methylomicrobium* sp. wino1, a MAG que foi encontrada em um mesmo ambiente e também não tem espécie definida até o momento.

Figura 24. Análise filogenômica contendo as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank. Organismos marcados em amarelo foram selecionados e adicionados manualmente à análise.

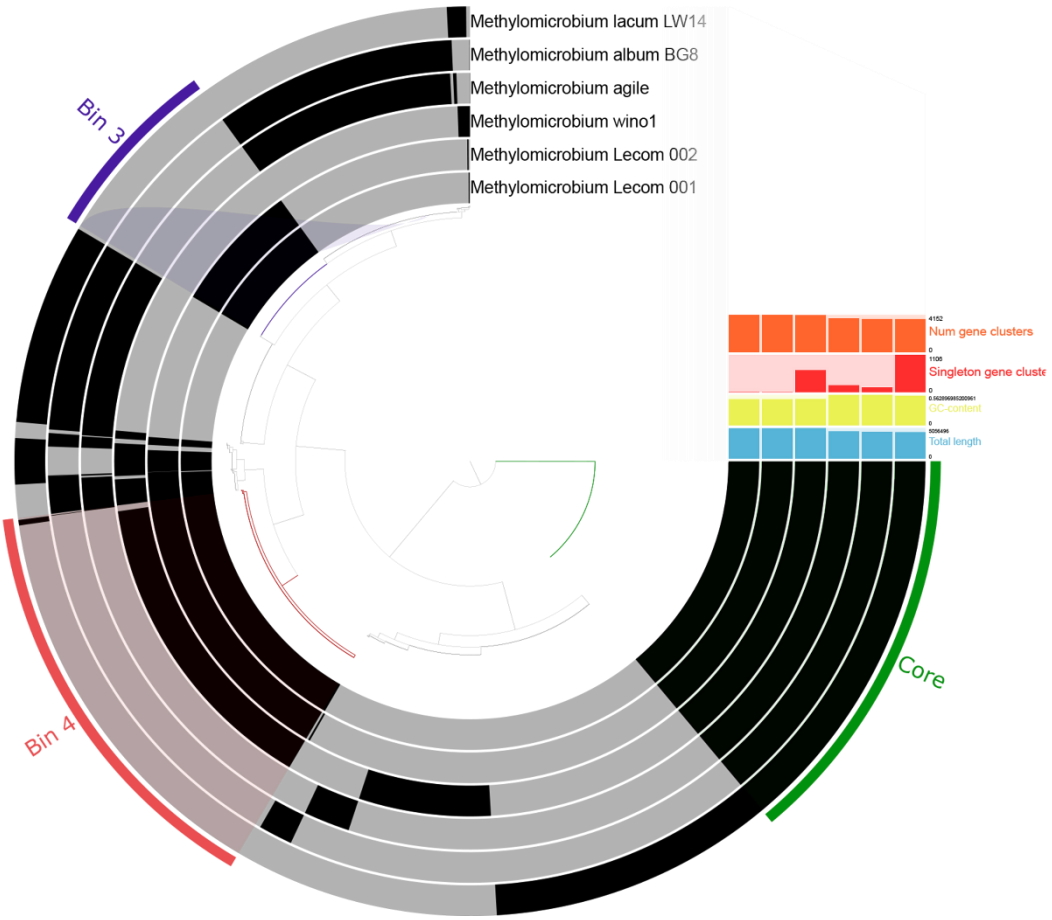


Outra análise interessante para a comparação dos MAGs com os genomas de referência é a análise de pangenoma, pois a mesma tem como objetivo explorar o conteúdo gênico total de um grupo microbiano, incluindo o genoma central (core) contendo genes presentes em todos os representantes, a porção do genoma que é dispensável, contendo genes presentes em duas ou mais linhagens e genes únicos (singletons) específicos para linhagens únicas (ZEB; GULFAM; BOKHARI, 2020).

A análise do pangenoma comparando as MAGs recuperadas com as MAGs de referência identificou uma região core entre os seis genomas pertencentes ao mesmo gênero bacteriano (Figura 25). Além da região core, também foram identificadas regiões compartilhadas apenas entre os MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e LECOM 002 (Figura 25, Bin 3) e regiões compartilhadas entre as duas MAGs recuperadas e o genoma de *Methylomicrobium* sp. wino1 (Figura 25 Bin 4). Essas análises reforçam que os genomas de bactérias do gênero *Methylomicrobium* sp. recuperadas de sedimento marinho parecem apresentar regiões que as demais MAGs deste mesmo grupo não possuem e que são compartilhadas entre elas.

Figura 25. Pangenoma comparando as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank. Em verde o bin identificado como a região core entre todos os genomas analizados. Em roxo (Bin 3) a região compartilhada apenas entre *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002

e em rosa (Bin 4) regiões compartilhadas entre *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e *Methylomicrobium* sp. wino1.

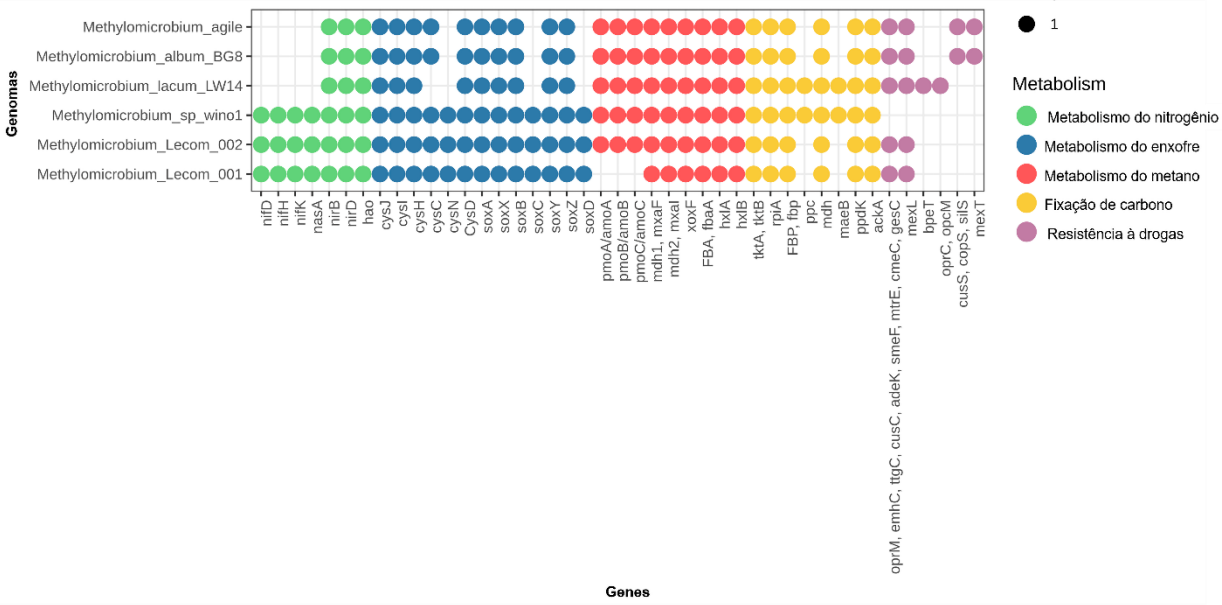


A anotação de funcional de genes realizadas empregando o DRAM permitiu observar quais genes estão realacionados a ciclos biogeoquímicos importantes nos ambientes em que esses microrganismos estão presentes. A presença de genes chave nesses MAGs permite entender um pouco mais acerca dos possíveis papéis ecológicos que esses microrganismos podem estar desempenhando em seus ambientes de origem.

No ciclo do nitrogênio, todos os genomas apresentaram os genes *nirBD* (subunidades da enzima nitrato redutase) que estão ligados a redução dissimilatória de nitrato e o gene *hao* (hidroxilamina desidrogenase) que está associado ao processo de nitrificação. Apenas os MAGs de Methylomicrobium sp. LECOM 001 e LECOM 002 e *Methylomicrobium* sp. wino1 apresentaram os genes *nifHDK* (nitrogenases) que estão diretamente associados a fixação de nitrogênio (Figura 26). Esta é uma característica interessante pois em ambientes marinhos o nitrogênio fixado pode ser um fator limitante

e encontrar três MAGs marinhos que apresentem este *operon*, pode indicar que esses microrganismos estejam sendo responsáveis pela fixação de nitrogênio em regiões de mar profundo.

Figura 26. Análise comparativa do conteúdo gênico das MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 em comparação com os genomas de referência do GenBank. No eixo y estão as identificações das MAGs e no eixo x os genes analisados.



No cilco do enxofre, foi detectada em LECOM 001 e 002 a via completa para redução assimilatória de sulfato a sulfeto de hidrogênio (*cysJIHCND*), via que também está completa no genoma de *Methylomicrobium* sp. wino1. Também foram identificados todos os genes para oxidação de tiossulfato em sulfato pelo complexo SOX (*soxAXBCYZD*) e, novamente, resultado que também foi identificado no genoma de *Methylomicrobium* sp. wino1.

Acerca do metabolismo do metano, o o*peron* pmoABC, que codifica as três subunidades de pMMO, foi identificado apenas no MAG de Methylomicrobium sp. LECOM002, indicando que MAG-002 poderia oxidar metano. Também foram encontradas metanol desidrogenases (MDH), enzimas que são importantes na oxidação do metano pois convertem metanol em formaldeído, que é o intermediário central na fixação de carbono para metanotróficas aeróbias. Dois tipos diferentes de MDHs foram encontradas em LECOM 001 e 002, MDH dependente de lantanídeos *XoxF* e MDH dependente de cálcio *MxaFI* (Figura 26). Também foram identificados os genes para assimilação de formaldeído (*fbaA*, *hxlAB*), via de monofosfato de ribulose em todas as MAGs. Quanto a fixação de carbono, os MAGs de LECOM 001 e 002 apresentaram

genes para a o ciclo redutor de pentose fosfato (tktA, rpiA, fbp) e o gene *ackA* (acetato quinase) reponsavel pela via de fosfato acetiltransferase-acetato quinase (acetil-CoA => acetato).

Os MAGs também apresentaram os genes *mdh* (malato desidrogenase) e *ppc* (fosfoenolpiruvato carboxilase) associados ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM- fase escura) e *ppdK* (piruvato, ortofosfato diquinase) *e acka* (acetato quinase) associados ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM- fase clara). Em bactérias, esses genes já foram registrados anteriormente, o gene *ppc* é encontrado comumente em plantas mas também pode ser encontrado em bactérias e está relacionado diretamente à fixação de carbono, já que este gene codifica a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase, que é da família das carboxi-liases e catalisa a adição de bicarbonato (HCO_3^-) ao fosfoenolpiruvato (PEP) para formar o composto de quatro carbonos oxaloacetato e fosfato inorgânico (PEP + $HCO_3^- \rightarrow$ oxaloacetate + Pi) (KAI; MATSUMURA; IZUI, 2003). O gene *ppdk* é encontrado principalmente em plantas, mas também já foi registrado em outras bactérias, priciplamente da espécie *Clostridium symbiosum* e, nesses organismos pode atuar no lugar da piruvato quinase, catalisando a reação de produção de ATP como parte da glicólise (LIM et al., 2007).

Nos MAGs também foram identificados genes associados a *operons* de resistência a múltiplas drogas e bomba de efluxo, dentre elas, o *operon* contendo os genes *oprM, emhC, ttgC, cusC, adeK, smeF, mtrE, cmeC* e *gesC* que codificam uma proteína de membrana externa responsável por um sistema de efluxo multidrogas.

Além da busca de genes, também foi realizada a investigação de proteínas ortólogas nos MAGs e nos genomas de referência através do software Orthovenn2. Através desta análise, foi possível identificar que os 6 genomas formam 6509 clusters gênicos, 4734 clusters ortólogos (pelo menos contém duas espécies) e 1775 clusters de genes de cópia única. A contagem de proteínas em cada genoma, quantos clusters foram formados em cada um deles e a quantidade de singletons (genes únicos) que cada um deles apresentou estão contidas na Tabela 11.

Tabela 11. Quantidade de proteínas, clusters e singletons identificados nos genomas de referência e nos genomas das MAGs LECOM 001 e 002.

Genoma	Proteínas	Clusters	*Singletons*
Methylomicrobium_LECOM002	5109	4954	113
Methylomicrobium_LECOM001	5084	4946	102
Methylomicrobium_agile	3815	3549	220
Methylomicrobium_album_BG8	3789	3583	165
Methylomicrobium_lacum	3808	2785	929
Methylomicrobium_sp_wino	4189	3626	493

Os seis genomas compartilham 1821 clusters contendo uma média de 11005 proteínas (Figura 27). Essas proteínas estão dividas nas categorias de processos biológicos, onde 592 estão atribuídas a processos metabólicos, 563 a processos biológicos, 500 a processos celulares metabólicos, 381 a processos metabólicos do nitrogênio, 313 a processos celulares, 310 a processos metabólicos primários, 249 a processos metabólicos heterociclos, 224 a processos metabólicos de macromoléculas, 223 a processos metabólicos de compostos celulares aromáticos e 189 a processos metabólicos de ácidos orgânicos. Na categoria de processos biológicos, foram identificadas ainda 46 proteínas com atividade de hidrolase, 39 associadas a ligação de íons, 36 a funções moleculaes, 36 tranerases, 33 com funções de transportadoras, 23 com funções de ligações de ácidos nucleicos, 21 com função de oxirredutases, 17 com funções de peptidades, 15 associadas a ligação de nucleotídeos e 14 associadas a ligações de cofatores. Além das proteínas com atividade metabólica, também foram identificadas proteínas com função estrutural neste mesmo cluster, sendo 28 associadas a membranas, 33 componetntes da célula, 5 intracelulares, 1 extracelular, 1 associada ao núcleo, 1 a superfície celular, 1 a estrutura de encapsulamento externo, 1 ao envelope celular e 1 ao espaço periplasmático.

Figura 27. Resultado da análise comparativa das proteínas ortólogas entre as MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 e os genomas de referência do GenBank. À esquerda os quadros verdes indicam a presença dos clusters e os cinzas indicam ausência. À direita a contagem de clusters compartilhados e as contagem de proteínas referentes a cada um deles.

Além dos clusters compartilhados entre todos os MAGs, outros que chamam atenção são os 1243 *clusters* compartilhado apenas entre as MAGs de LECOM 001 e 002 e *Methylomicrobium* sp. wino1, que tem uma média de 3766 proteínas. Esse cluster tem proteínas associadas à fixação de nitrogênio, resultado confirmado pelos genes que foram identificados anteriormente nesses três MAGs, proteínas relacionadas a sistemas de transdução de sinais; proteínas associadas ao processo biossintético da ectoína, que é um soluto que serve como substância protetora ao agir como um osmólito e, assim, ajuda os organismos a sobreviverem a um estresse osmótico extremo; proteínas associadas à cadeia de transporte de elétrons e proteínas associadas à resposta celular ao óxido nítrico.

5.8 Isolamento a partir dos consórcios metanotróficos

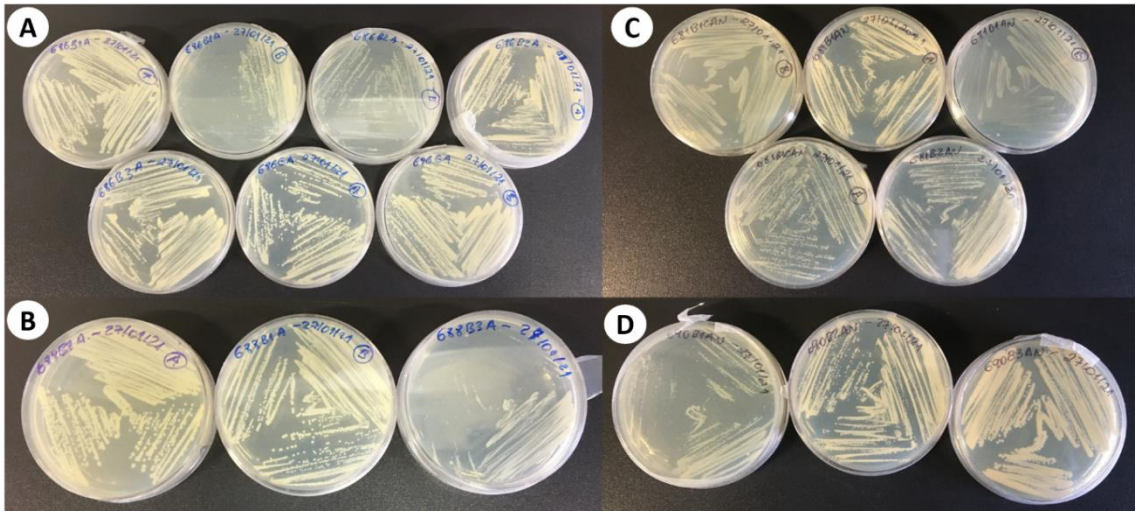
5.8.1 Cultivo dos consórcios metanotróficos

A incubação empregando o Ágar Marinho (Difco) teve como objetivo isolar os microrganismos heterotróficos marinhos que estivessem crescendo no consórcio microbiano metanotrófico. Após 48 horas de incubação, todas as 56 placas de Petri oriundas dos 56 consórcios metanotróficos, possuíam diferentes colônias bacterianas em

crescimento. As colônias foram purificadas com o objetivo de isolar os microrganismos (Figura 28). Foram isoladas 43 colônias de microrganismos heterotróficos provenientes das culturas aeróbias e 45 colônias de microrganismos provenientes das culturas anaeróbias, totalizando 88 isolados que foram armazenados em glicerol 50%.

Estes microrganimos representam uma parte da microbiota cultivável de mar profundo da Bacia de Santos e foi adicionada à coleção de microrganismos do LECOM para futuros estudos. Como este trabalho já revelou que muitos microrganismos possuem capacidades metabólicas para a degradação de hidrocarbonetos e até biorremediação, trabalhos futuros podem realizar a identificação taxonômica dos mesmos e utilizar estes microrganismos isolados para posteriores testes.

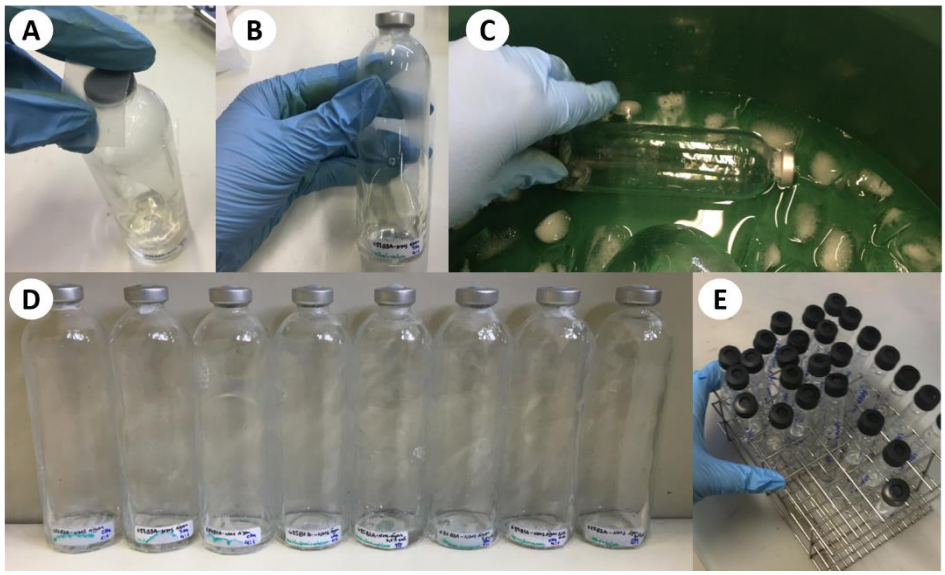
Figura 28. Fotos das placas de Petri contendo Ágar Marinho para isolamento de bactérias heterotróficas de mar profundo. As figuras A e B representam os isolados obtidos a partir dos consórcios aeróbios e as figuras C e D representam isolados obtidos a partir dos consórcios anaeróbios.



5.8.2 Isolamento de microrganismos metanotróficos utilizando a técnica de roll tube

A incubação utilizando a técnica de *roll tube* teve como objetivo isolar bactérias metanotróficas em ágar (Figura 29). Esta técnica foi utilizada como alternativa para incubação em tubos onde fosse possível realizar o controle do *headspace*, mesmo que apenas consórcios aeróbios fossem selecionados para esta etapa.

Figura 29. Fotos do procedimento utilizado para o cultivo utilizando a metodologia de *roll tube*. A, tubos *Hungate* sendo vedados com *parafilm* para evitar contaminação; B, Meio de cultura com inóculo para o cultivo; C, rolando o tubo *Hungate* com inóculo para fixação do meio de cultura na parede do tubo; D, cultivos com o meio fixado na parede do tubo para incubação em estufa; E, isolados cultivados em meio de cultura NMS líquido obtidos a partir de colônias formadas no *roll tube*.



Cinco consórcios aeróbios foram selecionados empregando-se essa técnica e, após o tempo selecionado para a incubação (10 dias) nem todos apresentaram crescimento ou foram registradas apenas algumas colônias pequenas na fina cama de ágar. Para estimular o crescimento bacteriano, no décimo dia de incubação as culturas tiveram seu *headspace* de metano renovado e foram mantidas em incubação por mais 7 dias, sob as mesmas condições personalizadas citadas anteriormente na metodologia.

Em 17 dias de incubação em ágar apenas com metano como única fonte de carbono, os frascos apresentaram a formação de colônias nas paredes tos tubos, exceto no *Hungate* oriundo do consórcio 684B1A com adição de NaCl a 3,5%. No total, foram obtidos 30 isolados e, a quantidade de isolados por consórcio está registrada na Tabela 12.

Todas as colônias visíveis foram marcadas e retiradas do *Hungate* e transferidas para um tubo de ensaio contendo meio de cultura líquido NMS 3,5% NaCl e foram incubados à 20°C com um *headspace* 1:1 metano:ar.

Tabela 12. Número de isolados obtidos a partir dos cultivos utilizando a técnica de *roll tube.* A primeira coluna apresenta a identificação dos consórcios de onde foram obtidos os isolados, a segunda coluna apresenta a quantidade de isolados recuperados a partir da incubação em NMS e ágar sem a adição de NaCl e a terceira coluna apresenta a quantidade de isolados recuperados a partir da incubação em NMS e ágar com a adição de NaCl a 3,5%.

	Quantidade de colônias isoladas por cultura	
Consórcio	**NMS**	**NMS + 3,5% NaCl**
684B1A	11	-
685B1A	4	1
686B3A	3	4
688B3A	5	2

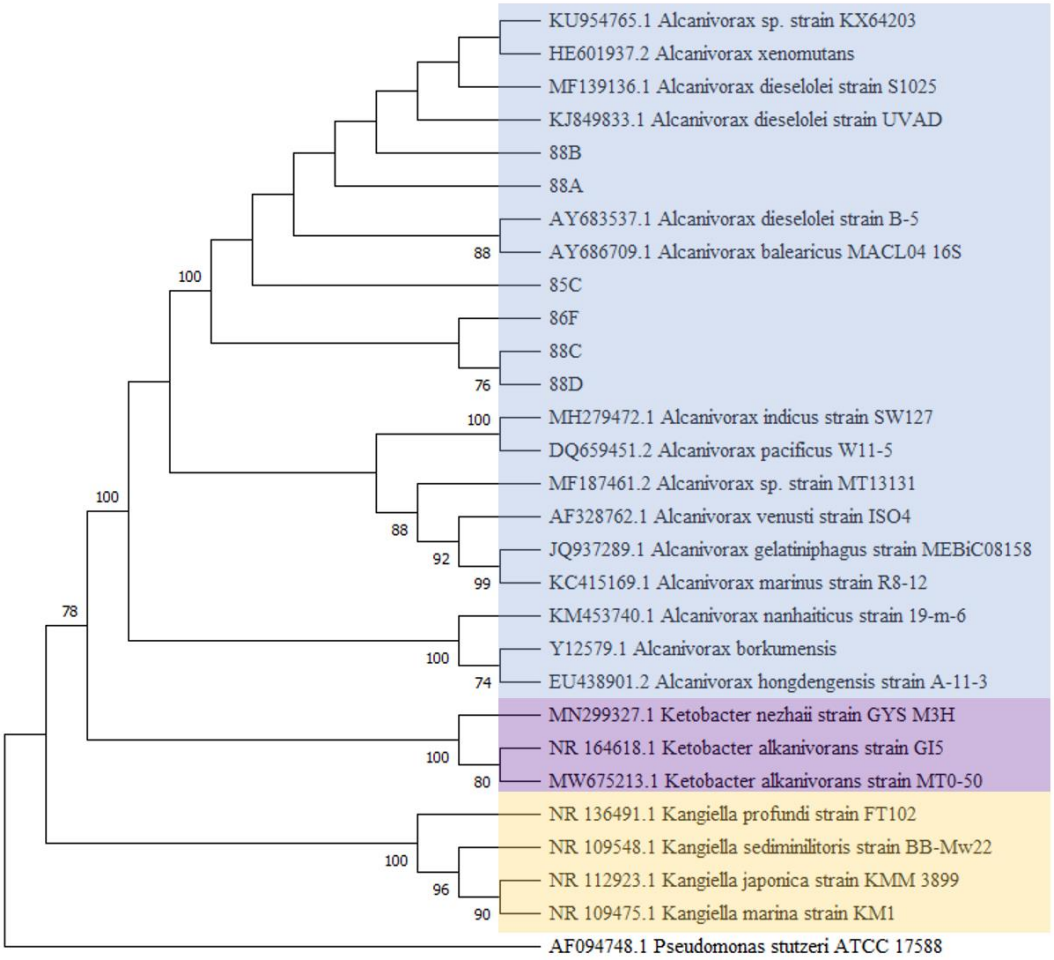
Após 30 dias de crescimento em meio líquido, os 30 isolados foram preservados em glicerol 50% e seis foram selecionados para extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA. Os isolados selecionados foram 1 proveniente da amostra 685B1A (85C), 1 proveniente da amostra 686B3A (86F) e 4 provenientes da amostra 688B3A (88A, 88B, 88C, 88D).

Esses isolados foram selelcionados pois foram os que apresentaram o melhor crescimento nos frascos Hungate, visualmente, durante a técnica de *roll tube*. Os dados de quantificação de DNA após a extração, por amostra, estão contidos na Tabela 13.

Tabela 13. Dados de quantificação de DNA das amostras oriundas do isolamento de micorganimos a partir da técnica de roll tube. Segunda, terceira e quarta coluna fazem referência aos dados de quantificação em Denovix e a última em Qubit.

Amostra	**ng/uL**	**260/230**	**260/280**	**Qubit**
85C	17.555	0.06	2.06	17.7
86F	68.87	0.14	2.77	31.6
88A	59.447	0.14	1.8	33.3
88B	68.031	0.17	1.67	34.2
88C	39.74	0.08	1.74	32.4
88D	46.62	0.08	1.96	13.3

Figura 30. Árvore de Neighbour-joining mostrando as posições filogenéticas dos isolados e representantes de alguns outros taxa relacionados, com base nas sequências do gene 16S rRNA. Os valores de bootstrap (expressos como porcentagens de 10.000 replicações) são mostrados nos pontos de ramificação.



A análise filogenética foi realizada com sequências de 16S de bactérias pertencentes à família Alcanivoricaceae com base na análise prévia que havia sido feita no BLASTn do NCBI, onde os melhores hits dos nossos isolados foram com sequencias do gênero *Alcanivorax* sp., com base em valores de identidade, cobertura e e-value.

Não há suporte para afirmar ou identificar com precisão as espécies dos isolados obtidos através da técnica empregada neste estudo. Os valores de *bootstraps* associados a eles e seus vizinhos foram < 60, por isso, estão ocultados da figura. Porém, em todas as três árvores filogenéticas, os isolados foram inclusos ao *cluster* com as sequências do gênero *Alcanivorax* sp., cuja integridade foi suportada em 100% das árvores geradas (Figura 30).

Os isolados do gênero *Alcanivorax* sp sem espécie definida corroboram com alguns dos 13 MAGs recuperados a partir dos consórcios metanotróficos (Tabela 8). Alguns MAGs assinados taxonomicamente como pertencentes ao mesmo gênero também não apresentaram espécie definida a partir da assinatura taxonômica do banco de dados do GTDB-tk. Este pode ser um indicativo para que mais estudos sejam feitos envolvendo estes grupos, visto que *Alcanivorax* sp. apresenta um potencial metabólico diverso e já foi utilizada como modelo para precipitação de carbonato microbiano como resultado direto da interação entre o ciclo do nitrogênio microbiano e uma enzima produzida microbianamente no trabalho de Krause et al., 2018.

6. SÍNTESE E RECOMENDAÇÕES

Outros trabalhos que estudam a microbiota de regiões carbonáticas realizaram a coleta de amostras em montes carbonáticos associados com exsudações frias (*cold seeps*) ativas, portanto, as altas taxas de metano disponíveis nesses ambientes possibilitam e selecionam oxidadoras anaeróbias de metano (OAM) e grupos de arquéias oxidadoras anaeróbias de metano (ANME) foram registradas anteriormente em *seeps* associados à montes carbonáticos no Pacífico e no Atlântico (LI et al., 2014; DEKAS et al., 2018; BECKMANN et al., 2021).

Em nosso estudo, a identificação de bactérias oxidadoras de metano nos enriquecimentos oriundos de sedimento coletado em regiões carbonáticas sem a constatação da ocorrência de áreas de exsudação, ressalta a importância de continuar a busca por *seeps* ativos na região, visto que esses organismos são metanotróficos obrigatórios e dependem de uma fonte de metano ambiental disponível para sua sobrevivência em mar profundo. Estas podem ser evidências acerca da existência e localização do seep ativo na Região da Bacia de Santos.

Embora a exsudação de metano não tenha sido ainda confirmada na cadeia de montes carbonáticos Alpha Crucis, o trabalho de Maly et al., 2019 destacou que a região é caracterizada por carbonatos autigênicos e a formação deste tipo de feição geológica tem associação direta com a comunidade microbiana associada. As regiões de cadeias carbonáticas representam uma fração importante do armazenamento global de carbono e uma parte significativa deste carbonato é de origem microbiana.

Chamam a atenção a elevada abundância de microrganismos do gênero *Alcanivorax* sp. nos consórcios oriundos tanto das regiões de montes carbonáticos quanto de *pockmarks.* Uma vez que eles têm relação direta com a formação de carbonatos no oceano (KRAUSE et al., 2018). Além disso, o fato de alguns dos 13 MAGs recuperados e 6 isolados do gênero *Alcanivorax* sp. pertenceram a espécies não identificadas. Este resultado instiga a curiosidade acerca de qual teria sido a relação deste grupo abuntante nos consórcios na história e na formação da cadeia de montes carbonáticos Alpha Crucis, visto que *Alcanivorax* sp. é um grupo capaz de precipitar matrizes de carbonato em períodos curtos de tempo (dias e semanas), induzida por processos de amonificação (KRAUSE et al., 2018).

A possibilidade de idenitificação desses microrganismos do gênero *Alcanivorax* sp. de espécies desconhecidas e até mesmo do gênero *Methylomicrobium* sp. foi possível através da mescla de técnicas dependentes e independentes de cultivo, que possibilitam o enriquecimento de uma parcela nem sempre tão abundante da comunidade microbiana e que, às vezes, não é identificada somente através do sequencimento *shotgun*.

Regiões de mar profundo ainda abrigam uma diversidade microbiana pouco conhecida e pouco explorada pela dificuldade de acesso a coleta deste material e pela dificuldade de mimetizar, *in vitro*, as condições ambientais em que esses organismos estão adaptados para o isolamento dos mesmos (ZHANG; WU; ZHANG, 2018). Por este motivo, os consórcios e os isolados obtidos neste trabalho são importantes para que trabalhos futuros sejam desenvolvidos e que novas informações sobre os microrganismos que habitam o talude da Bacia de Santos sejam revelados.

Neste trabalho é a primeira vez que está sendo relatado que na região do talude, MAGs de microrganismos metanotróficos do gênero *Methylomicrobium* sp.. Esses MAGs representam um valioso dado para a região pois além de serem o primeiro registro para a Bacia, representam uma possível espécie nova e são os primeiros MAGs recuperados a partir de regiões de montes carbonáticos de mar profundo. Além disso, o genoma desses organismos apresenta semelhança com um MAG depositado no GenBank que também é de origem marinha, o que pode indicar que processos ecossistêmicos podem estar sendo realizados por esses microrgansimos em sedimento de mar profundo, como os associados ao ciclo do metano.

Nos ecossistemas marinhos, a fixação de nitrogênio é uma tarefa importante em toda a coluna d'água, visto que este é um elemento importante para manter a fertilidade do oceano e essencial para a produção de matéria orgânica primária (ZEHR & CAPONE, 2020). A fixação do mesmo foi atribuída à cianobactérias por muitos anos, o que limita o conhecimento à zona fótica do ecossistema marinho e pouco se sabe como esse composto é fixado nas regiões onde a luz solar não é acessível.

Os MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001, LECOM 002 e *Methylomicrobium* sp. wino1 apresentaram os genes *nifHDK* (nitrogenases) que estão diretamente associados a fixação de nitrogênio, o que pode ser um indicativo de que em regiões de mar profundo, onde não há penetração de luz solar, outros microrganismos podem estar sendo responsáveis pela fixação deste composto, dentre eles, bactérias metanotróficas. A fixação de nitrogênio em mar profundo já foi regiestrada anteriormente em ANME em regiões de infiltrações de hidrocarbonetos associados a carcaças de baleias (JICKELLS et al., 2017).

Os resultados deste estudo geraram novas acerca da ecologia microbiana do local e sobre a disponibilidade de recursos de carbononas regiões de carbonatos e pockmarcks da Bacia de Santos. Por que as bactérias metanotróficas identificadas nos montes carbonáticos estariam fixando nitrogênio em mar profundo? Por que apresentam genes associados ao metabolismo ácido das crassuláceas? Os isolados de *Alcanivorax* sp. deste estudo representam novas espécies do gênero? O monte carbonático Alpha Crucis apresenta um *seep ativo*? Esses questionamentos indicam a importância da continuidade desses estudos na área.

7 CONCLUSÕES

Usando a combinação de metodologias dependentes de cultivo e seqeucniamento do gene 16S rRNA, este trabalho caracterizou consórcios microbianos metanotríficos no sedimento de mar profundo nas regiões do atlântico sudoeste. Foi possível identificar que a região sudoeste do Oceano Atlântico que é rica em montes carbonáticos e *pockmarks* microrganimos metanotróficos diversos, apesar de ainda não ter registros confirmados de seeps ativos na região.

A análise metagenômica dos enriquecimentos permitiu a recuperação de MAGs oriundos das amostras da cadeia de montes carbonáticos Alpha Crucis, o que serve como incentivo para a continuação da busca por áreas de exsudação fria (*cold seep*) ativos no local, visto que os microrganismos identificados nessa região como pertencentes ao gênero *Methylomicrobium* sp. são metanotróficos obrigatórios, ou seja, dependem da presença de metano *in situ* para sobreviver.

Esses dados são primeiro regitro desses microrganismos metanotróficos para região sudoeste do Oceano Atlântico e serão os primeiros genomas depositados em bancos de dados públicos oriundos de amostras de sedimento marinho de regiões carbonáticas. Explorando esses genomas descobrimos que, possivelmente, esses MAGs ainda podem representar espécies novas, ou seja, novos registros para o gênero *Methylomicrobium* sp. . Os MAGs de *Methylomicrobium* sp. LECOM 001 e 002 apresentaram um potencial metabólico importante e parecem contribuir para a fixação de nitrogênio na região dos carbonatos. Esse fato incentiva a continuação dos trabalhos para comprovação do metabolismo e identificação de espécies dos microrganismos referentes a esses MAGs.

Além disso, os resultados desse estudo geraram dados para que trabalhos futuros possam ser realizados, visto que isolados de mar profundo da Bacia de Santos, identificaram microrganismoas com capacidades metabólicas de interesse biotecnológico, como a biorremediação, e também ecológico. Sendo assim outros estudos podem ser realizados a partir desses dados preliminares e do material biológico adicionado à coleção do LECOM, pois ainda há muito o que desvendar nas regiões de mar profundo da Bacia de Santos.

8 REFERÊNCIAS

ACINAS, S. G. et al. Validation of a new catalysed reporter deposition–fluorescence in situ hybridization probe for the accurate quantification of marine B acteroidetes populations. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 10, p. 3557-3569, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Plano Plurianual de estudos de geologia e geofísica: PPA 2007-2014 – projetos realizados. Brasil, 05 out. 2016. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/exploracao-e-producao-de-oleo-e-gas/estudos-geologicos-e-geofisicos/plano-plurianual-de-estudos-de-geologia-e-geofisica/ppa-2007-2014/resultados-por-bacia>. Acesso em: 09 março 2021.

ANDREWS, S. et al. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.

ANTHONY, C. Bacterial oxidation of methane and methanol. **Advances in microbial physiology**, v. 27, p. 113-210, 1986.

ANTONY, C. P. et al. Methylophaga lonarensis sp. nov., a moderately haloalkaliphilic methylotroph isolated from the soda lake sediments of a meteorite impact crater. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1613-1618, 2012.

ANVAR, S. Y. et al. The genomic landscape of the verrucomicrobial methanotroph Methylacidiphilum fumariolicum SolV. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2014.

ARÍSTEGUI, J. et al. Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. **Limnology and Oceanography**, v. 54, n. 5, p. 1501-1529, 2009.

ARNDT, David et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W16-W21, 2016.

AZIZ, Ramy K. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2008.

BAKER, S. C. et al. Molecular Genetics of the GenusParacoccus: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1046-1078, 1998.

BAKTERIEN, S. NL O.. welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen. **Zentr. Bakt. Parasitenk, 1906, Abt lII, 15." 513**, v. 517.

BARBERAN, A., International Journal of Systematic and Evolutionary **Microbiology (IJSEM) phenotypic database**. figshare. Dataset, 2016.

BECKMANN, S. et al. Expanding the repertoire of electron acceptors for the anaerobic oxidation of methane in carbonates in the Atlantic and Pacific Ocean. **The ISME journal**, v. 15, n. 9, p. 2523-2536, 2021.

BELTRAO, R. L. Carneiro et al. SS: pre-salt Santos basin-challenges and new technologies for the development of the pre-salt cluster, Santos basin, Brazil. In: **Offshore Technology Conference**. Offshore Technology Conference, 2009.

BENDIA, A. G. et al. Microbial perspective on the giant carbonate ridge Alpha Crucis (Southwestern Atlantic upper slope). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 8, p. fiab110, 2021.

BERGHUIS, B. A. et al. Hydrogenotrophic methanogenesis in archaeal phylum Verstraetearchaeota reveals the shared ancestry of all methanogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 11, p. 5037-5044, 2019.

BODELIER, P. L.E; STEENBERGH, A. K. Interactions between methane and nitrogen cycling; current metagenomics studies and future trends. **Metagenomics of the Microbial Nitrogen Cycle**, 2014.

BOETIUS, A. et al. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 623-626, 2000.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.

BRANTNER, C. A. et al. Isolation of intracytoplasmic membrane from the methanotrophic bacterium Methylomicrobium album BG8. **Current microbiology**, v. 40, n. 2, p. 132-134, 2000.

BURNS, J. L.; DICHRISTINA, T. J. Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by Shewanella oneidensis MR-1 requires psrA, a homolog of the phsA gene of Salmonella enterica serovar typhimurium LT2. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 16, p. 5209-5217, 2009.

CABEZAS, A. et al. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, n. 4, p. 555-593, 2015.

CAI, C. et al. A methanotrophic archaeon couples anaerobic oxidation of methane to Fe (III) reduction. **The ISME journal**, v. 12, n. 8, p. 1929-1939, 2018.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CONRAD, R.. Importance of hydrogenotrophic, aceticlastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: a mini review. **Pedosphere**, v. 30, n. 1, p. 25-39, 2020.

CRABTREE, R. H. Aspects of methane chemistry. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 4, p. 987-1007, 1995.

DALTON, H. Structure and mechanism of action of the hydroxylase of soluble methane monooxygenase. **Microbial Growth on C1 Compounds**, p. 65-80, 1993.

DAVIS, J. J. et al. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D606-D612, 2020.

DEAN, J. F. et al. Methane feedbacks to the global climate system in a warmer world. **Reviews of Geophysics**, v. 56, n. 1, p. 207-250, 2018.

DEDYSH, S. N. Exploring methanotroph diversity in acidic northern wetlands: molecular and cultivation-based studies. **Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 655-669, 2009.

DEDYSH, S. N.; DUNFIELD, P.r F.; TROTSENKO, Y. A. Methane utilization by Methylobacterium species: new evidence but still no proof for an old controversy. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1919-1920, 2004.

DEKAS, A. E. et al. Widespread nitrogen fixation in sediments from diverse deep-sea sites of elevated carbon loading. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 12, p. 4281-4296, 2018.

DEMIREL, B. et al. Production of methane and hydrogen from biomass through conventional and high-rate anaerobic digestion processes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 116-146, 2010.

DISPIRITO, A. A. et al. Methanobactin and the link between copper and bacterial methane oxidation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 387-409, 2016.

DOS SANTOS, R. F. et al. Metal/Ca ratios in pockmarks and adjacent sediments on the SW Atlantic slope: Implications for redox potential and modern seepage. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 192, p. 163-173, 2018.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

GUERRERO-CRUZ, S. et al. Methanotrophs: Discoveries, Environmental Relevance, and a Perspective on Current and Future Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1057, 2021.

HAMAKI, T. et al. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 5, p. 485-492, 2005.

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

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

HENSEN, C.; ZABEL, M.. Early diagenesis at the benthic boundary layer: oxygen and nitrate in marine sediments. In: **Marine geochemistry**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. p. 209-231.

HO, A. et al. Conceptualizing functional traits and ecological characteristics of methane-oxidizing bacteria as life strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 3, p. 335-345, 2013.

HU, Lizhen et al. Molecular mechanism associated with the impact of methane/oxygen gas supply ratios on cell growth of Methylomicrobium buryatense 5GB1 through RNA-Seq. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 263, 2020.

HUBER, J. A. et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere. **science**, v. 318, n. 5847, p. 97-100, 2007.

HUNGATE, R. E. Chapter IV A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: **Methods in microbiology**. Academic Press, p. 117-132, 1969..

IPCC (2014) Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge

JACKSON, C. A.-L. et al. Geological and geophysical expression of a primary salt weld: An example from the Santos Basin, Brazil. **Interpretation**, v. 2, n. 4, p. SM77-SM89, 2014.

JICKELLS, T. D. et al. A reevaluation of the magnitude and impacts of anthropogenic atmospheric nitrogen inputs on the ocean. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 31, n. 2, p. 289-305, 2017.

JING, H. et al. Anaerobic methane oxidation coupled to denitrification is an important potential methane sink in deep-sea cold seeps. **Science of The Total Environment**, v. 748, p. 142459, 2020.

JUDD, A. et al. The Croker Carbonate Slabs: extensive methane-derived authigenic carbonate in the Irish Sea—nature, origin, longevity and environmental significance. **Geo-Marine Letters**, v. 40, n. 4, p. 423-438, 2020.

KASAI, Y. et al. Predominant growth of Alcanivorax strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 141-147, 2002.

KATAYAMA, Y.; HIRAISHI, A.; KURAISHI, H.. Paracoccus thiocyanatus sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of Thiobacillus versutus to the genus Paracoccus as Paracoccus versutus comb. nov. with emendation of the genus. **Microbiology**, v. 141, n. 6, p. 1469-1477, 1995.

KATOH, K.; ASIMENOS, G.; TOH, H.. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. In: **Bioinformatics for DNA sequence analysis**. Humana Press, 2009. p. 39-64.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, v. 32, n. 13, p. 1933-1942, 2016.

KAI, Y.; MATSUMURA, H.; IZUI, K.. Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 414, n. 2, p. 170-179, 2003.

KIM, B.R. et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 2017.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. e1-e1, 2013.

KNIEF, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1346, 2015.

KNITTEL, K.; BOETIUS, A.. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 311-334, 2009.

KRAUSE, S. et al. Marine ammonification and carbonic anhydrase activity induce rapid calcium carbonate precipitation. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 243, p. 116-132, 2018.

KRÜGER, M. et al. Microbial methane turnover in different marine habitats. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 227, n. 1-3, p. 6-17, 2005.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K.. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution,** v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LI, J. et al. Microbial communities in semi-consolidated carbonate sediments of the Southwest Indian Ridge. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 111-119, 2014.

LIM, K. et al. Swiveling domain mechanism in pyruvate phosphate dikinase. **Biochemistry**, v. 46, n. 51, p. 14845-14853, 2007.

LIPSCOMB, J. D. Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. **Annual review of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 371-399, 1994.

LOUCA, S.; PARFREY, L. W.; DOEBELI, Michael. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1272-1277, 2016.

LOVE, M.; ANDERS, S.; HUBER, W.. Differential analysis of count data–the DESeq2 package. **Genome Biol**, v. 15, n. 550, p. 10.1186, 2014.

MACLEOD, F. et al. Asgard archaea: Diversity, function, and evolutionary implications in a range of microbiomes. **AIMS microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48, 2019.

MAHIQUES, M. M. et al. An extensive pockmark field on the upper Atlantic margin of Southeast Brazil: spatial analysis and its relationship with salt diapirism. **Heliyon**, v. 3, n. 2, p. e00257, 2017.

MALY, M. et al. The Alpha Crucis Carbonate Ridge (ACCR): Discovery of a giant ring-shaped carbonate complex on the SW Atlantic margin. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

MALY, M. et al. The Alpha Crucis Carbonate Ridge (ACCR): discovery of a giant ring-shaped carbonate complex on the SW Atlantic margin. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

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

MATEOS-RIVERA, A. et al. High-quality draft genome of the methanotroph Methylovulum psychrotolerans Str. HV10-M2 isolated from plant material at a high-altitude environment. **Standards in genomic sciences**, v. 13, n. 1, p. 10, 2018.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S.. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MEYERDIERKS, Anke et al. Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 2, p. 422-439, 2010.

MILLER, D. J. et al. Natural gas hydrates in the Rio Grande Cone (Brazil): A new province in the western South Atlantic. **Marine and Petroleum Geology**, v. 67, p. 187-196, 2015.

MURRELL, J. C.; MCDONALD, I. R.; BOURNE, David G. Molecular methods for the study of methanotroph ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, n. 2, p. 103-114, 1998.

NAGENDRA, H.. Opposite trends in response for the Shannon and Simpson indices of landscape diversity. **Applied geography**, v. 22, n. 2, p. 175-186, 2002.

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 2. Topical Studies in Oceanography**, v. 58, n. 1-2, p. 128-138, 2011.

NEEF, L.; VAN WEELE, M.; VAN VELTHOVEN, Peter. Optimal estimation of the present-day global methane budget. **Global biogeochemical cycles**, v. 24, n. 4, 2010.

NIEMANN, H. et al. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 854-858, 2006.

ORPHAN, V. J. et al. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. **science**, v. 293, n. 5529, p. 484-487, 2001.

PAPADOPOULOU, A. et al. Methanotrophic contribution to biodegradation of phenoxy acids in cultures enriched from a groundwater-fed rapid sand filter. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 1007-1019, 2019.

PARKS, D. H. et al. Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. **Nature microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1533-1542, 2017.

PARTE, A. C. LPSN–List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825-1829, 2018.

PINCHUK, G. E. et al. Pyruvate and lactate metabolism by Shewanella oneidensis MR-1 under fermentation, oxygen limitation, and fumarate respiration conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8234-8240, 2011.

PORTILHO-RAMOS, R. C. et al. Methane release from the southern Brazilian margin during the last glacial. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2–approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.

PURI, A. W. et al. Genetic tools for the industrially promising methanotroph Methylomicrobium buryatense. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 5, p. 1775-1781, 2015.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic acids research, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012.

RAFAEL, L.S. **Estudos sobre a produção biogênica de metano em sedimento marinho próximo à Geleira Wanda, Ilha Rei George, Península Antártica.** 2018. 157f. Dissertação (Mestrado em Análise Ambiental Integrada). Universidade Federal de São Paulo, Diadema, 2018.

RAGHOEBARSING, Ashna A. et al. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 918-921, 2006.

RAHALKAR, M. C.; PANDIT, P.. Genome-based insights into a putative novel Methylomonas species (strain Kb3), isolated from an Indian rice field. **Gene Reports**, v. 13, p. 9-13, 2018.

REEBURGH, W. S. Oceanic methane biogeochemistry. **Chemical reviews**, v. 107, n. 2, p. 486-513, 2007.

RICHTERICH, P. . CodonCode Aligner Version 1.2 Released. **Genet Med**, v. 6, p. 162-163, 2004.

RODRIGUES, L. F. et al. The influence of methane fluxes on the sulfate/methane interface in sediments from the Rio Grande Cone Gas Hydrate Province, southern Brazil. **Brazilian Journal of Geology**, v. 47, n. 3, p. 369-381, 2017.

RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, Konstantinos T. Bypassing cultivation to identify bacterial species. **Microbe**, v. 9, n. 3, p. 111-118, 2014.

ROSARIO-PASSAPERA, R. et al. Parvibaculum hydrocarboniclasticum sp. nov., a mesophilic, alkane-oxidizing alphaproteobacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent on the East Pacific Rise. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 12, p. 2921-2926, 2012.

SETIAWAN, R.; SUDIANA, I. M. Molecular identification of methane oxidizing bacteria from paddy soils and detection methane monooxygenase gene. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2019. p. 012016.

SHAFFER, M. et al. DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 16, p. 8883-8900, 2020.

SMITH, G. J.; WRIGHTON, K. C. Metagenomic approaches unearth methanotroph phylogenetic and metabolic diversity. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 57-84, 2019.

SOLDEN, L.; LLOYD, K.; WRIGHTON, K.. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. **Current opinion in microbiology**, v. 31, p. 217-226, 2016.

STRONG, P. J.; XIE, S.; CLARKE, W. P. Methane as a resource: can the methanotrophs add value?. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 7, p. 4001-4018, 2015.

SWAN, B. K. et al. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1296-1300, 2011.

TATE, K. R. Soil methane oxidation and land-use change–from process to mitigation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 260-272, 2015.

TATUSOVA, T. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 14, p. 6614-6624, 2016.

THOMPSON, C. C. et al. Microbial genomic taxonomy. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2013.

TIEDJE, J. M. Shewanella—the environmentally versatile genome. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 11, p. 1093-1094, 2002.

TIMMERS, P. HA et al. Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea. **Archaea**, v. 2017, 2017.

VAN TEESELING, M. CF et al. Expanding the verrucomicrobial methanotrophic world: description of three novel species of Methylacidimicrobium gen. nov. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 21, p. 6782-6791, 2014.

VERSANTVOORT, W. et al. Comparative genomics of Candidatus Methylomirabilis species and description of Ca. Methylomirabilis lanthanidiphila. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1672, 2018.

VUILLEUMIER, S. et al. Genome sequence of the haloalkaliphilic methanotrophic bacterium Methylomicrobium alcaliphilum 20Z. 2012.

WHITTENBURY, R.; PHILLIPS, K. C.; WILKINSON, J. F. Enrichment, isolation and some properties of methane-utilizing bacteria. **Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 205-218, 1970.

WU, M. L. et al. A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium Candidatus 'Methylomirabilis oxyfera'. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 1, p. 243-248, 2011.

XU, L. et al. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W52-W58, 2019.

YAKIMOV, M. M. et al. Marine, aerobic hydrocarbon-degrading Gammaproteobacteria: the family Alcanivoracaceae. **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes**, p. 167-179, 2019.

YILMAZ, P. et al. The SILVA and "all-species living tree project (LTP)" taxonomic frameworks. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D643-D648, 2014.

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

YU, W. et al. The characteristics and comparative analysis of methanotrophs reveal genomic insights into Methylomicrobium sp. enriched from marine sediments. **Systematic and applied microbiology**, v. 41, n. 5, p. 415-426, 2018.

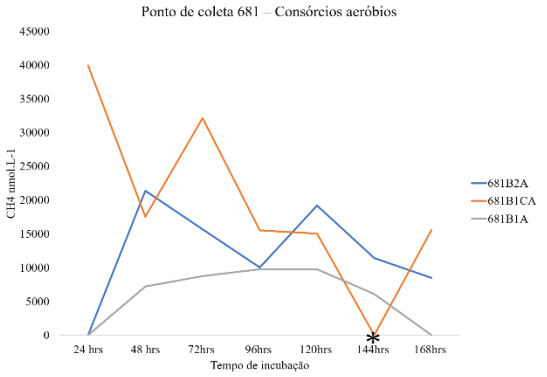
ZEB, S.; GULFAM, S. M.; BOKHARI, H.. Comparative core/pan genome analysis of Vibrio cholerae isolates from Pakistan. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 82, p. 104316, 2020.

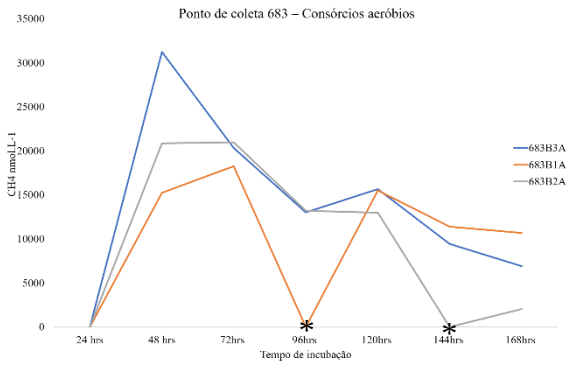
ZEHR, J. P.; CAPONE, D. G. Changing perspectives in marine nitrogen fixation. **Science**, v. 368, n. 6492, p. eaay9514, 2020.

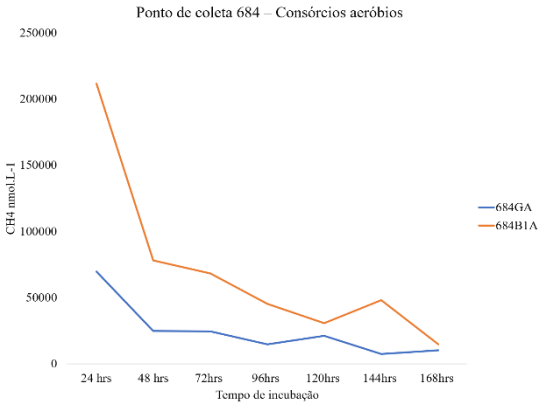
ZHANG, Z.; WU, Y.; ZHANG, X.. Cultivation of microbes from the deep-sea environments. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 155, p. 34-43, 2018.

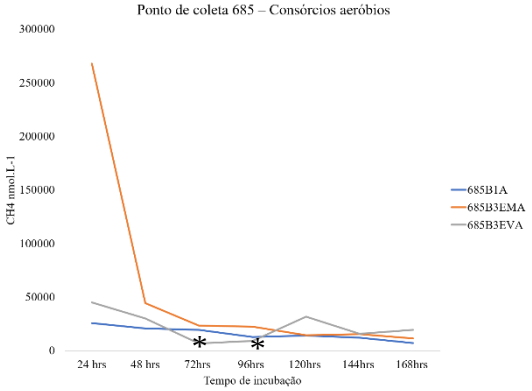
ANEXO

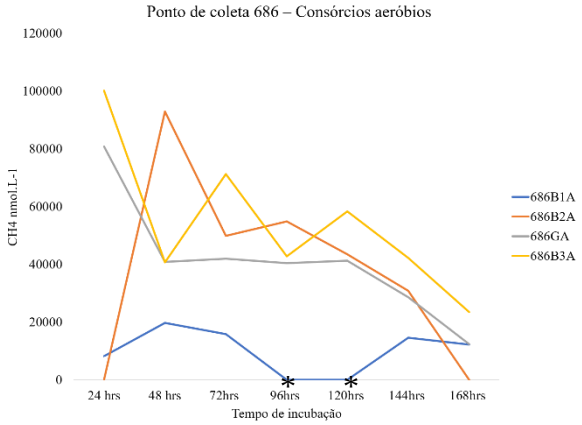
1. Gráficos de metano dos consórcios aeróbios

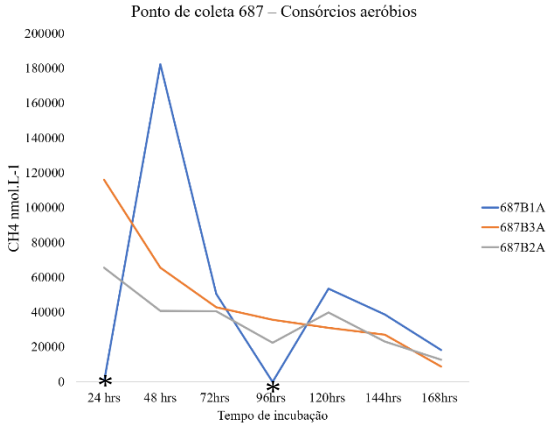


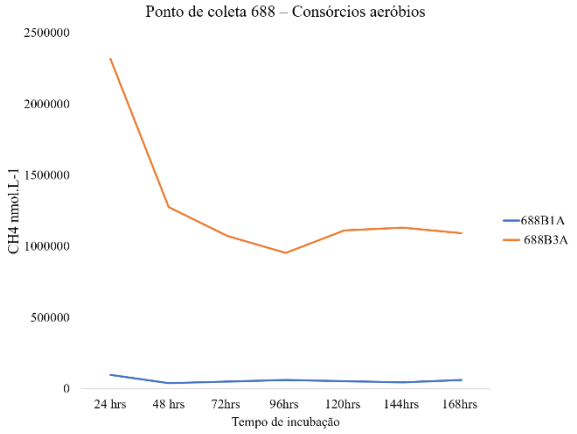


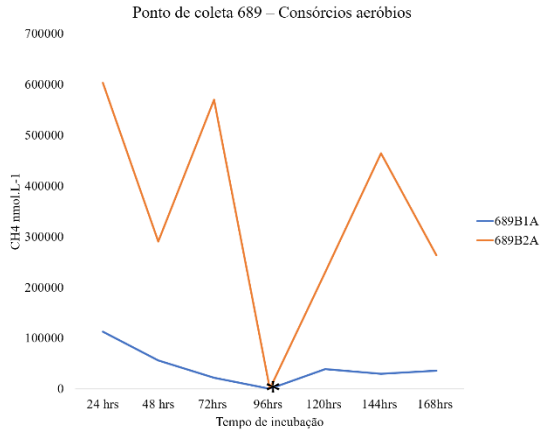


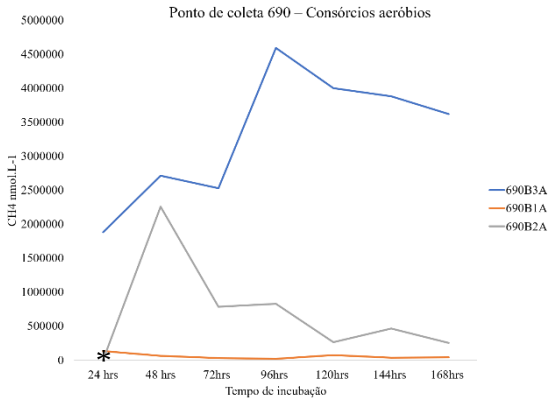


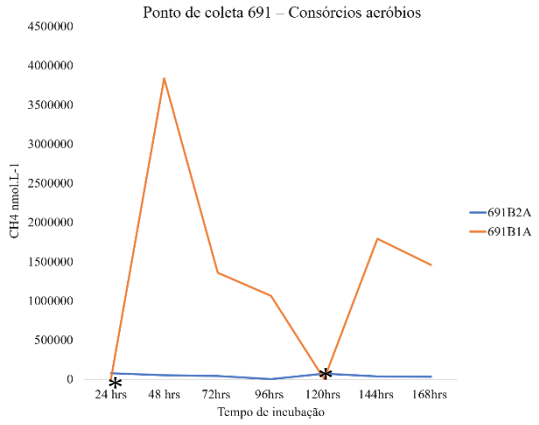




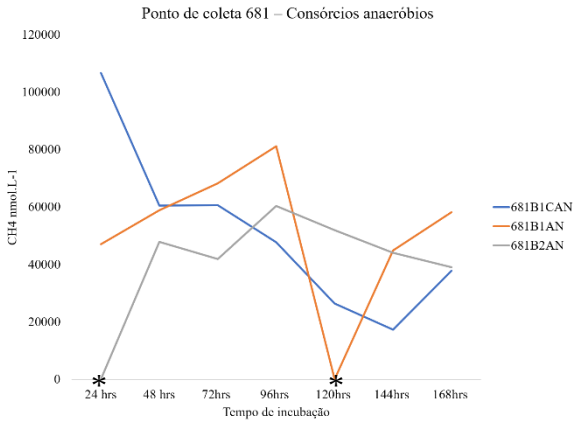


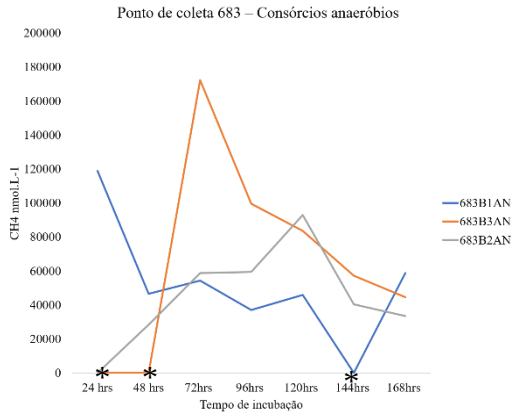


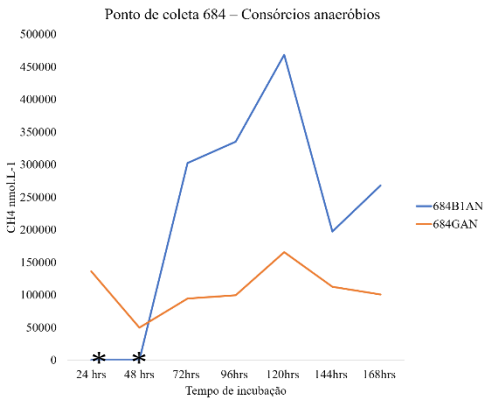


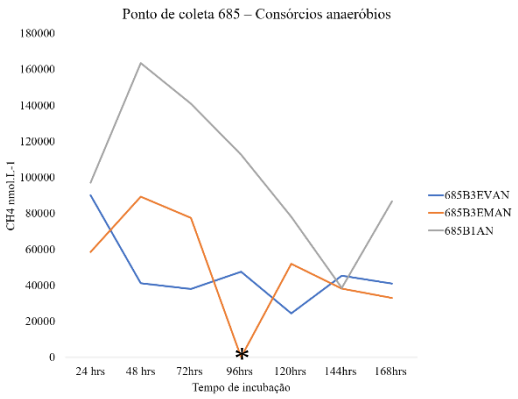


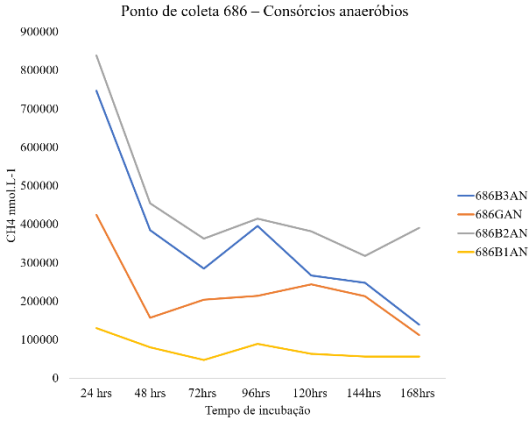
2. Gráficos de metano dos consporcios anaeróbios

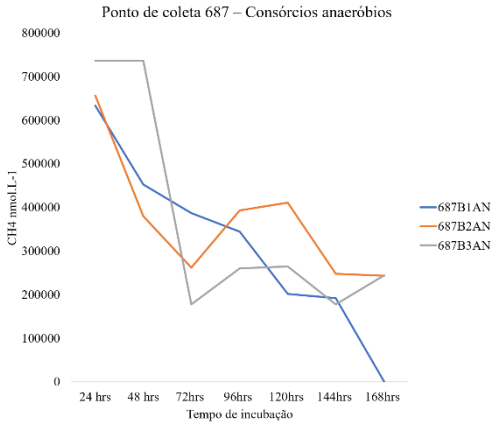


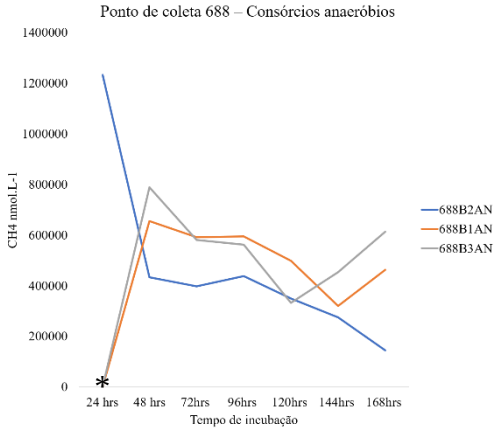


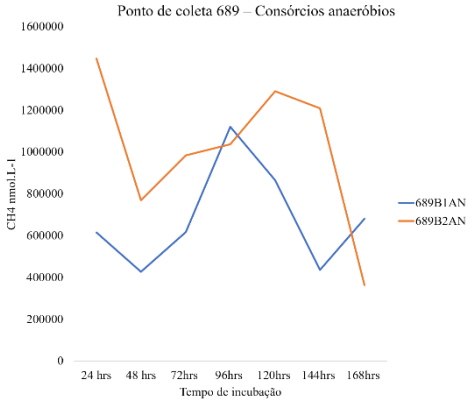

Ponto de coleta 684 – Consórcios anaeróbios
CH4 nmol.L-1
500000
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
684B1AN
684GAN

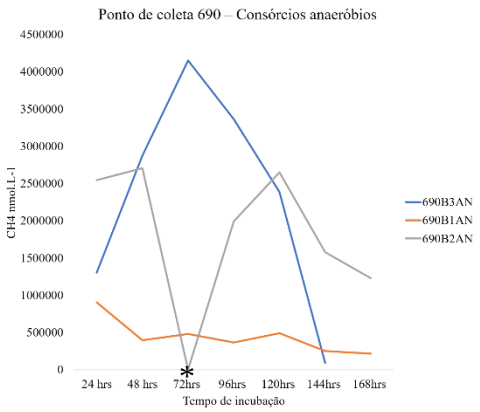

Ponto de coleta 685 – Consórcios anaeróbios
CH4 nmol.L-1
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
685B3EVAN
685B3EMAN
685B1AN

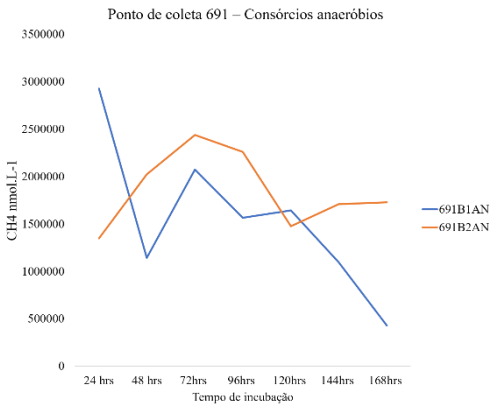

Ponto de coleta 686 – Consórcios anaeróbios
CH4 nmol.L-1
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
686B3AN
686GAN
686B2AN
686B1AN


Ponto de coleta 687 – Consórcios anaeróbios
CH4 nmol.L-1
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
687B1AN
687B2AN
687B3AN


Ponto de coleta 688 – Consórcios anaeróbios
CH4 nmol.L-1
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
688B2AN
688B1AN
688B3AN


Ponto de coleta 689 – Consórcios anaeróbios
CH4 nmol.L-1
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
689B1AN
689B2AN


Ponto de coleta 690 – Consórcios anaeróbios
4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
CH4 nmol.L-1
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
690B3AN
690B1AN
690B2AN


Ponto de coleta 691 – Consórcios anaeróbios
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
CH4 nmol.L-1
24 hrs
48 hrs
72hrs
96hrs
120hrs
144hrs
168hrs
Tempo de incubação
691B1AN
691B2AN