



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ANA LETÍCIA HOLANDA MORAIS

**AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE NUVENS EM
METAGENOMA DE SOLO DO SEMIÁRIDO POTIGUAR**

MOSSORÓ

2019

ANA LETÍCIA HOLANDA MORAIS

**AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE NUVENS EM
METAGENOMA DE SOLO DO SEMIÁRIDO POTIGUAR**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Nome Completo, Prof. Dr. Lívio Carvalho de Figueirêdo.

MOSSORÓ

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M827 Holanda Moraes, Ana Letícia .
a Avaliação de genes relacionados à formação de
 Nuvens em metagenoma de solo do Semiárido
 potiguar / Ana Letícia Holanda Moraes. - 2020.
 34 f. : il.

 Orientador: Lívio Carvalho de Figueirêdo.
 Monografia (graduação) - Universidade Federal
 Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
 2020.

 1. DmdA. 2. Metagenoma. 3. Nuvens. I. Carvalho
 de Figueirêdo, Lívio , orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

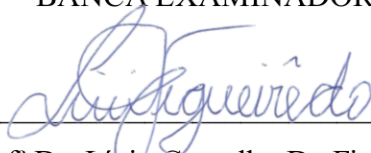
ANA LETÍCIA HOLANDA MORAIS

**AVALIAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE NUVENS EM
METAGENOMA DE SOLO DO SEMIÁRIDO POTIGUAR**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semiárido (UFERSA), como
exigência final para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

APROVADO EM 07 / 02 / 2020

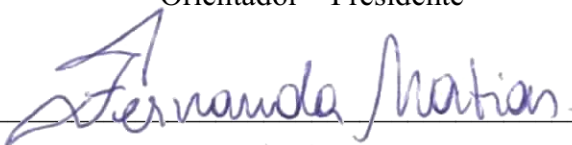
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr. Lívio Carvalho De Figueirêdo

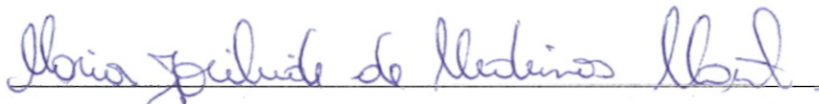
– UFERSA

Orientador – Presidente



Prof^a Dra. Fernanda Matias - UFERSA

Primeiro Membro



Prof^a Dra. Maria Jocileide de Medeiros Marinho

Segundo Membro

A minha mãe, **Ana Léa**, ao meu pai, **Jair
Morais**, e a minha irmã, **Ana Carolina** por toda
a confiança em mim depositada, por todo o
esforço para ver meus sonhos realizados e pela
presença no meu dia a dia, mesmo estando
fisicamente distantes.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me dar forças para chegar até aqui. Sem a minha fé, eu nada seria.

À minha mãe, Ana Léa Nocrato Holanda Moraes, por todo o amor que me deu desde o dia que descobriu que eu iria vir a esse mundo. Eu sou extremamente grata por Deus ter me enviado para ser sua filha.

Ao meu pai, Jair de Souza Moraes, por dedicar todos os seus esforços do dia a dia (que não são poucos) em prol do meu futuro. Obrigada, pai, por me amar tanto assim!

À minha irmã, Ana Carolina Holanda Moraes, por ser a pessoa que eu mais amo nessa vida. Irmã, tudo o que eu faço é pensando em você e todo esse trabalho é para você. Te amo!

Aos meus padrinhos, Eugenio e Silvanéria, por serem os melhores padrinhos que alguém poderia ter. Obrigada por me ajudarem a chegar até o fim desse percurso. Amo vocês de todo o meu coração.

À Prof. Dra. Fernanda Matias, que me acolheu logo na primeira semana dentro da Universidade. Fernanda, obrigada pelos ensinamentos e pela amiga que se tornou. Todo esse trabalho é graças a você.

Ao Prof. Dr. Lívio Figueiredo pelo suporte acadêmico, mas principalmente pela amizade que criamos. Lívio, obrigada pelas risadas e por estar ao meu lado nos momentos que mais precisei.

Aos meus colegas de turma, por dividirmos os desesperos nas vésperas de prova. Tudo se tornou mais fácil graças a vocês.

Aos meus melhores amigos, de infância, que mesmo na distância conseguiram se fazer presentes na minha vida e jamais me abandonaram. Fortaleza continua sendo meu lugar preferido no mundo por conta de vocês. Victória, Mariana, Lucas, João Pedro, Rhamon, Rafael, Cauã, Matheus, obrigada por todo o amor.

Às minhas companheiras de rotina diária, obrigada por entenderem quando eu não estava bem para dar bom dia, mas, principalmente, pela companhia nessa nova cidade. Todas as nossas risadas me fortaleceram a cada dia. Milena e Victória, além de família, vocês se tornaram minhas confidentes. Ellen e Letícia, vocês jamais sairão do meu coração.

À Paula e ao Sidarque por serem a alegria de Mossoró. Obrigada por me acolherem com tanto amor e paciência.

À Vitória Livia e sua família por serem e continuarem sendo a minha família em Mossoró. Vi, o meu coração explode de gratidão por você. Te amo.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente Phellipe e Elias. Sem vocês eu com certeza ainda não saberia colocar a amostra no poço. Obrigada pelas horas dedicadas a mim.

À Prof. Dra. Jocileide por sertão doce e delicada. Agradeço por aceitar avaliar meu trabalho.

À toda a minha família que torce e ora por mim a cada dia.

A todos que me ajudaram a chegar até aqui.

Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar".

(Josué 1:9)

RESUMO

Regiões semiáridas são conhecidas pelo clima seco, altas temperaturas, deficiência hídrica e grandes imprevisibilidades diante de seus índices pluviométricos. A teoria de Gaia afirma que o planeta Terra é visto como uma comunidade de organismos vivos capazes de autorregular os sistemas existentes, inclusive os índices pluviométricos ideais para a sobrevivência de suas populações. Com base nisso, a hipótese de CLAW propõe que algas planctônicas exercem influência no clima global por um mecanismo de retroalimentação negativo no qual sintetizam a exsudação de um composto de enxofre chamado DMSP (dimetilsulfonopropionato). Esse mecanismo metabólico está diretamente ligado com o gene *dmdA* e a família de genes *ddd*. A ideia de que o semiárido já foi banhado pelo oceano a milhares de anos reforça a hipótese de que essas bactérias, originalmente encontradas em ambiente marinho, e responsáveis pela metabolização do DMSP, ainda estejam presentes no solo por meio de adaptação diante da regressão do mar. Diante disso, o DNA metagenômico do solo foi extraído e sequenciado pela tecnologia de nova geração da Illumina utilizando como base para a identificação dos organismos o gene rDNA 16S. Além disso, foram testados sete grupos de *primers*, desenhados anteriormente, para selecionar o melhor mediante a amplificação do gene *DmdA*. As análises do sequenciamento revelaram que no solo existem exemplares de microrganismos que estão de acordo com a literatura das análises marinhas, afirmando a hipótese de adaptação dos mesmo em solo. Além disso, foi possível selecionar sequencias de *primers* capazes de amplificar o *DmdA* e relacioná-los com grupos de microrganismos específicos.

Palavras-chaves: *DmdA*; Metagenoma; Nuvens

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 O Semiárido e as Alterações Climáticas	14
2.2 Microbioma do Solo.....	14
2.3 Metagenoma	15
2.4 Teoria De Gaia e Hipótese De Claw	16
2.5 DMSP e DMS	17
2.6 Dmda e Família Ddd.....	18
2.7 A Biogeografia Do Semiárido	19
3. OBJETIVOS	21
3.1. Objetivos Gerais	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4.MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Coleta Das Amostras	22
4.2 Extração Do Material Metagenomico	22
4.3 Avaliação Do DNA Metagenomico.....	22
4.4 Sequenciamento Do DNA.....	23
4.4.1 Produção Dos <i>Amplicons</i>	23
4.4.2 Análise De Qualidade e Quantificação Dos Produtos Da PCR.....	23
4.4.3 Mistura e Purificação Dos Produtos Da PCR.....	23
4.4.4 Preparação Das Bibliotecas e Sequenciamento	24
4.5 Análise Dos Dados	24
4.5.1 Montagem das Sequências e Controle de Qualidade.....	24
4.5.2 Grupamentos OTU e Anotação das Espécies	24
4.6 Amplificação dos genes codificantes de DMSP liases	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Coleta das amostras.....	28

5.2 Extração de DNA Metagenômico do Solo	28
5.3 Amplificação do <i>dmdA</i>	28
5.4 Bioinformática	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31

1. INTRODUÇÃO

Ao se falar de dimensões e diversidade, o Brasil é um país que ganha destaque. Atualmente, possui um território de 8.516.000 km² subdividido em cinco regiões distintas, sendo elas o Norte, o Nordeste, o Centro-Oeste, o Sudeste e o Sul. Devido à estrutura continental do país, cada região possui suas características distintas, divergindo tanto na cultura quanto no clima, na fauna e na flora (MARENGO, 2008).

Dentre essas localidades, o Nordeste abrange cerca de 1.600.000 km² do território nacional e devido à sua localização geográfica é caracterizada por possuir regiões semiáridas conhecidas pelo clima seco, altas temperaturas, deficiência hídrica e grandes imprevisibilidades diante de seus índices pluviométricos. O seu bioma é único e de grande biodiversidade, conhecido como caatinga, possuindo vegetação extremamente adaptada às condições climáticas da região (MARENGO, 2008).

A teoria de Gaia afirma que o planeta Terra é visto como uma comunidade de organismos vivos capazes de autorregular os sistemas existentes, inclusive os índices pluviométricos ideais para a sobrevivência de suas populações (LEAO; MAIA, 2010). Com base nisso, a hipótese de CLAW veio para complementar e propor que algas planctônicas exercem influência no clima global por um mecanismo de retroalimentação negativo no qual sintetizam a exsudação de um composto de enxofre chamado DMSP (dimetilsulfonopropionato) (NUNES et. al, 2009). O DMSP é metabolizado por bactérias marinhas por meio da via de desmetilação e da clivagem, dando origem ao MeSH (metaniteol) e ao DMS (dimetilsulfito). O MeSH é um composto de enxofre reduzido que retorna ao bacterioplâncton, auxiliando no seu metabolismo. Já o DMS vem sendo considerado a maior fonte de enxofre da atmosfera. Esse mecanismo metabólico está diretamente ligado com o gene *dmdA* e a família de genes *ddd* (BULLOCK et al., 2017).

A ideia de que o semiárido já foi banhado pelo oceano a milhares de anos reforça a hipótese de que essas bactérias, originalmente encontradas em ambiente marinho, e responsáveis pela metabolização do DMSP ainda estejam presentes no solo por meio de adaptação diante da regressão do mar (BICUDO, 2003).

O presente trabalho busca avançar em pesquisas e elucidar o mecanismo molecular do processamento do DMSP, de forma a torná-lo disponível como ferramenta em busca de soluções das grandes variações climáticas que aumentam o problema de escassez hídrica da região Nordeste.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O Semiárido e as alterações climáticas

O Nordeste brasileiro compreende um território com cerca de 1.600.000 km² do território nacional. Aproximadamente 62% de sua área é ocupada pelo polígono das secas, uma região semiárida que abrange 940.000 km². Nessa região estão presentes nove estados que há séculos enfrentam problemas crônicos de falta de água e índices pluviométricos abaixo dos 800 mm por ano (MARENGO, 2008).

As regiões semiáridas são conhecidas pela grande aridez do clima, a deficiência hídrica e grandes imprevisibilidades diante de seus índices pluviométricos, o que acaba afetando a riqueza dos solos e reduz a capacidade de a região crescer na agricultura e pecuária (SILVA, 2003). Em consequência do complicado comportamento das chuvas no Semiárido e da reduzida capacidade de absorver água na maioria dos solos, grande parte da população é altamente dependente da água de chuva, de sua captação e de seu armazenamento, uma vez que os rios apresentam regime temporário, com exceção do rio São Francisco, que se destaca em meio à grande área seca (MOURA et al, 2016).

A grande insuficiência e irregularidade das chuvas refletem claramente no modelo de sua paisagem. A vegetação característica é a caatinga, que na língua indígena quer dizer “mata branca”. Por sua vez, a caatinga é um bioma de alta diversidade e complexidade, caracterizado com plantas xerófilas de folhas pequenas, o que diminui o poder de transpiração. Além disso, os caules e raízes também são extremamente adaptados para acumular água depositada durante a época de chuvas (SILVA, 2003).

Além das dificuldades já normalmente existentes no semiárido, as mudanças climáticas que vêm ocorrendo no mundo e, conseqüentemente, no Brasil, prometem intensificar o problema das secas que afetam a região Nordeste. O combo de alterações no clima e falta de chuva acompanhada das altas temperaturas e taxas de evaporação podem levar a uma crise catastrófica, afetando principalmente a população mais vulnerável, como os agricultores de subsistência (MARENGO, 2008).

2.2 Microbioma do Solo

Devido à sua natureza heterogênea, complexa e dinâmica, o solo contém a maior diversidade dentre os habitats terrestres. (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006). Em relação à diversidade genética, o solo é o local de inúmeras populações microbiológicas, sendo

reservatório final da maioria delas. Nesse contexto, o estudo dos organismos que vivem no solo busca principalmente avaliar as atividades metabólicas, o fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes que os microrganismos que ali habitam fornecem (MATTOS, 2016).

Apesar de toda a biodiversidade que existe no solo, esse ambiente apresenta certas limitações para sua avaliação. O fato é que após uma coleta de solo para o seu aprofundamento, a maior parte dos microrganismos não é cultivável pelos métodos tradicionais. Assim, o avanço da biologia molecular tenta alcançar técnicas que detectem a real diversidade do solo, levando a descobertas de novas espécies e novos compostos que podem advir das mesmas (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006).

Em questão de classificação, os grupos funcionais dos microrganismos que habitam ambientes terrestres podem ser subdivididos de acordo com suas atuações nos processos biológicos, seja nos ciclos de carbono, nitrogênio ou enxofre, os degradadores de polímeros, dentre outros (MESQUITA, 2011).

Vale salientar que a presença de microrganismos no solo é diretamente relacionada a alguns fatores ambientais e com os limites de suas condições genéticas. A dominância de um organismo no ambiente depende da resposta de suas reações fisiológicas e das condições ambientais que ali predominam (MOREIRA, SIQUEIRA, 2006). Assim, em um ambiente tão complexo quanto o solo, a comunidade microbiana rege e é regida fortemente por fatores como a umidade, temperatura, aeração e pH (CARDOSO et al., 1992). Desta forma, a umidade está relacionada com a capacidade de retenção da água no solo, atuando profundamente no equilíbrio microbiológico de bactérias aeróbias. Já as faixas de temperatura determinam as taxas de crescimento e as atividades bioquímicas dos microrganismos. Além disso, as variações de pH também os afetam diretamente, pois valores extremos são considerados desfavoráveis para o crescimento da maioria deles (CARDOSO et al., 1992).

2.3 Metagenoma

Diante de toda diversidade microbiana presente nos mais diversos habitats da Terra, os microrganismos estão diretamente envolvidos no clima, na geologia, na geoquímica e na evolução biológica (GOULART et. al, 2017). Nessa perspectiva, uma melhor compreensão sobre os mesmos pode direcionar novas pesquisas e grandes descobertas. Buscando o mais abrangente conhecimento sobre os microrganismos no meio ambiente surgiu a metagenômica, que tem como objetivo investigar as moléculas de DNA de uma mistura de populações

microbianas extraídas de uma amostra ambiental, elucidando novos aspectos do microboma (FILHO, 2010).

Sabe-se que os números de células cultiváveis são inferiores ao número de células viáveis e, nesse contexto, durante muito tempo, estudiosos ignoravam o desafio de identificar os organismos microbiológicos não cultiváveis. Porém, em meados dos anos 70, alguns pesquisadores persistiram em buscar essas informações e atualmente, com os avanços da microbiologia ambiental, utilizando métodos independentes de cultivo, a possibilidade de conhecer microrganismos antes ditos como “não-cultiváveis” foi estabelecida. Dessa forma, a metagenômica estuda a composição e a fisiologia das mais diversificadas comunidades microbiológicas. Em geral, o estudo dessas comunidades pode vir a oferecer a descoberta de novos genes, de novas rotas metabólicas e de produtos de interesse biotecnológico (FILHO, 2010).

Abrangendo os diversos tipos de habitats, a metagenômica consegue elucidar o genoma das micropopulações do solo e sedimentos de água por meio da análise de genes considerados “relógios moleculares”, tais como os RNAs ribossômicos 16S rRNA e 18S rRNA, devido aos mesmos apresentarem regiões conservadas que podem ser utilizadas em estudos comparativos. Ao conhecer o genoma de novos microrganismos, os estudos biotecnológicos estão cada vez mais avançados no alcance de enzimas e biomoléculas de interesse comercial. Essas biomoléculas podem ser identificadas pela construção de bibliotecas oriundas de ácidos nucleicos isolados. Para a construção das bibliotecas gênicas, segue-se, muitas vezes, a metodologia clássica: isolamento de DNA da amostra ambiental; amplificação gênica da região de interesse, ligação do inserto em vetor específico; inserção do vetor e clonagem do DNA em célula hospedeira para construção da biblioteca metagenômica; e rastreamento dos clones na biblioteca. Essa metodologia pode auxiliar na elucidação da análise molecular de enzimas chaves nos mais diversos ciclos biogeoquímicos, principalmente, quando não se tem certeza a respeito da sequência dos insertos obtidos (GOULART, 2017).

2.4 Teoria de Gaia e Hipótese de CLAW

A teoria de Gaia advém dos estudos de um grande médico e cientista chamado James Lovelock (1965), onde o mesmo afirmou que o planeta é visto como uma comunidade de organismos vivos capazes de autorregular os sistemas existentes. A teoria leva consigo a ideia de que a química, a física e a biologia fazem do planeta Terra um organismo vivo que é capaz de adaptar sua temperatura e elementos químicos de forma que se tornem ideais para a presença

das mais diversas formas de vida. Já em 1970, Lynn Margulis destacou a grande importância dos microrganismos na propagação das condições ideais da vida no planeta, baseando-se no fato de que no início da existência da Terra, apenas microrganismos a habitavam. Essa constatação reforça a ideia de que rochas e seres vivos buscaram promover o equilíbrio próximo ao ideal para o futuro crescimento vegetal (LEAO; MAIA, 2010).

Complementando a Teoria de Gaia, em 1987 chegou à comunidade científica a Hipótese de CLAW. De acordo com NUNES et. al (2009), essa hipótese, como ficou conhecida pela junção das iniciais dos nomes de seus criadores, propõe um “mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativo no qual algas planctônicas exercem influência no clima global pela síntese e exsudação de um composto de enxofre.” Ao chegar na atmosfera, o enxofre sofre oxidação e origina partículas que são favoráveis à condensação de água e formação de nuvens, como é o caso do DMSP (dimetilsulfonopropionato) do MesH (metaniteol). Tais nuvens formadas ainda refletem uma fração da radiação solar incidente, em um mecanismo completo e complexo de retroalimentação entre o fitoplâncton marinho e a busca pelo clima ideal da Terra.

2.5 DMSP e DMS

Identificado pela primeira vez em 1948, o dimetilsulfonopropionato (DMSP) é um composto considerado como recurso valioso para os organismos marinhos e parte fundamental do ciclo global do enxofre (CHALLENGER; SIMPSON, 1948; VAN DUYL et al., 1998; STEFELS et al., 2007). Essa molécula é produzida pelo fitoplâncton, especialmente dinoflagelados e cocolitóforos (KELLER, 1989). Nesses organismos o DMSP atua como um composto anti-estresse, sendo osmoprotetor, antioxidante e controlador do excesso de energia celular (KARSTEN et al., 1996). Stefels et al. (2007) levantaram a hipótese de que o DMSP pode mostrar-se como um mecanismo para a eliminação do excesso de enxofre reduzido quando o carbono e o nitrogênio aparecem de forma limitada.

Além de suas características fundamentais para a vida marinha, o DMSP também é considerado peça fundamental para a regulação climática do planeta por meio da sua transformação em outra molécula, o sulfato de dimetilo (DMS), que consiste em um composto altamente volátil e parte dos oceanos para a atmosfera, atuando como núcleo de condensação de nuvens e influenciando na regulação do clima (PAIVA et. al, 2013). Por sua vez, os núcleos de condensação de nuvens (NCN) consistem em pequenas partículas que fornecem superfícies ideais para a condensação da água. A presença desses núcleos é considerada de extrema importância, pois sem eles o desenvolvimento de nuvens necessita de uma umidade relativa a

mais de 100%. Alguns exemplos mais comuns incluem pequenos cristais de compostos de sulfato e nitrato (TIEDT, 2015).

Dessa forma, após ser liberado na água do mar, o DMSP pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas distintas: a da desmetilação e a da clivagem. Na via da desmetilação, essa molécula é metabolizada e transformada em MeSH, um composto de enxofre reduzido que retorna ao fitoplâncton, auxiliando no metabolismo do mesmo e, de certa forma, auxiliando na formação do DMS. Já a via da clivagem dá origem direta ao DMS (BULLOCK et al., 2017). A produção de DMS ocorre principalmente através da atividade de uma enzima conhecida como DMSP-liase (Thierstein e Young, 2004). A ação dessa enzima foi primeiramente relatada em coccolitóforos e dinoflagelados. Entretanto, a sua elucidação molecular ainda não é muito tão compreendida (Curson et al., 2011; Franklin et al., 2010). Esses mecanismos são controlados molecularmente e, respectivamente, pelo gene *DmdA* e a família de genes *ddd*.

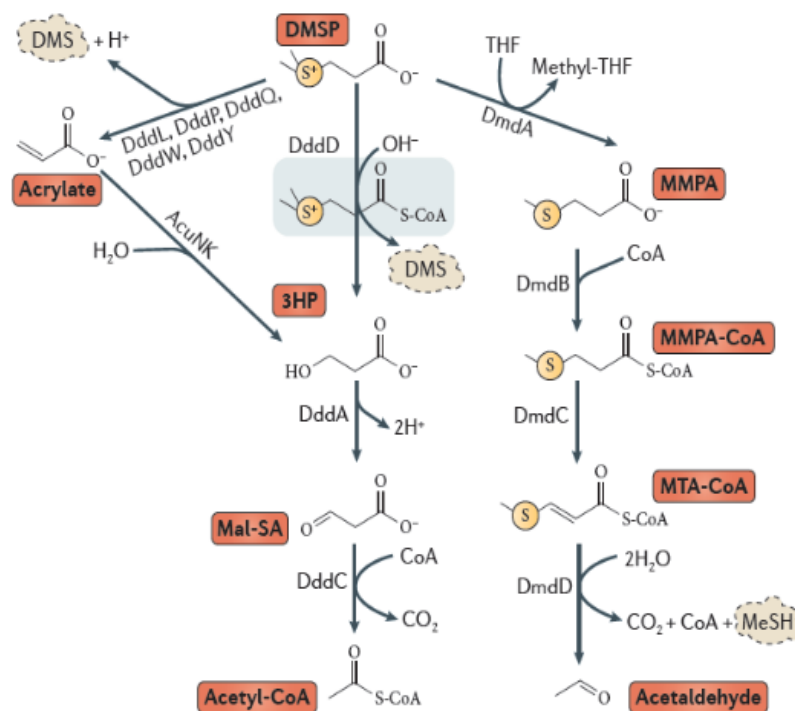
2.6 *DmdA* e família *ddd*

O mecanismo molecular de metabolização (Figura 1) do DMSP recentemente vem sendo foco de pesquisas, buscando ser melhor elucidado.

Atualmente, sabe-se que a clivagem enzimática do DMSP para a formação do DMS por bactérias é realizada por meio das DMSP liases. Essas enzimas são codificadas por meio da família de genes *ddd*. Até o momento, são conhecidos 7 genes distintos, sendo eles *dddD*, *dddK*, *dddL*, *dddP*, *dddQ*, *dddY* e *dddW* (CURSON et al., 2011).

Já na via da desmetilação encontra-se presente o *dmdA*, um gene altamente abundante que codifica o DMSP e medeia o primeiro passo da mesma (VARALJAV et. al, 2009). Dessa forma, afirma-se que o gene *dmdA* possui um papel ecológico importante nas comunidades de bacterioplânctons, fornecendo a ferramenta genética para a decifração do destino da DMSP e de toda a via de desmetilação a qual está inserida (VARALJAV et. al, 2009).

Figura 1: Rota bioquímica de degradação de DMSP com ênfase aos três grupos de enzimas DMSP liases de acordo com a rota metabólica adotada pelo microrganismo. Grupo 1: *DddL*, *DddP*, *DddQ*, *DddW* e *DddY*. Grupo 2: *DddD*. Grupo 3: *DmdA*



Fonte: (CURSON *et al.*, 2011).

2.7 A Biogeografia do semiárido

Atualmente, a área que abrange a região Nordeste do Brasil é composta por um ambiente de secas frequentes, calor intenso e plantação característica marcada por plantas adaptadas à baixa concentração de água, entretanto, nem sempre foi assim. Hipóteses afirmavam que há cerca de 300 milhões de anos, essa região era recoberta por geleiras e a cerca de 120 milhões de anos pelo mar. Isso é decorrente do período em que a América do Sul, África, sudoeste da Ásia, Austrália e Antártica formavam um único supercontinente situado próximo ao Polo Sul, conhecido como Gondwana (BICUDO, 2003).

Geograficamente, a possível submersão do Nordeste, inclusive da região que abrange a cidade de Mossoró e adjacências, pode ser explicada por meio da evolução tectono-sedimentar. Essa evolução está relacionada com movimentos tectônicos que culminaram na separação do continente Gondwana, separando as placas Sul-Americanas e Africanas. Durante as fases desse período, houve transgressões e regressões do oceano no continente (SOARES, 2000).

Há cerca de pouco mais de 40 anos, uma equipe do Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo estudava os indícios dessa possibilidade. Esses pesquisadores

conseguiram reconstituir e provar, com base na análise de rochas em que as geleiras deixaram marcas ou estrias ao deslizarem para o mar, que a hipótese antes elaborada é realmente autêntica, tornando-se um fato. Essas marcas eram o que faltava para elucidar de vez a hipótese, e são semelhantes aos sulcos que hoje se veem na plataforma continental da região ártica da América do Norte (BICUDO, 2003).

Outro projeto, realizado pela Universidade Regional do Cariri (URCA), buscou confirmar que o sertão já foi oceano pela análise de fósseis. Nessa, foram encontrados fósseis de ouriços marinhos, mais de cinco tipos de gastrópodes (búzios) e mais de 10 bivalves (UFCG, 2007).

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

3.1 Objetivos Gerais

- Avaliar a presença do gene *dmdA*, codificante da DMSP desmetilase na microbiota do ambiente Semiárido a partir de análises metagenômicas do solo.

3.2 Objetivos Específicos

- Extrair DNA metagenômico do solo de diferentes regiões de Mossoró e suas adjacências.
- Avaliar os grupos de *primers* mais competentes para a amplificação do gene *dmdA*.
- Amplificar o gene *dmdA*.
- Verificar a diferença quantitativa da presença de microrganismos com o gene *dmdA* em diferentes regiões e épocas do ano.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Foram realizadas quatro coletas a cada trimestre do ano de 2017, em três locais da cidade de Mossoró/RN e suas adjacências. As amostras de solo foram coletadas em triplicata no leito do Rio Mossoró, onde contém um maior índice de vegetação e solo mais úmido; no bairro Aeroporto, por possuir menor vegetação e solo mais seco, aspectos típicos do semiárido; e na Salina Augusto Severo em Areia Branca, por ser uma região de maior estresse pela presença de um solo hipersalino.

As coletadas foram realizadas a uma pequena profundidade, acondicionadas em tubos de microcentrífuga estéreis e, posteriormente, reservados em isopor com gelo reciclável durante o transporte até o Laboratório de Nanobiotecnologia, Inovação e Biorreatores (LABIN), localizado no prédio de biotecnologia da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), onde imediatamente passaram para o processo de extração de DNA metagenômico.

4.2 Extração do DNA metagenômico

A extração do DNA metagenômico foi realizada de acordo com as recomendações do Kit de Isolamento de PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, California, USA), com auxílio de equipamentos como agitador vortex (ARSEC ts200) e centrífuga (Eppendorf™ centrifuge 5810 R). Segundo o fabricante, o kit é capaz de isolar DNA dos solos mais simples aos mais complexos.

4.3 Avaliação da extração do DNA metagenômico

Para a avaliação da integridade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) diluído em tampão TAE 1X (tabela 1), o qual também foi utilizado como tampão de corrida. As amostras foram adicionadas ao gel com 1/9 do volume corante de corrida *Blue Gree* (LGC Biotecnologia) e tendo como padrão de peso molecular DNA *Ladder* 100pb (Green Bio Resource). Foram utilizados os seguintes parâmetros no gel de corrida: 100 V, 80 mA e 20 min. Após a eletroforese o gel foi visualizado num transiluminador com luz ultravioleta.

Tabela 1: Tampão de Gel de Agarose e de Corrida

TAMPÃO TAE (10X) pH 8.0	
Tris Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5M	40 mL
Água Destilada q.s.p.	1000 mL

4.4 Sequenciamento do DNA

Para a realização do sequenciamento as amostras foram enviadas para a empresa *GenOne Soluções em Biotecnologia* (Rio de Janeiro), onde foram realizadas as etapas seguintes:

4.4.1 Produção dos *Amplicons*

As regiões V3-V4 do gene 16S foram amplificadas utilizando os seguintes primers: 341F – CCTAYGGGRBGCASCAG (HERLEMANN, et al., 2011) e 806R – GGACTACNNGGTATCTAAT (APPRILL, et al., 2015). Todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

4.4.2 Análise de Qualidade e Quantificação dos Produtos da PCR

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2% em tampão de corrida 1X contendo SYBR Green. As amostras com a marca principal entre 400 e 450pb foram selecionadas para os passos seguintes.

4.4.3 Mistura e Purificação dos Produtos da PCR

Os produtos da PCR foram misturados em taxas de equidensidade. As misturas foram purificadas com Qiagen Gel Extration Kit (Qiagen, Germany).

4.4.4 Preparação das Bibliotecas e Sequenciamento

As bibliotecas foram geradas usando TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, USA). A qualidade da biblioteca foi avaliada por Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) e pelo sistema Agilent Bioanalyzer 2100. A biblioteca foi sequenciada pela plataforma Illumina HiSeq2500 e geradas sequências com 250pb.

4.5 Análise dos Dados

4.5.1 Montagem das Sequências e Controle de Qualidade

As leituras de extremidade emparelhadas foram atribuídas às amostras com base em seu código de barras exclusivo e quebradas por corte do código de barras e do *primer*.

As leituras de extremidade emparelhadas foram unidas usando o programa FLASH1.2.7, produzindo sequências chamadas de ‘raw reads’.

A filtragem para qualificação dos ‘raw reads’ foram realizadas sob condições que permitissem a alta qualidade dos ‘clean reads’ de acordo com QIIME1.7.0

Os ‘reads’ foram comparados usando referências do banco de dados (Gold) usado pelo UCHIME4.2.40 para detectar sequências quiméricas e então essas foram removidas.

4.5.2 Grupamentos OTU e Anotação das Espécies

As análises das sequências foram feitas pelo programa Uparse7.0.1001.

Para cada sequência representativa o banco de dados GreenGene foi usado baseado no classificador RDP2.2 para a anotação da informação taxonômica.

A fim de estudar as relações filogenéticas das diferentes OTUs e as diferentes espécies dominantes em cada grupo, o alinhamento de múltiplas sequências foram conduzidas usando o programa PyNAST1.2 (para avaliação do gene rRNA 16S).

A abundância de OTUs foi normalizada utilizando como padrão para número de sequências a amostra com as menores sequências. As análises de alpha e beta diversidade foram baseadas nesse padrão de normalização.

4.6 Amplificação dos genes codificantes de DMSP liases

As amplificações dos genes foram realizadas com kit comercial 2X PCR Master Mix (LCG), iniciadores F e R específicos, 0,50 µl de DNA e 1% de DMSO em aparelho termociclador (Amplitherm Thermal Cyclers TX96Plus). Os iniciadores utilizados serão provenientes do trabalho SENA (2013) (Tabela 2), consistindo em 7 grupos de *primers* a serem testados (Tabela 3), buscando selecionar o de maior eficiência.

Tabela 2 – Primers F e R para DmdA

PRIMERS	SEQUÊNCIA
DmdA 1AF	5' - GCT GGG CAT ACA CCG TGT AYA AYM RIA T - 3'
DmdA 2AF	5' – GCT GGG CAT ACA CCG TGT AYA AYM RIA T – 3'
DmdA 1BF	5' CCT GAA GCA CGT GCA GIT ITG GRA YGT – 3'
DmdA 1CF	5' – CA GAA CGG CGG CAT GIT IAA YGA YCC – 3'
DmdA 2ER	5' – GTC CCG AGT CGT GCA CGT AIA YYT CRW A – 3'
DmdA 1FR	5' – GGC CCA GGC CGC AYT SRW RIG G – 3'

Fonte: Sena, 2013

Tabela 3 – Par de *Primers* a serem testados

PAR DE PRIMERS	TAMANHO ESPERADO
1AF + 1FR	467 – 689 pb
1AF + 2ER	530 – 533 pb
1BF + 1FR	80 – 587 pb
1BF + 2ER	19 – 489 pb
1CF + 1FR	245 – 467 pb
2AF + 2ER	529 – 532 pb
1CF + 2ER	307 – 310 pb

Fonte: Sena, 2013

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta das amostras

As coletas seguiram como especificado na metodologia, buscando realizá-las em datas iguais ou próximas, bem como os horários. Os dados de temperatura e umidade foram coletados do banco de dados do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia). Os parâmetros de cada coleta estão expostos na tabela 4:

Tabela 4: Dados das Coletas

Primeira Coleta				
LOCAL	DATA	HORA	TEMPERATURA	UMIDADE
Aeroporto	16/02/2017	11 horas	28.9 °C	60%
Areia Branca	17/02/2017	11 horas	29.8 °C	50%
Rio Mossoró	16/02/2017	11:15 horas	28.9 °C	60%
Segunda Coleta				
LOCAL	DATA	HORA	TEMPERATURA	UMIDADE
Aeroporto	17/05/2017	7 horas	28.9 °C	86%
Areia Branca	19/05/2017	11 horas	29.8 °C	69%
Rio Mossoró	20/05/2017	8 horas	25.4°C	87%
Terceira Coleta				
LOCAL	DATA	HORA	TEMPERATURA	UMIDADE
Aeroporto	12/09/2017	11 horas	28.9 °C	54%
Areia Branca	20/10/2017	11 horas	29.2 °C	57%
Rio Mossoró	12/09/2017	11:15 horas	28.2°C	54%
Quarta Coleta				
LOCAL	DATA	HORA	TEMPERATURA	UMIDADE
Aeroporto	12/12/2017	11 horas	29.2°C	66%
Areia Branca	12/12/2017	10 horas	27.1°C	76%
Rio Mossoró	12/12/2017	11:15 horas	29.2°C	66%

Fonte: INMET

5.2 Extração de DNA Metagenômico do Solo

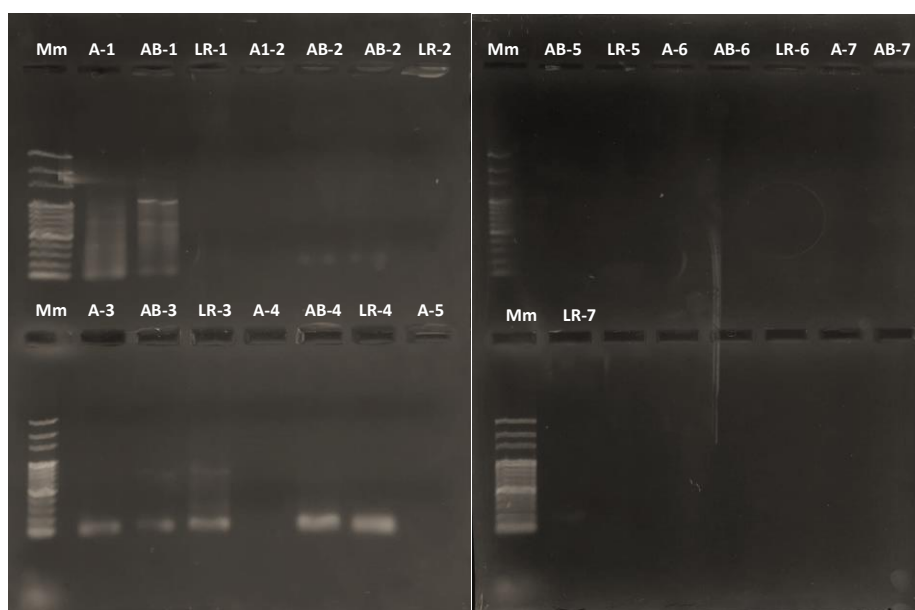
Seguindo a metodologia exposta pelos fornecedores do KIT de Isolamento de DNA PowerSoil® da MoBio, as extrações foram realizadas imediatamente após as coletas. A extração de material metagenômico ocorreu com eficiência, apresentando DNA em quantidade satisfatória e estável, sendo imediatamente preservada para ser utilizada na amplificação dos genes 16S rDNA e *dmdA*.

5.3 Amplificação do *dmdA*

Para realizar a amplificação do gene *dmdA*, foram testados sete grupos de *primers* anteriormente expostos na tabela 2. Todas as amplificações realizadas nesse trabalho estão de acordo com as figuras 2,3,4,5.

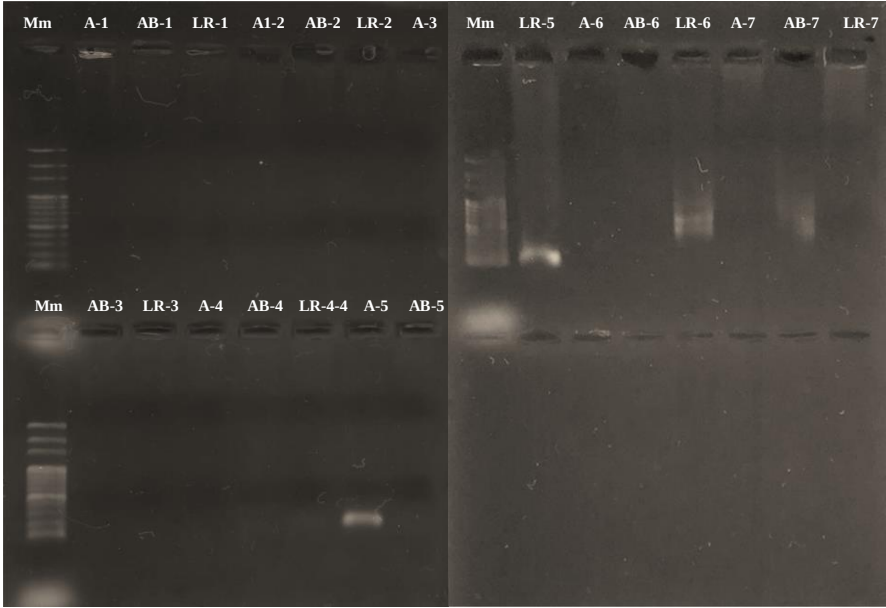
Inicialmente, é possível verificar que em todas as coletas houve a presença do gene estudado. Entretanto, foi possível verificar que o *DmdA* está mais constantemente presente na região da salina de Areia Branca. Isso pode ser explicado pelo fato de que o DMSP é produzido para atuar como um composto anti-estresse, sendo osmoprotetor, antioxidante e controlador do excesso de energia celular (KARSTEN et al., 1996).

Figura 2: Amplificação do gene *dmdA* provenientes da coleta 1. A primeira amostra indica o marcador molecular e as amostras seguintes pertencem ao bairro Aeroporto (A); Areia Branca (AB); e do Leito do Rio Mossoró (LR). Os números após as siglas definem quais pares de *primers* foram utilizados.



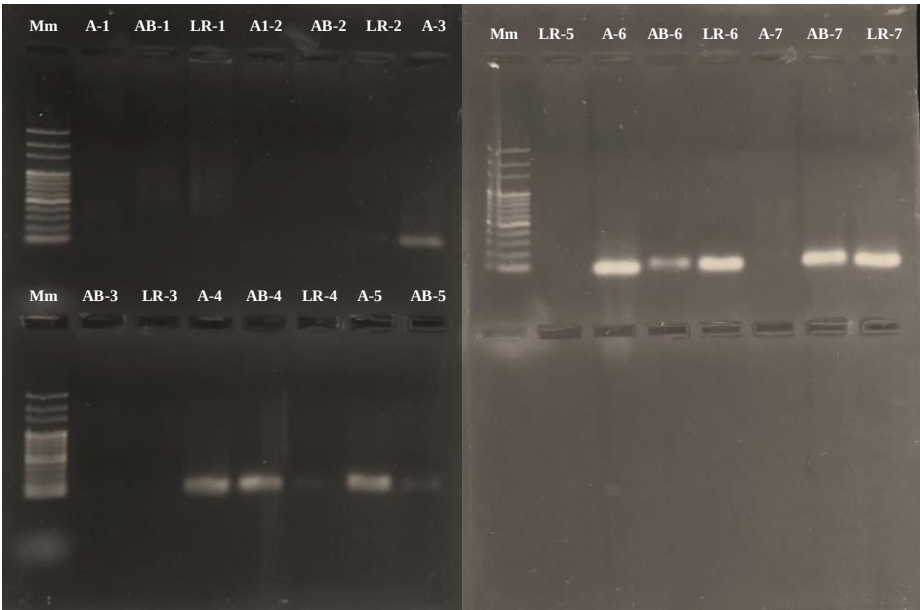
Fonte: Autoria Própria

Figura 3: Amplificação do gene *dmdA* provenientes da coleta 2. A primeira amostra indica o marcador molecular e as amostras seguintes pertencem ao bairro Aeroporto (A); Areia Branca (AB); e do Leito do Rio Mossoró (LR). Os números após as siglas definem quais pares de primers foram utilizados.



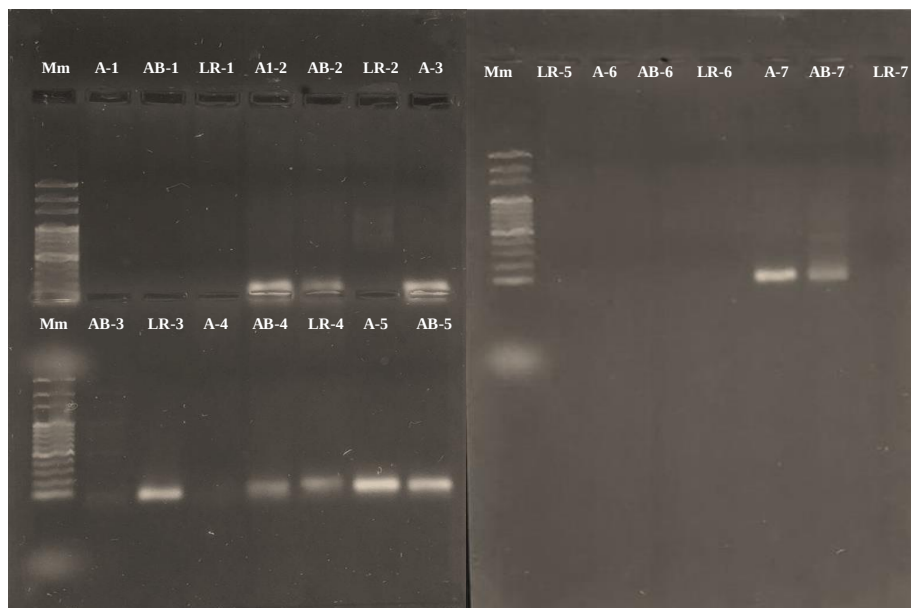
Fonte: Autoria Própria

Figura 4: Amplificação do gene *dmdA* provenientes da coleta 3. A primeira amostra indica o marcador molecular e as amostras seguintes pertencem ao bairro Aeroporto (A); Areia Branca (AB); e do Leito do Rio Mossoró (LR). Os números após as siglas definem quais pares de primers foram utilizados.



Fonte: Autoria Própria

Figura 5: Amplificação do gene *dmdA* provenientes da coleta 4. A primeira amostra indica o marcador molecular e as amostras seguintes pertencem ao bairro Aeroporto (A); Areia Branca (AB); e do Leito do Rio Mossoró (LR). Os números após as siglas definem quais pares de primers foram utilizados.



Fonte: Autoria Própria

5.4 Bioinformática

Durante o procedimento de envio das amostras para a empresa responsável pelo sequenciamento, houveram imprevistos técnicos que impediram a realização da análise da 3ª e 4ª coleta. Dessa forma, os resultados do sequenciamento apresentados no presente trabalho estão relacionados com a 1ª e a 2ª coleta.

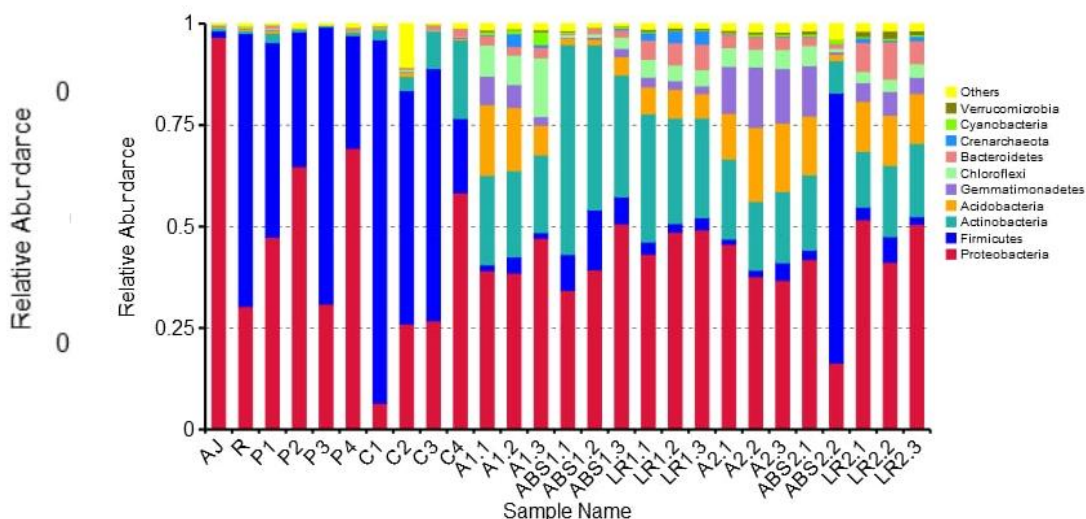
De acordo com a análise de sequenciamento (Figura 6), a maior parte dos microrganismos encontrados durante a 1ª coleta na região da Salina foram Cianobactérias, Actinomicetos e Verrucomicrobia, o que está em concordância com o período chuvoso e corresponde aos dados da literatura, onde o DMSP é um composto considerado como recurso valioso para os organismos marinhos (CHALLENGER; SIMPSON, 1948; VAN DUYL et al., 1998; STEFELS et al., 2007).

Ainda em relação aos primeiros meses do ano, os pares de *primers* 1, 2, 3 e 4 mostraram-se eficientes para a amplificação do *DmdA*.

O primer 3 demonstrou uma possível especificidade para o grupo de cianobactérias, pois também aparece com resultados positivos na coleta do Leito do Rio Mossoró, onde o sequenciamento apresentou grande quantidade desses organismos.

Já para os dados da 2ª coleta, período onde os índices pluviométricos reduzem em comparação a primeira, o sequenciamento demonstrou redução do número de actinobactérias e aumento de outros filos não especificados. Nesse caso, os pares de *primers* 5 e 6 mostraram-se mais constantes demonstrando que eles possam ser específicos e indicadores desses filos não especificados.

Figura 6: Sequenciamento de DNA metagenômico. Amostra (A) do bairro Aeroporto, possuindo 3 repetições da 1ª coleta e 3 repetições da 2ª coleta. Amostra (ABS) da Salina de Areia Branca, possuindo 3 repetições da 1ª coleta e 3 repetições da 2ª coleta. Amostra (LR) do Leito do Rio Mossoró, possuindo 3 repetições da 1ª coleta e 3 repetições da 2ª coleta



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através desse trabalho foi possível verificar a presença de microrganismos provedores do gene *dmdA* no solo do Semiárido, algo inédito na literatura, uma vez que esse processo está intimamente relacionado com o ambiente marinho.

Além disso, demonstrou-se que a presença do gene está relacionada com os índices pluviométricos da época estudada, onde o período chuvoso destaca o nível de microrganismos que são responsáveis pelo auxílio no estabelecimento das chuvas da região.

A microbiota do ambiente analisada via sequenciamento também é destaque, onde foi demonstrado que cianobactérias estabelecem grande influência. Nesse caso, foi possível

selecionar o grupo de *primer* 3, que pode ser estar relacionado com a presença desses microrganismos no ambiente. Além disso, o grupo 5 e 6 possivelmente são indicadores de filos não especificados.

REFERÊNCIAS

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K. Eds. 1995. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, NY, Brisbane, Toronto, Singapore.
- BICUDO, Francisco. **As geleiras viraram sertão**. 2003 Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2003/05/01/as-geleiras-viraram-sertao/>> Acesso em: 24/08/2018
- BULLOCK HA, Luo H and Whitman WB (2017) **Evolution of Dimethylsulfonylpropionate Metabolism in Marine Phytoplankton and Bacteria**. *Front. Microbiol.* 8:637. doi: 10.3389/fmicb.2017.00637
- CARDOSO, Elke; TSAI, Siu; NEVES, Maria. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de ciências do solo, Campinas, 1992. 360 f. pp. 8-9.
- Challenger, F., and Simpson, M. I. (1948). **Studies on biological methylation; a precursor of the dimethyl sulphide evolved by Polysiphonia fastigiata; dimethyl-2-carboxyethylsulphonium hydroxide and its salts**. *J. Chem. Soc.* 3, 1591–1597. doi: 10.1039/jr9480001591
- Curson, A. R., Todd, J. D., Sullivan, M. J. & Johnston, A. W. **Catabolism of dimethylsulfonylpropionate: microorganisms, enzymes and genes**. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 849–859 (2011).
- FILHO, Marco. **Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do cerrado**. 2010. Planatina, DF : Embrapa Cerrados, 2010.
- GOULART, Karla. OMORI, Wellington; SOUZA, Jackson. **Metagenômica aplicada à biotecnologia**. FCAV-Unesp.
- Karsten, U., Kuck, K., Vogt, C., and Kirst, G. O. (1996). **“Dimethylsulfonylpropionate production in phototrophic organisms and its physiological function as a cryoprotectant,”** in **Biological and Environmental Chemistry of DMSP and Related Sulphonium Compounds**, eds R. P. Kiene, P. T. Visscher, M. D. Keller, and G. O. Kirst (New York, NY: Plenum Press), 143–153.
- MARENGO, José A. **Vulnerabilidade, impactos e adaptação à mudança do clima no semi-árido do Brasil**. 2008.
- MATTOS, Maria. **Microbiologia do Solo**. Solos – 1ª ed. São Carlos: Editora Cubo, 2015. Cap 8. pp. 250-251
- MESQUITA, Vanessa. **Caracterização da diversidade microbiológica de solo do cerrado de minas gerais por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade de Federal de Lavras, 2011.

MOREIRA, Fátima; SIQUEIRA, José. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Atual. E ampli – lavras: Editora UFLA, 2006. Pp. 86-115

NUNES, Nei; CARMO, Ricardo; EL-HANI, Charbel. **Uma conexão entre algas e nuvens: Fundamentos teóricos da hipótese CLAW e suas implicações para mudanças climáticas**. 2009. Universidade Federal da Bahia - Campus Universitário de Ondina, Salvador, Bahia, Brasil.

PAIVA, Mateus; MARQUESIM, Gislane; BORELLI, Guilherme; MENDES, Felipe; OLIVEIRA, Felipe; ARRUDA, Paulo. **Análise da influência da temperatura sobre as vias de clivagem e demetilação de DMSP em Ruegeria Pomeroyi DSS-3**. 2013. Instituto de Biologia - IB, UNICAMP.

SILVA, Roberto Marinho Alves da. **Entre dois paradigmas: combate à seca e convivência com o semi-árido**. Soc. estado. [online]. 2003, vol.18, n.1-2, pp.361-385. ISSN 0102-6992. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-69922003000100017>.

SOARES, Ubiraci. **AS RELAÇÕES ENTRE TECTONISMO E SEQUÊNCIAS DEPOSICIONAIS NO RIFTE POTIGUAR – PORÇÃO SW DO GRABEN DE UMBUZEIRO, BACIA POTIGUAR EMERSA**. 2000.

Sun, J. et al. **The abundant marine bacterium Pelagibacter simultaneously catabolizes dimethylsulfoniopropionate to the gases dimethyl sulfide and methanethiol**. Nat. Microbiol. 16065, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.65 (2016).

UFCG. **Fósseis provam que o Sertão já foi oceano**. 2007. Disponível em: <http://www.ufcg.edu.br/prt_ufcg/assessoria_imprensa/mostra_noticia.php?codigo=60> Acesso em: 24/08/2019

van Duyl, F. C., Gieskes, W. C., Kop, A. J., and Lewis, W. E. (1998). **Biological control of short-term variations in the concentration of DMSP and DMS during Phaeocystis spring bloom**. J. Sea Res. 40, 221–231. doi: 10.1016/S1385-1101(98)00024-0

VARALJAV, Vanessa; HOWARD, Erinn; SUN, Shulei; MORAN, Mary. **Deep Sequencing of a Dimethylsulfoniopropionate-Degrading Gene (dmdA) by Using PCR Primer Pairs Designed on the Basis of Marine Metagenomic**. 2009. Appl. Environ. Microbio.

SENA, Klêydson. **Análise Metagenômica de Bactérias do Semiárido e sua Relação com a Formação de Nuvens**. 2014.

Stefels, J. (2000). **Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants**. J. Sea Res. 43, 183–197. doi: 10.1016/S1385-1101(00)00030-7