

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**METAGENÔMICA DO MICROCOSMO DE SOLO SOB A APLICAÇÃO DE
FIPRONIL**

Suzana Eiko Sato Guima

Dourados – MS

2016

Suzana Eiko Sato Guima

**METAGENÔMICA DO MICROCOSMO DE SOLO SOB A APLICAÇÃO DE
FIPRONIL**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Faculdade de Ciências
Biológicas e Ambientais como requisito básico para a obtenção do título de
bacharel em Biotecnologia.**

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

Dourados – MS

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Rodrigo Matheus Pereira pela oportunidade de crescimento pessoal e de aprendizagem dentro da vasta e incrível área de Bioinformática sob a sua orientação. Este trabalho me proporcionou a oportunidade de dar o pontapé inicial para aprender a trabalhar com linhas de comando e com a linguagem básica de programação Python. Aprendi apenas a ponta do iceberg da metagenômica porém, também pude visualizar as inúmeras portas existentes dentro do universo da Bioinformática.

Agradeço à professora Dra. Maricy Raquel Lindenhah Bonfá por proporcionar conhecimentos na área de metagenômica e de suas aplicações, bem como aos seus alunos da área de metagenômica, que tiveram participações fundamentais para que este trabalho fosse possível. Pude aprender o quanto é importante a diversidade não só sob o aspecto microbiológico, mas também no intercâmbio de conhecimentos dentro da ciência. Agradeço à Dra. Camila Cesario Fernandes pela oportunidade em poder acompanhar o processo de sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM na UNESP de Jaboticabal, e ao Dr. Luciano Takeshi Kishi por compartilhar um pouco de seu conhecimento na área da Bioinformática. Agradeço a EMBRAPA Agropecuária Oeste por disponibilizar os solos para análise, ao Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala (LMSeq; Facility FAPESP) da UNESP de Jaboticabal pelo serviço de sequenciamento das amostras e à UFGD por proporcionar esta experiência de desenvolvimento do conhecimento científico e da pesquisa.

Agradeço aos meus colegas Rafael Correia da Silva, Ramir Bavaresco Junior e aos demais membros do grupo de Bioinformática da UFGD por toda a ajuda que me deram e por compartilhar conhecimentos dentro da área de metagenômica e bioinformática. À Karina Tamie Shirakawa, colega e amiga de curso que esteve me acompanhando desde o nosso primeiro trabalho de Bioinformática com peptídeos antimicrobianos, à Adrielle Ayumi de Vasconcelos, Juliana dos Santos Fernandes e aos demais colegas e amigos que também compartilharam experiências e diversos momentos durante a graduação. Agradeço também aos demais professores por toda a aprendizagem que me proporcionaram, tanto sobre as disciplinas como também sobre a vida.

Agradeço ao filósofo, escritor e educador Daisaku Ikeda, que por meio de suas palavras e seu exemplo de vida, têm me inspirado e encorajado em diversos momentos. Finalmente, agradeço à minha família e aos meus demais amigos que estiveram me apoiando e me acompanhando durante a minha jornada da graduação em Biotecnologia.

*“Quando perguntado sobre qual era a sua maior
peça, a resposta de Charles Chaplin era sempre a
mesma: 'A próxima!'*

*Não há impasse quando se está imbuído de desafio.
Não se anda porque existe um caminho; por andar
é que se abre o caminho.”*

(Daisaku Ikeda)

RESUMO

O fipronil é um inseticida utilizado amplamente na agricultura para controle de pragas porém, seu efeito sobre a comunidade bacteriana em solos ainda não é totalmente compreendido. Neste trabalho, o objetivo foi inferir a diversidade bacteriana a partir do gene 16S do RNA ribossomal em microcosmo de solo de floresta semidecidual sob aplicação de fipronil por 28 dias. Ensaios de microcosmo foram realizados com o solo de floresta semidecidual coletado da fazenda experimental da EMBRAPA Agropecuária Oeste, com aplicações semanais de fipronil durante quatro semanas. Os ensaios foram realizados em três réplicas. A partir do DNA extraído do microcosmo de solo, a biblioteca metagenômica das regiões hipervariáveis V4 e V5 do gene 16S do RNA ribossomal foi preparada e procedeu-se o sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM. As sequências foram processadas para análise por meio dos pipelines BMP (*Brazilian Microbiome Project*) e MICCA (*Microbial Community Analysis*) com adaptações. Os arquivos dos pipelines foram executados no programa STAMP para análise estatística. A predição funcional foi realizada por meio do programa PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*). As diferenças estatísticas ocorreram a partir do nível taxonômico de classe. Tanto o pipeline BMP quanto MICCA resultaram em classes similares, enquanto os gêneros foram diferentes. A principal diferença entre ambos os *pipelines* é a etapa de agrupamento de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), na qual *singletons* (OTUs representadas por uma sequência única de DNA) são descartados no BMP enquanto no MICCA isso não ocorre. *Streptomyces* foi o gênero que apresentou maior diferença de proporção para o controle. Isso poderia indicar que o grupo é susceptível ou apresenta crescimento inibido pelo fipronil. Entretanto, o efeito do fipronil sobre esse gênero ainda não foi reportado na literatura. A predição funcional apresentou enzimas diferentes para os dados de ambos os pipelines.

Palavras-chave: 16S rRNA, Ion Torrent PGM, sequenciamento de gene alvo, ecologia microbiana, pesticida

ABSTRACT

Fipronil is an insecticide widely used in agriculture for pest control. However, its effect on the bacterial community in soil is still not completely understood. In this study, the goal was to infer the bacterial diversity from the 16S ribosomal RNA gene in microcosm of semideciduous forest soil under application of fipronil for 28 days. Microcosm experiments were performed with the semideciduous forest soil collected from the experimental farm of Embrapa Agropecuária Oeste, with weekly applications of fipronil for four weeks. Assays were performed in three replicates. From the DNA extracted from microcosm soil, the metagenomic library of V4 and V5 hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA was prepared and sequencing was carried on Ion Torrent PGM platform. Sequences were processed for analysis on BMP (Brazilian Microbiome Project) and MICCA (Microbial Community Analysis) pipelines with adaptations. Files from the pipelines were run in STAMP software for statistical analysis. Functional prediction was performed using PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of unobserved States) software. Statistical differences occurred on the taxonomic level of class. Both BMP and MICCA pipelines resulted in similar classes, while genus were different. The main difference between both pipelines is the step of Operational Taxonomic Units (OTUs) clustering, which singletons (OTUs represented by a single DNA sequence) are discarded in BMP while MICCA does not discard them. *Streptomyces* was the genus with the highest difference in proportion for control. This fact may indicate the group is susceptible to fipronil or the pesticide inhibits its growth. However, the effect of fipronil on this genus has not been reported in the literature. The functional prediction presented different enzymes from both pipelines.

Keywords: 16S rRNA, Ion Torrent PGM, targeted sequencing, microbial ecology, pesticide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	Geral.....	12
2.2	Específicos.....	12
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1	Fipronil	13
3.2	Diversidade microbiana em solos	16
3.3	Metagenômica de Solos	17
3.4	Medidas de Diversidade	20
3.5	Sequenciamento Ion-Torrent	22
3.6	Ferramentas computacionais para análise metagenômica.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Coleta do material	26
4.2	Microcosmo das amostras de solo	27
4.3	Amplificação e sequenciamento das regiões V4 e V5 do gene 16S	27
4.4	Análise de dados	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A – Análise química do solo coletado	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula química estrutural do fipronil	13
Figura 2 – Vias de degradação do fipronil	16
Figura 3 – Regiões ITS1 e ITS2 do gene ribossomal eucarioto	18
Figura 4 – Regiões conservadas e hipervariáveis do gene ribossomal 16S	19
Figura 5 – Conformação 2D e 3D do RNA ribossomal 16S	20
Figura 6 – Coordenadas da coleta da amostra	26
Figura 7 – Distribuição da qualidade Q (Phred) das bases ao decorrer da posição nos <i>reads</i> brutos.....	32
Figura 8 – Distribuição da frequência dos <i>reads</i> brutos por tamanho	33
Figura 9 – Porcentagem de <i>reads</i> que restariam após a filtragem com corte.....	34
Figura 10 – Curva de rarefação	35
Figura 11 – Etapas dos <i>pipelines</i> BMP e MICCA.....	36
Figura 12 – Análise de PCoA.....	38
Figura 13 – Proporções médias dos filamentos entre os tratamentos	40
Figura 14 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	41
Figura 15 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP	41
Figura 16 – Proporções médias de classes e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando <i>singletons</i>	41
Figura 17 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	42
Figura 18 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP.....	42
Figura 19 – Proporções médias de famílias e diferenças nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando <i>singletons</i>	43
Figura 20 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	44
Figura 21 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP.....	45
Figura 22 – Proporções médias de gêneros e diferença nas proporções médias entre os tratamentos a partir de dados do BMP considerando <i>singletons</i>	45

Figura 23 – Proporção média de proteínas preditas e diferença na média de proporções entre os tratamentos a partir de dados do MICCA	48
Figura 24 – Proporção média de proteínas preditas e diferença na média de proporções entre os tratamentos a partir de dados do BMP	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de dados das OTUs	37
Tabela 2 – Índices de alfa-diversidade.....	39