

INFORMAÇÕES GERAIS DO TRABALHO

Título do Trabalho: Prospecção de bactérias do ciclo do nitrogênio do solo no parque nacional da serra da canastra em diferentes áreas sob a influência de incêndios florestais

Autor (es): Amanda Avelina Carvalho Silva⁽¹⁾; Gustavo Augusto Lacorte⁽²⁾; Ricardo Alexandre da Silva⁽³⁾

⁽¹⁾ Aluna do Mestrado Profissional em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental do IFMG; ⁽²⁾ Professor do IFMG – Campus Bambuí; ⁽³⁾ Servidor Técnico do IFMG – Campus Bambuí

Palavras-chave: Queimadas; *nifH*; diazotróficas

Campus: Bambuí

Área do Conhecimento (CNPq): Microbiologia do Solo

RESUMO

A perda de diversidade e habitats em áreas do Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) é um fenômeno natural, mas que tem se intensificado devido a ocorrência de queimadas. Após a ocorrência do fogo, as áreas levam anos para se recuperarem, dependendo de fatores da qualidade do solo, incluindo as bactérias associadas aos processos de ciclagem do Nitrogênio. Nesse sentido, o objetivo geral deste trabalho foi identificar grupos bacterianos fixadores de Nitrogênio em amostras de solo do Cerrado do Parque Nacional da Serra da Canastra - PNSC, impactados e não impactados pelo fogo, gerando uma base de dados como passo introdutório para seu isolamento e utilização posterior no processo de preparação do solo na restauração de áreas degradadas pelo fogo. Para tanto, foram utilizadas amostras de solo de 8 áreas distintas do PNSC com diferentes históricos de impactos pelas queimadas e a partir delas realizadas análises físico-químicas e análises metagenômicas. As amostras analisadas taxonomicamente apresentaram aproximadamente 25% de abundância relativa em nível de gênero. Os gêneros que possuem gene *nifH* e que apresentaram maior abundância relativa foram os *Bradyrhizobium* (2%) e *Burkholderia* (1%), sendo que o gênero *Bradyrhizobium* foi observado presença em todas as amostras das áreas analisadas. Para se obter um parâmetro do efeito das queimadas na população das bactérias do ciclo do nitrogênio foram organizados os dados obtidos pelas bibliotecas metagenômicas com base nos bancos de genes Kegg Pathway e NCBI. Foram observados 18 gêneros distintos no total das amostras analisadas. Na camada de 0-10 cm foi observada uma diversidade de 13 gêneros distintos no total, enquanto que na camada de 10-20 cm foram observados 15 gêneros distintos, sendo comum entre as duas camadas 9 gêneros. Nossos resultados indicam que a riqueza de gêneros potenciais *nifH* apresentam frequências distintas entre as áreas estudadas. Por fim, cabe ressaltar que os resultados gerados contribuirão para o conhecimento básico da diversidade de microrganismos do ciclo do Nitrogênio do solo do PNSC.

INTRODUÇÃO:

A perda de diversidade e habitats em áreas nativas de cerrado do Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC) é um fenômeno natural, mas que tem se intensificado devido a ocorrência de queimadas devido a causas antrópicas. Os registros sobre a ocorrência de incêndios na região da Serra da Canastra são bastante antigos, estes registros demonstram que a ocorrência de fogo na região é bastante antiga e freqüente e, provavelmente, antes da colonização européia já havia uso do fogo por grupos indígenas (IBAMA, 2005).

Segundo Medeiros & Fiedler (2004), o Parque tem sofrido incêndios florestais de grandes dimensões em uma freqüência anual/bienal, de forma que entre 1984 e 1996, apenas 1% da área do Chapadão da Canastra não foi queimada e 92% foram queimadas pelo menos duas vezes.

A escala de impactos causados pelos grandes incêndios de causa antrópica provavelmente está afetando elementos da biota na Unidade, já fragilizados por outros impactos provenientes do entorno, como alteração da qualidade e quantidade de água dos rios, desmatamentos, urbanização, etc (Medeiros, 2002).

Após a ocorrência do fogo, as áreas levam anos para recuperarem parte de sua diversidade num processo de estágios sucessionais que dependem dentre outros fatores da qualidade do solo, incluindo as bactérias associadas aos processos de ciclagem do Nitrogênio. Este grupo de bactérias atua no processo de incorporação de N_2 à biomassa, num processo ecológico chamado de FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio. Estes microrganismos são importantes para o fornecimento de nitrogênio para a maioria das plantas que formam a cobertura vegetal dos solos nativos e, portanto, sua presença contribui para a sua colonização em estágios sucessionais seguintes.

Com a facilidade de obter sequências de DNA, e o florescimento da “Era da Metagenômica Ambiental” tornou possível a obtenção de milhares de sequências de DNA de qualquer bactéria presente numa amostra de qualquer material: água, solo, alimentos, efluentes, etc. Além disso, os sequenciadores de nova geração permitem desvendar o vasto potencial dos microrganismos, cultiváveis e não cultiváveis, incluindo os mais raros, possibilitando a descoberta de mais genes biotecnologicamente interessantes e novas vias metabólicas (CHISTOSERDOVA, 2010).

Diante do exposto o presente trabalho visa identificar grupos bacterianos fixadores de Nitrogênio em amostras de solo do Cerrado do PNSC, impactados e não impactados pelo fogo, gerando uma base de dados como passo introdutório para seu isolamento e utilização posterior no processo de preparação do solo na restauração de áreas degradadas pelo fogo.

METODOLOGIA:

Este trabalho foi realizado no Parque Nacional da Serra da Canastra localizado na área rural do município de São Roque de Minas. O trabalho foi executado durante o plano de manejo integrado do fogo do PNSC, efetuado pelos brigadistas do ICMBio, onde foi feita a primeira execução desse plano que contempla a confecção de aceiros negros.

1- Áreas amostradas

Foram coletadas amostras de oito áreas distintas: (1) maior histórico de queimadas; (2) menor histórico de queimadas; (3) queimada no último ano; (4) queimada há dois anos; (5) antes da queimada; (6) após a queimada (a favor do vento - coletada 30-40 minutos aproximadamente após a queimada); (7) Antes da queimada; (8) Após a queimada (contra o vento – coletada imediatamente após a queimada). Em cada ponto de amostragem foram coletadas amostras de solo de duas profundidades distintas: 0-10 cm (região de rizosfera) de 10-20 cm para análise metagenômica e uma amostra composta de cada uma das áreas de 0-20 cm para análise físico-química. Para determinação das áreas foi utilizado como base o mapeamento do plano de ação do manejo integrado do fogo utilizado pelo ICMBio, que consta do histórico das áreas queimadas do PNSC.

1.1- Amostragem para análises físico-químicas

Em cada ponto de coleta definido foram retiradas cerca de 300g de solo com o auxílio de um trado pedológico (amostra simples) na profundidade de 0-20cm. As amostras foram misturadas em um balde

limpo formando a mistura das amostras simples uma amostra composta para cada uma das áreas em estudo. Para cada área distinta foram coletadas três amostras estabelecendo-se aproximadamente a distância de 30 m uma da outra feita em zigue-zague, totalizando-se 8 amostras compostas.

Aproximadamente 1000g de cada amostra foram destinadas para análises físico-químicas, no laboratório de solos, do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Minas Gerais - Câmpus Bambuí, conforme PROFERT-MG (2005). Foram avaliadas as concentrações de potássio (K), fósforo (P), alumínio (Al), magnésio (Mg) e matéria orgânica (MO), além de pH, hidrogênio + alumínio (H + Al), cálculo de bases intercambiáveis (SB), e textura do solo.

1.2- Amostragem para análises metagenômicas

Em cada ponto de coleta definido (próximo aos pontos de coletas das amostras para análise físico-química) foram abertas covas com o auxílio de enxada e sacho. Para cada área distinta foram coletadas três amostras, dessa forma, totalizaram-se 48 amostras (8 pontos de coleta x 3 repetições x 2 profundidades). Da parede de cada cova, com o auxílio de uma faca previamente desinfetada com álcool 70% e posteriormente flambada foram retiradas amostras de cerca de 50 gramas de solo, sendo transferidas para sacos plásticos esterilizados e condicionadas em caixa de isopor à temperaturas ambiente e posteriormente transportadas para o laboratório de Biologia Molecular do IFMG - Câmpus Bambuí e condicionadas em geladeira com temperatura aproximada de 10° C.

2- Extração de DNA da microbiota do Solo

A extração do DNA total presente nas amostras dos solos, foi realizada utilizando o Kit FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (BIO 101 - MP Biomedicals) - Catálogo n.º (#6560-200) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do produto. O material extraído foi utilizado para construção de bibliotecas de rDNA 16S para análise de diversidade e outros estudos.

3- Análise da integridade e quantificação do DNA metagenômico

A integridade do DNA metagenômico extraído das amostras foi avaliada em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 10% (Tris, Borato e EDTA). Sendo preparadas alíquotas de 5 µL do DNA obtido de cada amostra, mais 2 µL de tampão de corrida 5X e mais 4 µL de corante brometo de etídeo foi submetido a uma eletroforese. Para controle de leitura foi preparada uma alíquota de 5 µL DNA padrão e mais 4 µL de corante brometo de etídeo, também foram submetidas a eletroforese. A análise foi realizada em uma cuba e tampão TBE, durante aproximadamente 2h, à voltagem constante de 80V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta.

4- Parâmetros de PCR para sequenciamento

Um fragmento de 466 pb do rDNA 16S foi amplificado usando os iniciadores: 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) e 806R (GGACTACNNGGTATCTAAT) flanqueando as regiões V3 e V4 (Youngseob et al., 2005) com o código de barras. A amplificação por PCR foi feita utilizando 1 x Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs), 0,5 µM de cada um dos primers 341F e 806R e 100 ng de amostra de DNA. As condições de incubação por PCR foram: 98°C durante 30s, seguidas de 35

ciclos a 98°C durante 5s, 56°C durante 20s e 72°C durante 20s e um tempo de extensão final de 72°C durante 5 minutos.

5- Preparação e sequenciamento de bibliotecas

As bibliotecas de sequenciamento foram geradas usando TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e os códigos de índice foram adicionados. A qualidade da biblioteca foi avaliada no sistema de Fluorômetro Qubit @ 2.0 (Thermo Scientific) e Agilent Bioanalyzer 2100. Por fim, a biblioteca foi sequenciada em uma plataforma Illumina HiSeq 2500 e foram geradas as leituras de 250 pares de bits pareadas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

1- Classificação físico-química do solo do Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC)

As amostras de solo das áreas analisadas foram classificadas como argilosas e arenosas (Tabela 1). As análises das propriedades químicas do solo mostraram que os pH nas áreas de estudo variaram entre 4,7 a 5,4 (Tabela 1). As concentrações de nutrientes das amostras de cada uma das áreas foram analisadas, no entanto, ainda não foram correlacionadas com os resultados de metagenômica.

Tabela 1- Classificação físico-química dos solos das áreas analisadas do PNSC

| ÁREA DE COLETA | CLASSIFICAÇÃO DO SOLO | GRUPOS DE AMOSTRAGEM | pH |
|------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----|
| 1. Maior histórico de queimadas | Argilosa | T1RP e T1S | 5,2 |
| 2. Menor histórico de queimadas | Arenosa | T2RP e T2S | 5,0 |
| 3. Queimada no último ano | Argilosa | T3RP e T3S | 5,5 |
| 4. Queimada há dois anos | Argilosa | T4RP e T4S | 5,4 |
| 5. Antes da queimada | Arenosa | T5RP e T5S | 5,4 |
| 6. Após a queimada | Arenosa | T6RP e T6S | 5,4 |
| 7. Imediatamente antes da queimada | Arenosa | T7RP e T7S | 5,1 |
| 8. Imediatamente após a queimada | Arenosa | T8RP e T8S | 4,7 |

2- Análise de Bioinformática e Metagenômica

Através do sequenciamento da região rDNA 16S foram geradas 2.727.107 de sequências totais após filtragem e remoção das quimeras. Posteriormente para padronizar o número de sequências em todas as amostras foi realizada uma rarefação em 23.902 sequências por amostra, totalizando 1.147.296 sequências, sendo obtidas 5666 OTUs.

Os grupos de amostragem foram organizados quanto as áreas de coleta e camadas de amostragem. Onde a camada de 0-10 cm de solo representa a rizosférica (RP) e a camada de 10-20 cm representa o solo (S).

2.1- Abundância Relativa de Gêneros

As amostras analisadas taxonomicamente apresentaram aproximadamente 25% de abundância relativa em nível de gênero.

O gênero que apresentou maior abundância foi o *Acidibacter* com 4%, destacando-se também os gêneros *Bradyrhizobium* (2%) e *Burkholderia* (1%) que possuem o gene *nifH*.

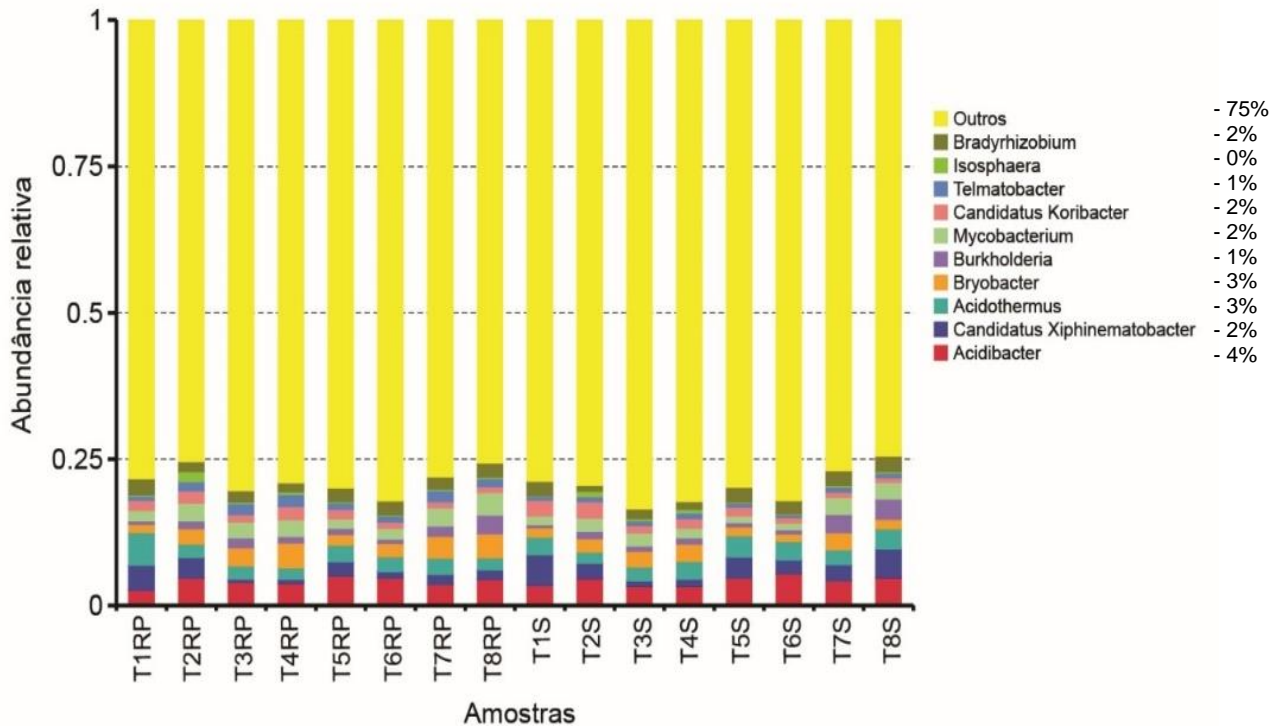


Figura 1- Abundância Relativa dos Gêneros.

2.2- Potenciais gêneros gene *nifH*

Não foi possível obter nenhuma sequência do gene da nitrogenase redutase (*nifH*) devido ao sequenciamento ter sido realizado através do gene 16S rDNA. Dessa maneira, para se obter um parâmetro do efeito das queimadas na população das bactérias do ciclo do nitrogênio foram organizados os dados obtidos pelas bibliotecas metagenômicas com base nos bancos de genes Kegg Pathway e NCBI. Dessa forma, gêneros e número de espécies potenciais gene *nifH* das amostras analisadas seguem listadas conforme a Tabela 2.

Foram observados 18 gêneros distintos no total das amostras analisadas. Na camada de 0-10 cm foi observada uma diversidade de 13 gêneros distintos no total, enquanto que na camada de 10-20 cm foram observados 15 gêneros distintos, sendo comum entre as duas camadas 9 gêneros. Vários autores têm relatado as queimadas como prejudiciais às bactérias fixadoras de N, ocasionando diminuição da diversidade, riqueza e biomassa das comunidades microbianas do solo (YEAGER *et.al*, 2005; KENNEDY *et. al.*, 2010; TYSON *et.al*, 2004). Nossos resultados indicam que a riqueza de gênero potenciais gene *nifH* apresentam freqüências distintas entre as áreas estudadas.

Tabela 2- Gêneros e espécies potenciais gene *nifH* da microbiota do solo do PNSC.

| TRATAMENTO (RIZOSFERA DE CAPIM FLECHA 0-10) | GRUPOS | GÊNEROS POTENCIAIS <i>nifH</i> | *Número de Espécies potenciais <i>nifH</i> |
|--|--------|--|--|
| 1. Maior histórico de queimadas | T1 RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Ruminococcus</i> | 10 2 1 |
| 2. Menor histórico de queimadas | T2 RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Burkholderia</i> <i>Microcoleus</i> <i>Treponema</i> | 10 18 4 1 2 |
| 3. Queimada no último ano | T3 RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Paenibacill</i> <i>Treponema</i> <i>Ruminococcus</i> | 10 18 2 1 |
| 4. Queimada há dois anos | T4 RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Clostridium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Microcoleus</i> | 10 22 4 1 |
| 5. Antes da queimada | T5 RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Fusobacterium</i> , <i>Paenibacillus</i> <i>Pelosinus</i> <i>Methylobacterium</i> | 10 4 18 2 2 |
| 6. Após a queimada | T6 RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Clostridiu</i> <i>Ruminiclostridium</i> <i>Burkholderia</i> , | 10 2 2 4 |
| 7. Imediatamente antes da queimada | T7 RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Clostridium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Burkholderia</i> <i>Pelosinus</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Thermodesulfobivrio</i> <i>Desulfobacca</i> . | 10 22 5 4 2 2 1 1 |
| 8. Imediatamente após a queimada | T8RP | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Clostridium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Methylobacterium</i> | 10 22 18 2 |
| | | | |
| TRATAMENTO (SOLO 10-20) | GRUPOS | GÊNEROS POTENCIAIS- <i>nifH</i> | *Número de Espécies potenciais <i>nifH</i> |
| 1. Maior histórico de queimadas | T1S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Gluconacetobacter</i> <i>Hyphomicrobium</i> | 10 2 1 |
| 2. Menor histórico de queimadas | T2S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Desulfobivrio</i> <i>Desulfobacca</i> | 10 18 9 1 |
| 3. Queimada no último ano | T3S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Desulfobivrio</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Ruminiclostridium</i> <i>Desulfosporosinus</i> <i>Microcoleus</i> . | 10 9 2 2 3 1 |
| 4. Queimada há dois anos | T4S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Clostridium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Desulfomonile</i> . | 10 22 18 1 |
| 5. Antes da queimada | T5S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Clostridium</i> <i>Paenibacillus</i> | 10 22 18 |
| 6. Após a queimada | T6S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Desulfomonile</i> <i>Treponema</i> | 10 1 2 |
| 7. Imediatamente antes da queimada | T7S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Burkholderia</i> <i>Treponema</i> | 10 18 2 2 |
| 8. Imediatamente após a queimada | T8S | <i>Bradyrhizobium</i> <i>Clostridium</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Pelosinus</i> . | 10 22 18 2 |

CONCLUSÕES:

Através o presente estudo foi possível caracterizar taxonomicamente diferentes gêneros presentes nas áreas preservadas (menor histórico de queimadas) e nas áreas submetidas a queimadas em tempos distintos. E com base nos bancos de genes Kegg Pathway e NCBI foi gerada uma tabela de listagem com os possíveis gêneros e número de espécies potenciais gene *nifH* presentes no solo do Parque Nacional da Serra da Canastra. Assim, pode-se sugerir que os resultados gerados contribuirão para o conhecimento da diversidade de microrganismos do ciclo do Nitrogênio do solo do PNSC e com a análise dos dados ainda a serem estudados possibilitarão, além disso, compreender o efeito do fogo na dinâmica das comunidades microbianas do solo e identificação de microrganismos resistentes e suscetíveis ao fogo e seu papel nas comunidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

CHISTOSERDOVA, Ludmila. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 10, p. 1351-1359, 2010.

IBAMA, 2005. Plano de manejo do parque Nacional da Serra da Canastra. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

KENNEDY N, EGGER KN. Impact of wildfire intensity and logging on fungal and nitrogen-cycling bacterial communities in British Columbia forest soils. *For Ecol Manag* 260:787–794, 2010.

MEDEIROS, M. B. Manejo de fogo em unidades de conservação do cerrado. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, v. 10, n. 1, p. 76-89, 2002.

MEDEIROS, Marcelo Brilhante de; FIEDLER, Nilton Cezar. Incêndios florestais no Parque Nacional da Serra da Canastra: desafios para a conservação da biodiversidade. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 2, p. 157-168, 2004.

PROFERT-MG. Programa Interlaboratorial de Controle de Qualidade de Análise de Solo: Manual do laboratorista. Minas Gerais, 2005. 33p.

TYSON G.W.; CHAPMAN J.; HUGENHOLTZ P.; ALLEN E.E.; RAM R.J.; RICHARDSON; P.M., SOLOVYEV V.V; RUBIN E.M.; ROKHSAR DS; BANFIELD JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37–43, 2004.

YEAGER C.M., NORTHUP DE, GROW C.C., BARNS S.M., KUSKE C.R. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl Environ Microbiol* 71:2713–2722, 2005.