



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DAS ÁGUAS  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LARISSA TAYARA ALMEIDA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO  
DE DNA AMBIENTAL PARA LEVANTAMENTOS DE BIODIVERSIDADE A  
PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO DE VÁRZEA**

**SANTARÉM-PA  
2023**

**LARISSA TAYARA ALMEIDA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO  
DE DNA AMBIENTAL PARA LEVANTAMENTOS DE BIODIVERSIDADE A  
PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO DE VÁRZEA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas.

Orientador: Dr. Gabriel Iketani

Coorientadora: Msc. Luciana Pimentel

**SANTARÉM-PA  
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

S729a Souza, Larissa Tayara Almeida de  
Avaliação da eficiência de diferentes protocolos de extração de DNA ambiental para levantamentos de biodiversidade a partir de amostras de solo de várzea / Larissa Tayara Almeida de Souza – Santarém, 2023.  
27 f.: il.

Orientador: Gabriel Iketani  
Coorientadora: Luciana Pimentel  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Bacharelado em Ciências Biológicas.

1. Extração de DNA. 2. Solo. 3. Microrganismo. 4. Biodiversidade. 5. rRNA 18S. I. Iketani, Gabriel, *orient.* II. Pimentel, Luciana. III. Título.

CDD: 23 ed. 631.4

---

Bibliotecária - documentalista: Mary Caroline Santos Ribeiro – CRB-2/566

---

**LARISSA TAYARA ALMEIDA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO  
DE DNA AMBIENTAL PARA LEVANTAMENTOS DE BIODIVERSIDADE A  
PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO DE VÁRZEA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas.

Orientador: Dr. Gabriel Iketani

Coorientadora: Msc. Luciana Pimentel

Conceito: Aprovada

Data de Aprovação: 19/01/2023

Documento assinado digitalmente  
 GABRIEL IKETANI COELHO  
Data: 28/01/2023 18:16:01-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Gabriel Iketani – Orientador  
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Documento assinado digitalmente  
 LUCIANA PIMENTEL DA SILVA  
Data: 30/01/2023 14:22:16-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Msc. Luciana Pimentel da Silva – Coorientadora  
Laboratório de Educação e Evolução Prof. Horacio Schneider – LEDEVO (UFOPA)

Documento assinado digitalmente  
 IVANA BARBOSA VENEZA  
Data: 28/01/2023 19:01:07-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dra. Ivana Barbosa Veneza (Avaliadora)  
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Documento assinado digitalmente  
 MAXWELL BARBOSA DE SANTANA  
Data: 28/01/2023 22:17:28-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. D. Maxwell Barbosa de Santana (Avaliador)  
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

*Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e vibram pelas minhas conquistas.  
Aos professores e colegas, que contribuíram com os meus objetivos acadêmicos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus que está sempre à frente dos meus projetos, dando-me forças e coragem para continuar.

Aos meus orientadores, Prof. Msc. Luciana Pimentel e Prof. Dr. Gabriel Iketani, que compartilharam seus conhecimentos desde a sala de aula e não mediram esforços para que este trabalho finalizasse. Gratidão pela oportunidade, incentivo e pelas palavras sempre otimistas. À vocês, toda a minha admiração.

Aos meus pais, Cleide Almeida e Tadeu Pinho, que com todo o amor, carinho e paciência, mostraram que o conhecimento abre portas e durante minha trajetória de vida não mediram esforços para que eu pudesse ter oportunidade de estudar, apesar de todas as dificuldades. À minha irmã, Lara Camille, que por vezes me escutou e me deu forças para continuar. Vocês são a razão da minha vida e de todas as minhas conquistas.

Aos meus familiares, que mesmo de longe contribuíram na minha formação como pessoa. Aos meus avós Maria Olendina, Abelardo Lopes (*In memorian*), Iracema Pinho (*In memorian*) e Francisco Martins (*In memorian*), eu consegui!

Aos meus amigos, em especial Alessandra Malcher, Isabele Pinheiro, Joisiane Carvalho, Mateus Castro, Patrícia Guimarães e Raquel Silva, os presentes que a Universidade me deu. Que entre alegrias e surtos, seminários e campos, cafés e mistos, puxadinho e BMT, tornaram a vida acadêmica mais amena.

À minha amiga, Raquel Farias (sim, de novo!), que até no TCC não me deixou, desde os momentos de felicidade aos mais difíceis, estava ali para dar apoio. Obrigada por todos os momentos vividos.

Aos colegas de laboratório, Isadora Cruz, Pedro Teodósio e Eliziane Vasconcelos, vocês foram fundamentais durante todo o processo do trabalho.

Ao Christian Costa, pelo grande companheirismo, por acreditar e torcer por mim.

À Universidade Federal do Oeste do Pará pela formação acadêmica e aos professores pelos ensinamentos preciosos repassados.

A todos que estiveram presentes em minha vida e contribuíram para a elaboração deste trabalho, sou grata.

“Nunca permitan que nada ni por nadie dejen de creer en ustedes mismos, crean en lo que quieran pero crean, crean de verdad, si tu lo crees es posible. ”

Anahí Portilla

## RESUMO

O uso do DNA ambiental (eDNA), a partir de Sequenciamento de Nova Geração, tem se projetado como uma abordagem eficiente e rápida para a avaliação da biodiversidade em diferentes ambientes. Contudo, a obtenção de amostras de DNA de qualidade para a otimização dos protocolos de extração tem tornado sua utilização muito onerosa. Desta forma, testamos três tratamentos diferentes (10g, individual e mix), no intuito de determinar o melhor método de extração de DNA que possibilite uma ampla identificação da biodiversidade, utilizando amostras de solo coletadas em área de várzea da comunidade Pixuna do Tapará, município de Santarém – Pa. Neste estudo, foi realizado o sequenciamento do rRNA 18S, gene amplamente usado para detecção e classificação de grupos de microrganismos eucarióticos. Posteriormente, as sequências foram submetidas a identificação taxonômica através do banco de referência *Protist Ribosomal Reference* (PR2) v4.14. Os resultados demonstraram que houve um padrão de abundância diferente entre as extrações, no qual Gastrotricha e Annelida foram os mais abundantes para 10g e os filos Nematoda, Embryophyceae, Basidiomycota e Arthropoda para extrações individuais e Mix. A distribuição de ASVs entre os diferentes tipos de extração mostrou que há mais representantes exclusivos do que compartilhados. Para a diversidade alfa, o padrão entre os tipos de extração foi similar. Não houve diferença estatística para os testes de Wilcoxon rank-sum e o índice de similaridade de Shannon. Os padrões de diversidade beta, que foram analisados através de Análise de Escalonamento Multidimensional não métrico (NMDS), através da função *betadisper*, mostrou semelhança entre as amostras das extrações individual e mix e uma distinção na diversidade nas extrações de 10g e individual. A significância avaliada a partir da análise de similaridade (ANOSIM), corroborou o resultado. Os dados apresentados mostram que dependendo do objetivo e do recurso disponível, a metodologia poderá ser empregada para ambos ou apenas um dos protocolos.

**Palavras-chave:** Extração de DNA. Solo. Microrganismos. Biodiversidade. rRNA 18S.

## ABSTRACT

The use of environmental DNA (eDNA) from Next Generation Sequencing has been projected as an efficient and rapid approach for biodiversity assessment in different environments. However, obtaining quality samples for the optimization of extraction protocols has made its use very costly. Thus, we tested three different treatments (10g, individual and mix), in order to determine the best method that allows a broad identification of biodiversity, using soil samples collected in a floodplain area of the Pixuna do Tapará community, municipality of Santarem - Pa. In this study, the sequencing of the 18S rRNA was performed, a gene widely used for detection and classification of groups of eukaryotic microorganisms. Subsequently, the sequences were submitted to taxonomic identification through the Protist Ribosomal Reference (PR2) v4.14. The results showed that there was a different abundance pattern among the extractions, in which Gastrotricha and Annelida were the most abundant for 10g and the phyla Nematoda, Embryophyceae, Basidiomycota and Arthropoda for individual and Mix extractions. The distribution of ASVs among the different extraction types showed that there are more exclusive representatives than shared ones. For alpha diversity, the pattern between extraction types was similar. There was no statistical difference for Wilcoxon rank-sum tests and Shannon's similarity index. The beta diversity patterns were analyzed using Non-Metric Multidimensional Scaling Analysis (NMDS) using the betadisper function showed similarity between the samples from the individual and mix extractions and a distinction in diversity in the 10g and individual extractions. The significance assessed from similarity analysis (ANOSIM), corroborated the result. The data presented show that depending on the objective and the available resource, the methodology can be employed for both or only one of the protocols.

**Keywords:** DNA extraction. Soil. Microorganisms. Biodiversity. 18S rRNA.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS	12
2.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE EDNA	14
2.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE, PRODUÇÃO DE BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO	15
2.4 ANÁLISE DOS DADOS	16
3 RESULTADOS	17
3.1 DIVERSIDADE BIOLÓGICA – PRINCIPAIS FILOS E CLASSES ENCONTRADOS	17
3.2 PADRÕES DE DIVERSIDADE	18
3.3 DIVERSIDADE ALFA	18
3.4 DIVERSIDADE BETA	19
4 DISCUSSÃO	20
REFERÊNCIAS	23
APÊNDICE	25

## **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA AMBIENTAL PARA LEVANTAMENTOS DE BIODIVERSIDADE A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO DE VÁRZEA<sup>1</sup>**

Larissa Tayara Almeida de Souza, Gabriel Iketani e Luciana Pimentel

*Universidade Federal do Oeste do Pará, Laboratório de Educação e Evolução Prof. Horacio Schneider –LEDEVO (UFOPA)*

### **Abstract**

The results showed that there was a different abundance pattern among the extractions, in which Gastrotricha and Annelida were the most abundant for 10g and the phyla Nematoda, Embryophyceae, Basidiomycota and Arthropoda for individual and Mix extractions. The distribution of ASVs among the different extraction types showed that there are more exclusive representatives than shared ones. For alpha diversity, the pattern between extraction types was similar. There was no statistical difference for the Wilcoxon rank-sum tests and the Shannon similarity index. The beta diversity patterns were analyzed using Non-Metric Multidimensional Scaling Analysis (NMDS) using the betadisper function showed similarity between the samples from the individual and mix extractions and a distinction in diversity in the 10g and individual extractions. The significance assessed from similarity analysis (ANOSIM), corroborated the result. The data presented show that depending on the objective and the available resource, the methodology can be employed for both or only one of the protocols.

*Keywords:* DNA extraction, soil, microorganisms, biodiversity, 18S rRNA

### **Introdução**

O Brasil apresenta uma expressiva diversidade de ecossistemas devido à grande extensão física e à diversidade de climas, vegetações e solos existentes em seu território. Dentre os biomas que compõem o território brasileiro, destacam-se, pela grande diversidade biológica, a Floresta Amazônica, Pantanal, Cerrado, Caatinga, Pampas, Mata Atlântica e as zonas litorâneas (MMA, 2003).

Por sua notável biodiversidade, a região Amazônica constitui um importante centro em razão da combinação de altos níveis de riqueza de espécies e altas taxas de endemismo (Aleixo *et al.*, 2010). Dentre os diversos ambientes amazônicos, as várzeas se destacam pelo grande número de espécies, pois apresentam solos mais férteis, em relação às demais florestas inundáveis, isso porque os rios que banham as áreas, dispõem de maior quantidade de sedimentos, o que eleva a capacidade de troca catiônica desses solos (Assis; Wittmann, 2011;

---

<sup>1</sup>O artigo apresentado foi redigido conforme as diretrizes de submissão da revista Genetics and Molecular Biology. As normas indicadas para a redação de artigos pela revista estão disponíveis no link: <http://www.gmb.org.br>

Assis *et al.*, 2017). A alta diversidade de habitats, causada por esse ambiente dinâmico e alta fertilidade do substrato, podem sustentar e manter essa riqueza de espécies.

O reconhecimento da composição de espécies de uma determinada área está entre os aspectos mais fundamentais e relevantes para a conservação da biodiversidade. Entretanto, os métodos tradicionais de captura direta para identificação das espécies, exigem tempo e maior esforço de coleta, o que dificulta a avaliação das perdas da diversidade (Minamoto *et al.*, 2012).

A perda de biodiversidade em função da ação antrópica ocorre rapidamente, numa fração de segundos após a contaminação do solo ou da água. Identificar as espécies presentes em uma região antes que elas sucumbam aos impactos ambientais é um desafio para a comunidade científica, já que faltam recursos, pesquisadores e, principalmente, tempo.

Embora haja muitos estudos sobre a diversidade biológica da região amazônica, ainda não é possível ter o conhecimento total das espécies, devido à escassez de investimento em pesquisas taxonômicas, além do pequeno número de profissionais na área e a meticulosidade taxonômica em relação à demanda de trabalho (Hamada *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2012).

Os empenhos para a conservação da biodiversidade dependem em grande parte do monitoramento de espécies e populações. O monitoramento é tradicionalmente realizado através da identificação visual, que padece de problemas como: (1) dificuldades para identificação de espécies crípticas ou de estágios juvenis, (2) diminuição da expertise taxonômica, (3) amostragem não padronizada e a natureza invasiva de algumas técnicas de coleta (Thomsen; Willerslev, 2015).

O DNA ambiental (eDNA) provou ser uma ferramenta poderosa para monitorar a biodiversidade, potencialmente superando algumas das dificuldades já mencionadas (Zinger *et al.*, 2020). Conceitualmente, o DNA ambiental é material genético obtido diretamente de amostras ambientais (solo, sedimento, água etc.) sem qualquer marcador óbvio de origem de material biológico (Thomsen; Willerslev, 2015). Marcadores genéticos são frequentemente

utilizados para estudos de diversidade a partir do método de eDNA, como o gene 16S rRNA, usado para avaliação de diversidade bacteriana (Lucena, 2009) e COI para metazoários (Leray *et al.*, 2013). O gene 18S rRNA é um marcador eficaz para identificar amostras de procariotos em níveis taxonômicos mais altos (Tang, 2012), por serem regiões bastante conservadas, possibilitam a identificação de um maior número de espécies (Pinheiro, 2018).

Apesar da possibilidade de uso do eDNA para monitoramento da biodiversidade, ainda é raramente empregado em regiões tropicais (Huerlimann *et al.*, 2020). Uma das principais limitações do uso do eDNA é a falta de sequências de referência para as espécies da região (Huerlimann *et al.*, 2020; Zinger *et al.*, 2020), principalmente em ambientes de várzea na Amazônia. Portanto, a amostragem de eDNA, junto com pesquisas de campo de rotina, pode revolucionar as estratégias de conservação da biodiversidade tropical (Huerliman *et al.*, 2020), podendo acelerar a velocidade de aquisição de dados.

O solo é uma fonte potencial para a obtenção de amostras ambientais, que possibilita a eficiente identificação taxonômica de organismos que deixam traços de DNA no substrato (Martins, 2021), e esses vestígios de DNA presentes ou liberados no solo pelos organismos, são muito utilizados para avaliação da biodiversidade na abordagem de *metabarcoding*. Entretanto, a implementação desta técnica em larga escala encontra problemas na extração do DNA (Taberlet *et al.*, 2012; Zinger, 2016). A partir de uma única amostra, várias sequências de DNA identificam múltiplas espécies, podendo ser amplificadas e sequenciadas simultaneamente, capturando virtualmente todas as formas de vida presentes naquele ambiente. Milhares de amostras podem ser processadas em um único experimento, tornando a abordagem eficiente em termos de tempo e custo (Taberlet *et al.*, 2012).

O método padrão de extração é através do uso de kits comerciais que resultam na extração de DNA ambiental total (eDNA total), contendo tanto DNA intracelular, proveniente da lise de células vivas, dormentes e/ou mortas durante a extração, quanto DNA extracelular

(exDNA) liberado por lise de células danificadas ou mortas ou excretado no ambiente (Torti *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2018). Embora bastante utilizados, os kits são caros, as instalações necessitam ser adequadas para realização do procedimento, dificultando o monitoramento da biodiversidade e a implementação de protocolos de extração (Zinger, 2016).

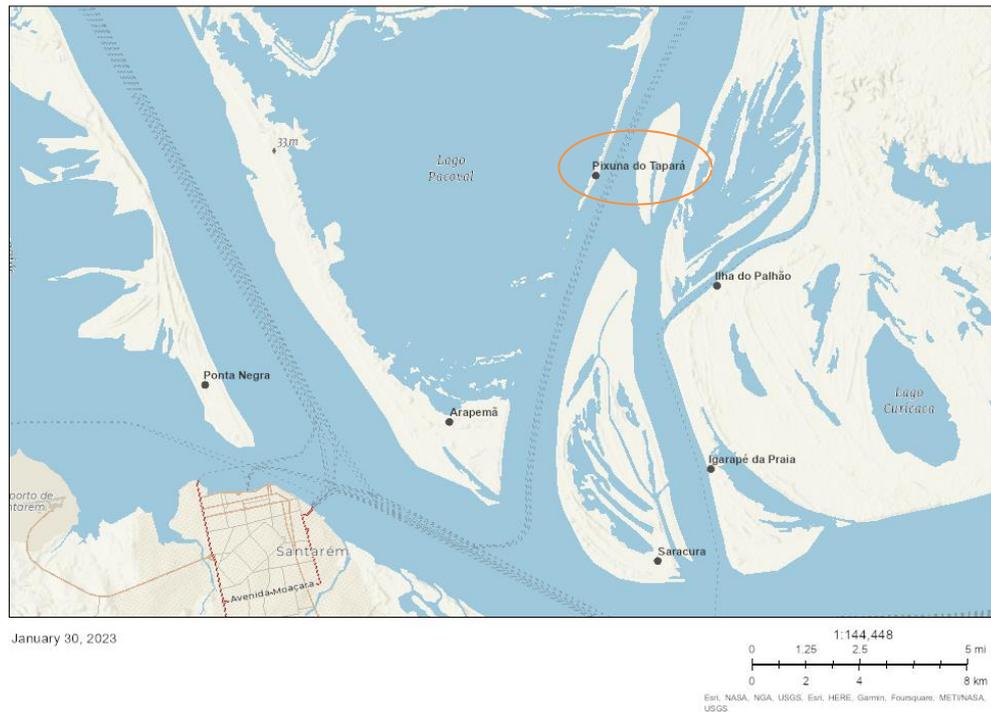
Em consequência disso, diferentes protocolos de extração estão sendo desenvolvidos para monitorar a biodiversidade a partir do eDNA (Tarbelet *et al.*, 2018). Ao analisar os sedimentos, o método e o volume inicial da amostra a ser analisada é considerada importante (Pansu, 2021).

A conservação da biodiversidade é uma preocupação mundial em virtude do declínio acelerado de espécies, logo as pesquisas para levantamento da diversidade biológica necessitam de coletas de dados confiáveis e precisos. Dado o potencial do uso de eDNA para detecção de espécies diferentes no ambiente e a escassez de pesquisas voltadas para regiões de várzeas na Amazônia, o presente estudo tem como objetivo avaliar o impacto de diferentes métodos de extração de DNA na biodiversidade identificada em amostras de sedimento da várzea de Pixuna do Tapará (Santarém, Pará, Brasil).

## **Material e métodos**

### **Local de estudo e coleta de amostras**

A região de estudo está situada em uma área de várzea na comunidade de Pixuna do Tapará (02° 23' 76,6" S e 54° 34' 20,0" W), localizada à margem do rio Amazonas, no município de Santarém, região Oeste do Pará, Brasil (Figura 1). Segundo o mapa de solos de várzeas, aproximadamente 80% das áreas de várzeas de Santarém-PA podem ser classificadas por Neossolos Flúvicos e em torno de 6% Gleissolo Háptico (Embrapa, 2000). A estação chuvosa (dezembro a maio) é composta por precipitação acima de 100mm (Chambers *et al.*, 2004).



**Figura 1** – Mapa de localização da área de estudo – comunidade Pixuna do Tapará, município de Santarém, PA. **Fonte:** Elaborada pelo próprio autor (2023).

Foram definidos cinco pontos de coleta e em cada ponto foi obtido aproximadamente 50g de amostra de sedimentos. A demarcação dos pontos ocorreu em áreas que, segundo os comunitários, não ocorre desmatamento e a intervenção humana ocorre apenas por pastoreio de gado no período seco e pesca artesanal no período de cheia.

As amostras de solo foram coletadas no período de cheia, no mês de maio com o auxílio de trado manual, conectadas à vara cilíndrica de ferro, com comprimento aproximado de três a quatro metros. Cerca de 5cm de sedimentos foram retirados, homogêneos e armazenados em tubos estéreis tipo Falcon de 50ml, que foram acondicionadas em gelo (Figura 2). Posteriormente as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Educação e Evolução Prof. Horacio Schneider (LEDEVO), da Universidade Federal do Oeste do Pará, no qual foram armazenadas em freezer a  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até a extração do DNA.



Figura 2 – Coleta de sedimento na várzea do Pixuna do Tapará no período da cheia (a); Armazenamento do solo em tubos Falcon (b). **Fonte:** Isadora Cruz (2022).

### **Extração e purificação de eDNA**

Para garantir a eliminação de contaminação residual, as bancadas e equipamentos foram higienizadas com água sanitária 10% e álcool 70% e submetidos à luz UV por 15 minutos, antes de cada procedimento laboratorial. Além disso, o uso de EPIs (luva, jaleco etc.) foi indispensável durante todo o experimento. As extrações de DNA foram realizadas em câmara asséptica em espaço separado do laboratório, onde não houve extração de DNA a partir de tecido animal.

Foram utilizados dois métodos de extração de eDNA de sedimento, primeiramente foi empregada a estratégia de Hestetun *et al.* (2021), onde para cada uma das amostras foram realizadas cinco extrações de DNA com o kit NucleoSpin soil (Macherey-Nagel, PA, EUA) a partir de 0,5g, totalizando assim 2,5g de sedimento. Após essas extrações, foi obtido um *pool* de DNA misturando-se 2 $\mu$ L de cada uma das cinco extrações. Durante cada extração de solo, também foi incluído um controle negativo da extração de sedimento (CNES).

Outro protocolo de extração empregado fez uso de 10g de amostra e foi realizado através do protocolo de DNA extracelular com tampão fosfato, proposto por Taberlet *et al.* (2012). A quantidade de tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,12 M, Ph 8) foi adicionada de forma equivalente a cada subamostra e misturados por 15 minutos. Para cada extração, uma alíquota de 2ml foi então centrifugada a 10.000g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi usado nas etapas de extração subsequentes, usando também o Kit NucleoSpin Soil, seguindo as instruções do fabricante, eliminando a etapa inicial de lise. Durante essa extração também foi incluído mais um controle negativo (CNE10g). Cada extração de 10g foi posteriormente diluída em 10 vezes, com as próximas etapas sendo realizadas com este DNA diluído. As etapas seguintes foram realizadas para comparar os tipos de extração a partir de três grupos: 1- **individual** (uma única extração representa o ponto amostral), 2- **mix** (*pool* de cinco extrações representam o ponto amostral) e 3- **10g** (extração de 10g de solo representa o ponto amostral). Cada amostra recebeu um código de tombamento referente ao tipo de extração, onde P é o ponto onde foi coletado (2, 3, 4, 5 e 6): Individual (P), mix (P – M) e 10g (P – 10).

### **Reação em cadeia da polimerase, produção de bibliotecas e sequenciamento**

O presente trabalho adotou a estratégia de realizar duas PCR consecutivas. Na primeira PCR a região de interesse foi isolada e amplificada, já na segunda PCR foram adicionados os índices para o sequenciamento na plataforma Illumina. A região utilizada no presente estudo foi a do 18S, gene rRNA de eucariotos, isolada e amplificada através dos primers *Euka02*, descritos por Guardiola *et al.*, (2015) (destacados em negrito):

*Euka02F*

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG**TTTGTCTGSTTAATTSCG**-3'

*Euka02R*

5' – **GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCACAGACCTGTTATTGC**-3'

As PCRs foram realizadas em triplicada (três reações por amostra) através do kit KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche), com volume de 25µL, usando o seguinte programa de ciclagem: 95 °C por 3 minutos, oito ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, seguidos de extensão final a 72 °C por 5 minutos. A segunda reação de PCR foi realizada para adicionar os índices utilizados para o sequenciamento através da plataforma Illumina. Esta segunda PCR foi também realizada com o kit KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche) e com kit Nextera XT Indexs. O mesmo programa utilizado para a primeira PCR foi repetido nessa segunda reação. Ambas as reações foram submetidas à purificação através de *beads* do kit ProNex® Size-Selective Purification System (PROMEGA). Após a etapa de purificação, as bibliotecas (segunda PCR) foram quantificadas com o fluorímetro Quantus (PROMEGA), que em seguida foram normalizadas para 1µM e por fim, foi estabelecido o *pool* de todas as bibliotecas em concentração de 120pM. Este *pool* foi sequenciado no modo *pair-end* do sequenciador NGS i-Seq 100 da Illumina. Para aumentar a diversidade nucleotídica da reação, foi adicionado 10% de *phyX*.

### **Análise dos dados**

A primeira etapa da análise foi realizar um controle de qualidade dos dados avaliando a qualidade do sequenciamento através *phred score* > 30, sequências muito pequenas e quimeras foram removidas. Após essa filtragem, as sequências foram alinhadas e submetidas à identificação taxonômica através do banco de referência *Protist Ribosomal Reference* (PR2) v4.14.1 (Guillou *et al.*, 2013).

Todas as análises estatísticas e os gráficos para representação dos dados foram realizados através do programa R 4.5.0 (RStudio Team, 2021), em ambiente R Studio. Para as análises foram utilizados os pacotes *vegan* 2.5-1, *phyloseq* 1.42.0, *ggplot2* 3.1.0, *MicrobiotaProcess* 1.10.2 e *tidyverse* 1.3.2. O pacote *VennDiagram* 1.7.3 foi utilizado para

construção de diagrama de Veen, com a finalidade de mostrar a quantidade de ASVs exclusivas e compartilhadas por cada tipo de extração.

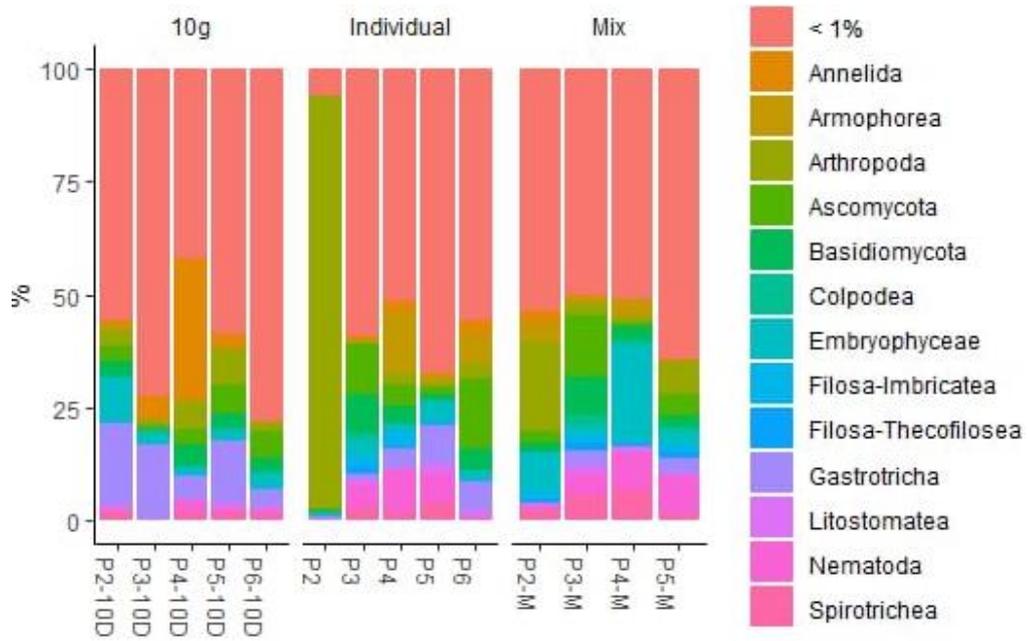
A diversidade alfa e beta foram estimadas. Para a diversidade alfa, foram obtidos os valores observados e de Shannon e realizado os testes de Wilcoxon e o índice de similaridade de Shannon, para avaliar a diferença entre os tipos de extração. Os padrões de diversidade beta foram analisados através de Análise de Escalonamento Multidimensional não métrico (NMDS) através da função *betadisper* e a significância avaliada através de 1000 permutações, comparando os diferentes tipos de extração (individual, mix e 10g). Em ambas as análises de diversidade, foi realizada a normalização para 926 sequências por amostras, através de análise de rarefação.

## **Resultados**

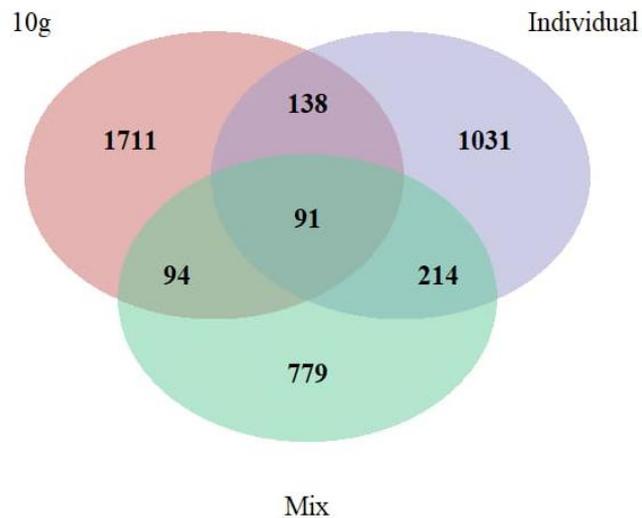
### **Diversidade biológica – principais Filos e Classes encontrados**

Foram obtidas cerca de 125.322 sequências após o processo de curadoria. Os filos/classes identificados mostraram um padrão de abundância diferente entre os tipos de extração, para 10g observamos uma maior abundância de Gastrotricha e Annelida, principalmente na amostra P4-10. Já para as extrações Individuais e os Mix, os filos Nematoda, Embryophyceae, Basidiomycota e Arthropoda foram os mais expressivos em termos de abundância (Figura 3). A amostra P2 apresentou predominância do ácaro identificado a nível de espécie como *Protoribates hakonensis*.

A distribuição de ASVs, entre os diferentes tipos de extração, mostrou que há mais representantes exclusivos do que compartilhados (Figura 4).



**Figura 3** – Percentual de abundância de Filos e Classes encontrados nas extrações de 10g, individual e Mix. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor (2023).

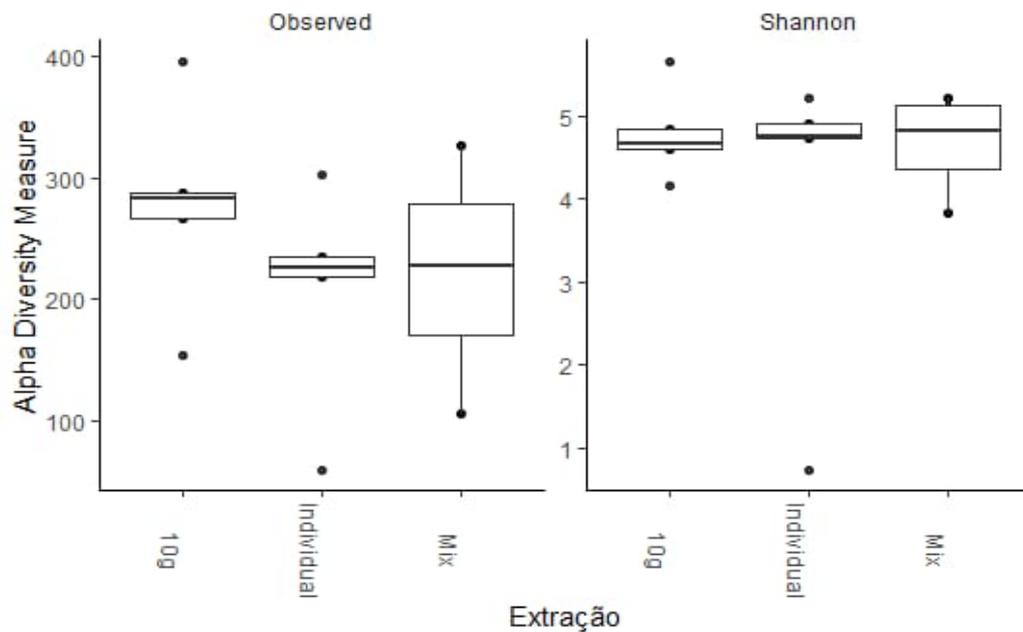


**Figura 4** – Diagrama de Venn mostrando a distribuição de ASV entre as extrações de 10g, individual e Mix. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor (2023).

## Padrões de diversidade

### Diversidade Alfa

O padrão de diversidade alfa entre os tipos de extração foi similar. Apesar da diversidade alfa observada na extração de 10g ser ligeiramente maior, isso não foi visualizado para Shannon (Figura 5). Além disso, o teste de Wilcoxon rank-sum e o índice de similaridade de Shannon não foram estatisticamente significativos (Tabela 1).



**Figura 5** – Medidas de diversidade alfa (observada e Shannon) dos diferentes tipos de extração. **Fonte:** Elaborada pelo próprio autor (2023).

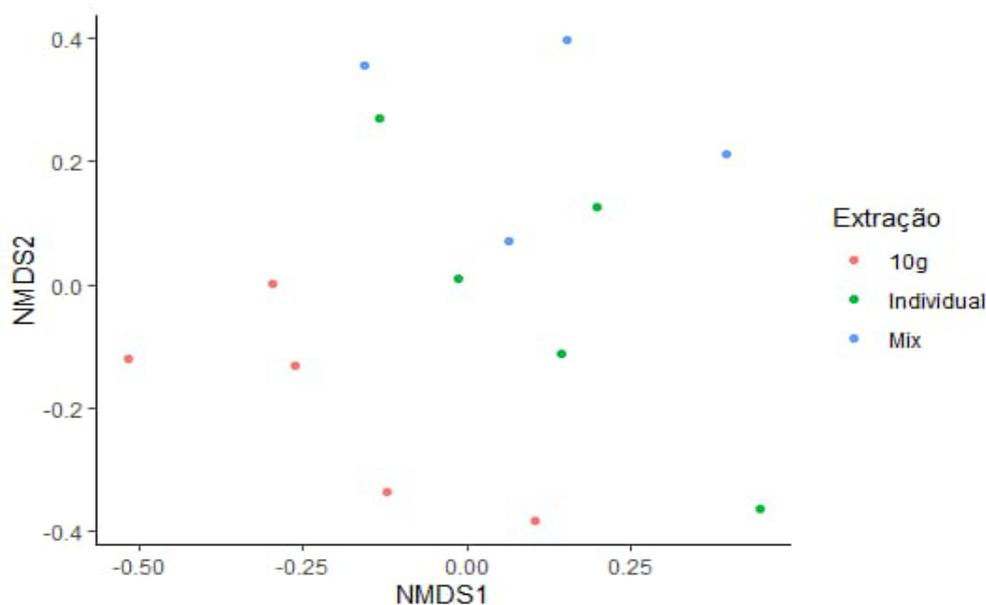
**Tabela 1** – Comparação entre os diferentes tipos de extração com relação a diversidade alfa.

Grupo 1	Grupo 2	p-ajustado Wilcoxon rank-sum	p-ajustado Índice de similaridade de Shannon
Individual	10g	0,62	0,90
Mix	10g	0,62	0,90
Mix	Individual	0,90	0,90

**Fonte:** Elaborada pelo próprio autor (2023)

### Diversidade Beta

A análise de Escalonamento Multidimensional não métrico (NMDS) revelou uma distinção nos agrupamentos entre as amostras biológicas das extrações de 10g e individual, demonstrando a diferença na diversidade, e ao observar as extrações individual e mix, houve semelhança na diversidade entre as amostras (Figura 6). A análise de similaridade (ANOSIM) confirmou o resultado pelo NMDS, apresentando diferença na estrutura da diversidade ( $R=0.3988$ ;  $P= 0.002$ ), o que foi corroborado pela *pairwise* ANOSIM (Tabela 2).



**Figura 6** – Gráfico de análise de Escalonamento Multidimensional não métrico (NMDS) entre as extrações de 10g, individual e mix. **Fonte:** Elaborado pelo próprio autor (2023).

**Tabela 2** – Resultado da estatística pairwise ANOSIM comparando a diversidade Beta entre os diferentes tipos de extração.

Grupo 1	Grupo 2	p	p.adj
10g	Individual	0.016	0.024
10g	Mix	0.011	0.024
Individual	Mix	0.375	0.375

**Fonte:** Elaborada pelo próprio autor (2023).

## Discussão

Durante a realização de um trabalho com eDNA com o objetivo de monitorar a biodiversidade, diversas etapas são importantes e interferem diretamente nos táxons identificados. Quando se trata de trabalhos que usam solo/sedimento como amostra para obtenção do eDNA, a escolha do protocolo de extração de DNA irá interferir em quais táxons serão identificados (Taberlet *et al.*, 2018).

A análise da biodiversidade do solo a partir de eDNA iniciou com foco em microrganismos, através da utilização de kits comerciais de extração que utilizam apenas uma

pequena quantidade de amostra (geralmente menos de 500mg). Mas, a utilização dos mesmos kits e da mesma quantidade de amostra para identificação de macroorganismos pode afetar a composição da biodiversidade que é detectada (Taberlet *et al.* 2012, Deiner *et al.*, 2015, Nagler *et al.*, 2018). Como proposta para superar este problema, Taberlet *et al.*, (2012) propôs um protocolo de extração de DNA extracelular, a partir de 15g de amostra, a partir do qual o DNA extracelular é extraído com auxílio de um tampão fosfato saturado.

A diferença básica entre o protocolo de extração dos kits comerciais e o protocolo de Taberlet *et al.*, (2012) é que no primeiro é realizada a lise celular e com isso ocorre a extração do eDNA total. Já no segundo, não é realizada a lise, através do tampão fosfato o DNA que está associado ao solo é dissociado e por meio de centrifugação, é então recuperado. Utilizando estes protocolos, alguns trabalhos têm mostrado diferenças na biodiversidade identificada, quando compararam os táxons identificados com o eDNA total e com o exDNA (Agnelli *et al.*, 2004; Nagler *et al.*, 2021; Pansu *et al.*, 2021; Kirse *et al.*, 2021; Nagler *et al.*, 2022).

Agnelli *et al.*, (2004) utilizou a técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE), mostrando a presença de algumas bandas para o exDNA que não estavam presentes nos padrões de banda do eDNA total. Nagler *et al.*, (2021) comparou os microbiomas de diferentes digestores anaeróbicos ao longo do tempo analisando o eDNA total, o DNA intracelular e o exDNA e observaram que o primeiro (isto é, o eDNA total) apresentou menores níveis de riqueza de espécies. Os autores também sugerem que a fração de exDNA presente no eDNA total pode impedir a detecção de táxons raros.

Pansu *et al.*, (2021) comparou a extração de eDNA total e exDNA com amostras de sedimento de regiões marinhas, estuarinas e lago, para identificação de bactérias (através de 16S rRNA), eucariotos (18S rRNA) e metazoários (COI). Os autores não observaram diferença com relação a diversidade Alfa, já a composição da comunidade e a diversidade Beta foram afetadas pelo tipo de extração. Por fim, Pansu *et al.*, (2021) também mostraram que as

diferenças entre os tipos de extração foram mais pronunciadas para os macroorganismos do que para microrganismos. Já Kirse *et al.* (2021), em análise de *metabarcoding* de invertebrados de amostras de solo com 18S e COI, observaram que mais de 40% das espécies detectadas foram únicas a um dos métodos de extração (exDNA e eDNA total).

Como é possível observar, os resultados do presente trabalho vão ao encontro dos observados pelos autores indicados acima, com a abundância e diversidade Beta diferentes entre os tipos de extração. Além disso, observamos que não há diferença entre a biodiversidade identificada com uma única extração e um mix de cinco extrações, exceto para amostra P2. Que identificou a presença de *Protoribates hakonensis* na amostra P2 em grande abundância. *Protoribates hakonensis* é uma espécie de ácaro que ocorre apenas na Europa e Ásia (Itis, 2002), sua identificação no presente trabalho evidencia a limitação do marcador e do banco de referência, ao mesmo tempo em que pode indicar que no momento da extração desta amostra, a subamostragem de 0,5g de solo retirado da amostra maior pode ter selecionado não intencionalmente uma porção de sedimento rico em *Protoribates*. Vale ressaltar que o limiar aceito para a identificação a nível de espécie é de 97% (noventa e sete por cento) de similaridade entre os dados obtidos e as sequencias de referência. Por fim, de acordo com o Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr), é registrado na região *Protoribates capucinus*.

Em relação ao banco de dados de referência utilizado para identificação taxonômica (PR2), apesar de nos permitir realizar as identificações até certo nível, ainda possui limitações, uma vez que a ausência de dados de táxons da região impediu identificações mais precisas e de uma quantidade expressiva de amostras. Entretanto, este problema não é restrito ao PR2, infelizmente, ainda não existem bancos de referência que incluam táxons da região.

Este trabalho é o primeiro realizado em uma área de várzea amazônica, portanto, a partir dos resultados obtidos através do eDNA metabarcoding, a metodologia de extração empregada

com 10g de amostra possibilita a análise utilizando apenas uma única amostragem, evidenciando a eficiência na identificação de espécies e poderá servir de referência para futuras análises da biodiversidade.

## Referências

- Agnelli A, Judith A, Giuseppe C, Maria TC, Paolo N e Giacomo P (2004). Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 36, n. 5, p. 859-868.
- Aleixo A, Albernaz AL, Grelle CEV, Vale MM e Rangel TF (2010). Mudanças climáticas e a biodiversidade dos biomas brasileiros: passado, presente e futuro. *Natureza & Conservação* 8(2):194-196.
- Assis RL, Wittmann F, Luize BG e Haugaasen T (2017). Patterns of floristic diversity and composition in floodplain forests across four Southern Amazon river tributaries, Brazil. *Flora*, v. 229, p. 124-140.
- Assis RL, Wittmann, F (2011). Forest structure and tree species composition of the understory of two central Amazonian várzea forests of contrasting flood heights. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 206, n. 3, p. 251-260.
- Chambers JQ, Tribuzy ES, Toledo LC, Crispim BF, Higuchi N, Santos J, Araújo AC, Kruijt B, Nobre AD e Trumbore SE (2004). Respiration from a tropical forest ecosystem: partitioning of sources and low carbon use efficiency. *Ecology Application*, v.14, n.4 (supl.), p.72-s88.
- Corinaldesi C, Tangherlini M, Manea E e Dell'Anno A (2018). Extracellular DNA as a genetic recorder of microbial diversity in benthic deep-sea ecosystems. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-9.
- EMBRAPA (2000). Embrapa Amazônia Oriental. Mapa das várzeas do município de Santarém-Pará. 1 mapa color. Escala 1:100.000. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108484/1/Solos-das-Varzeas-do-Municipio-de-Santarem.pdf>. Acesso em: 02 jan 2023.
- Guardiola M, Uriz MJ, Taberlet P, Coissac E, Wangenstein OS e Turon X (2015). Correction: Deep-Sea, Deep-Sequencing: Metabarcoding Extracellular DNA from Sediments of Marine Canyons. *PLOS ONE* 11(4): e0153836.
- Guillou L, Bachar D, Audic S, Bass D, Berney C, Bittner L, Boutte C, Burgaud G, de Vargas C, Decelle J, et al (2012). The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D597-604.
- Hamada N, Nessimian JL, Querino RB. Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia. Manaus: Editora do INPA, 2014., 2014.
- Hestetun JT, Lanzén A, Dahlgren TG (2021). Grab what you can—an evaluation of spatial replication to decrease heterogeneity in sediment eDNA metabarcoding. *PeerJ*, v. 9, p. e11619.
- Huerlimann R, Cooper MK, Edmundos RC, Villacorta-Rath C, Le Port A, Robson HLA, Strugnell JM, Burrows D e Jerry DR (2020). Enhancing tropical conservation and ecology research with aquatic environmental DNA methods: an introduction for non-environmental DNA specialists. *Animal Conservation*, v. 23, n. 6, p. 632-645.

- Kirse A, Bourlat SJ, Langen K e Fonseca VG (2021). Unearthing the potential of Soil eDNA metabarcoding—towards best practice advice for invertebrate biodiversity assessment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, p. 337.
- Leray, M., Haenel, Q., and Bourlat, S. J. (2016). Preparation of amplicon libraries for metabarcoding of marine eukaryotes using Illumina MiSeq: the adapter ligation method. In 'Marine Genomics'. (Ed. S. J. Bourlat.) pp. 209–218. (Humana Press: New York, NY, USA.)
- Lucena, RM de, Junior AM. Identificação molecular de diversidade microbiana em reator UASB de estação de tratamento de esgoto. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
- Martins VCC. Monitoramento da biodiversidade da Flora de Canga, Serra dos dos Caarajás – Pará, através de DNA Metabarcoding / Belemé: ITV, 2021.
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, Honjo MN e Kawabata Z (2012). Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* 13, 193–197.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. In: Rambaldi DM, Oliveira DAS. (Orgs.). Brasília: MMA/SBF, 2003.
- Nagler, M, Podmirseg SM, Mayr M, Ascher-Jenull J, Insam H (2021). The masking effect of extracellular DNA and robustness of intracellular DNA in anaerobic digester NGS studies: A discriminatory study of the total DNA pool. *Molecular ecology*, v. 30, n. 2, p. 438-450.
- Oliveira FF, Franco TM, Mahlmam T, Kleinert AMP e Canhos D (2012). O impedimento taxonômico no Brasil e o desenvolvimento de ferramentas auxiliares para identificação de espécies. *Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. Editora: EDUSP.
- Pansu J, Chapmam MB, Hose GC, Chariton AA (2021). Comparison of an extracellular v. total DNA extraction approach for environmental DNA-based monitoring of sediment biota. *Marine and Freshwater Research*.
- Pinheiro, SN. Caracterização do gene 18S rRNA em parasitos do grupo Apicomplexa: uma abordagem aplicada à seleção de marcadores moleculares. 2018. 76f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) - Instituto Metrôpole Digital, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.
- Ramírez GA, Graham D e D'Hondt S (2018), Influence of commercial DNA extraction kit choice on prokaryotic community metrics in marine sediment. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 16: 525-536.
- Retrieved (2023), from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database, Disponível em: [www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=743313#null](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=743313#null). Acesso em: 05 jan 2023.
- Santos MAO (2012). Reconstrução Filogenética do Filo Arthropoda Baseada no Genoma Mitocondrial. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética.
- Taberlet P, Coissac E, Hajebabaei M e Reiseberg LH (2012). Environmental dna. *Molecular ecology*, v. 21, n. 8, p. 1789-1793.
- Taberlet P (2018). *Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press.
- Tang CQ, Leasi F, Obertegger U, Kieneke A, Barraclough TG, Fontaneto D (2012) The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proc Natl Acad Sci USA*.

- Thomsen PF e Willerslev E (2015). Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, v. 183, p. 4-18.
- Torti A, Lever MA e Jorgensen BB. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments, *Marine Genomics*, Volume 24, Part 3, 2015, Pages 185-196.
- Zinger L, Donald J, Brosse S, Gonzalez MA, Iribar M, Leroy C, Murienne J, Orivel J, Schimann H, Taberlet P, Lopes CM (2020). Chapter Nine - Advances and prospects of environmental DNA in neotropical rainforests. *Advances in ecological research*, v. 62, p. 331-373.
- Zinger, L, Chave J, Coissac E, Iribar A, Louisanna E, Manzi S, Schilling V, Schimann H, Sommeria-Klein G, Taberlet P (2016). Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 96, p. 16-19.

## **Apêndice**

Este trabalho contém como apêndice eletrônico a planilha com todas as identificações realizadas.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
REITORIA  
SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS  
ACADÊMICOS

**1. Identificação do autor**

Nome completo: Larissa Tayara Almeida de Souza

CPF: 02764540221 RG: 6898849 Telefone: (93) 991240138

E-mail: tayalarissa@hotmail.com

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página de rosto?

(x) Sim ( ) Não

**2. Identificação da obra**

( ) Monografia (x) TCC ( ) Dissertação ( ) Tese ( ) Artigo científico ( ) Outros: \_\_\_\_\_

Título da obra: Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de extração de DNA ambiental para levantamentos de biodiversidade de a partir de amostras de solo de várzea

Programa/Curso de pós-graduação: Bacharelado em Ciências Biológicas

Data da conclusão: 19/01/2023.

Agência de fomento (quando houver): \_\_\_\_\_

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Iketani Coelho

E-mail: iketani.g@gmail.com

Co-orientador: Msc. Luciana Pimentel da Silva

Examinadores: Prof. Dra. Ivana Barbosa Veneza / Prof. D. Maxwell Barbosa de Santana

**3. Informação de disponibilização do documento:**

O documento está sujeito a patentes? ( ) Sim (x) Não

Restrição para publicação: ( ) Total (x) Parcial ( ) Sem restrição

Justificativa de restrição total\*: O trabalho será transformado em manuscrito de artigo científico a ser submetido para publicação de revista científica especializada. Assim, para preservar os dados, autorizo apenas a divulgação dos elementos pré textuais.

**4. Termo de autorização**

Autorizo a Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) a incluir o documento de minha autoria, acima identificado, em acesso aberto, no Portal da instituição, no Repositório Institucional da Ufopa, bem como em outros sistemas de disseminação da informação e do conhecimento, permitindo a utilização, direta ou indireta, e a sua reprodução integral ou parcial, desde que citado o autor original, nos termos do artigo 29 da Lei nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, e da lei 12.527 de novembro de 2011, que trata da Lei de Acesso à Informação. Essa autorização é uma licença não exclusiva, concedida à Ufopa a título gratuito, por prazo indeterminado, válida para a obra em seu formato original.

Declaro possuir a titularidade dos direitos autorais sobre a obra e assumo total responsabilidade civil e penal quanto ao conteúdo, citações, referências e outros elementos que fazem parte da obra. Estou ciente de que todos os que de alguma forma colaboram com a elaboração das partes ou da obra como um todo tiveram seus nomes devidamente citados e/ou referenciados, e que não há nenhum impedimento, restrição ou limitação para a plena validade, vigência e eficácia da autorização concedida.

Documento assinado digitalmente



LARISSA TAYARA ALMEIDA DE SOUZA  
Data: 01/02/2023 12:58:54-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Santarém, 03/02/2023.

Assinatura do autor

**5. Tramitação no curso**

**Secretaria / Coordenação de curso**

Recebido em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. Responsável: \_\_\_\_\_  
Siape/Carimbo