



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

RAQUEL SILVA DE FARIAS

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS AQUÁTICOS DAS REGIÕES DE
VÁRZEA DO ARAPIXUNA E DO PIXUNA DO TAPARÁ, ATRAVÉS DE
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

**SANTARÉM - PA
2023**

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

F224i Farias,Raquel Silva de
Identificação de microrganismos aquáticos das regiões de várzea do Arapixuna e do Pixuna do Tapará, através de sequenciamento de nova geração / Raquel Silva de Farias – Santarém, 2023.
30 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. DNA ambiental. 2. *Metabarcoding*. 3. Diversidade. I. Iketani, Gabriel, *orient*. II. Pimentel, Luciana, *coorient*. III. Título.

CDD: 23 ed. 579.177098115

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

RAQUEL SILVA DE FARIAS

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS AQUÁTICOS DAS REGIÕES DE
VÁRZEA DO ARAPIXUNA E DO PIXUNA DO TAPARÁ, ATRAVÉS DE
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

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**

RAQUEL SILVA DE FARIAS

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS AQUÁTICOS DAS REGIÕES DE
VÁRZEA DO ARAPIXUNA E DO PIXUNA DO TAPARÁ, ATRAVÉS DE
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

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>

Professor Dr. Gabriel Iketani (Orientador)
Universidade Federal do Oeste do Pará



Documento assinado digitalmente
LUCIANA PIMENTEL DA SILVA
Data: 30/01/2023 14:23:40-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Professora Msc. Luciana Pimentel da Silva (Coorientadora)
Laboratório de Educação e Evolução Horacio Schneider - UFOPA

Professor Dr. Diego Maia Zacardi (Avaliador)
Universidade Federal do Oeste do Pará



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

Professora Dra. Ivana Barbosa Veneza (Avaliador)
Universidade Federal do Oeste do Pará

*“Dedico este trabalho a minha família
que sempre me incentivou e foi meu
braço forte e mente sã nesta trajetória.
Gratidão!”*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Gabriel Iketani, pela acolhida em seu laboratório e por trilhar essa jornada do trabalho de conclusão de curso juntos. Obrigada por toda paciência, compreensão e puxões de orelha.

A minha coorientadora, professora Luciana Pimentel, que me acolheu de forma maravilhosa e ajudou incansavelmente na definição do projeto e na realização do trabalho, grande pesquisadora e amiga.

A minha mãe por ser meu exemplo de força, foco e determinação, obrigada por não me deixar desanimar e me acalmar nas horas que parecia estar perdida.

A minha irmã, obrigada por me fazer sentir feliz em todos os momentos de nossas vidas, espero inspirá-la um dia com toda essa jornada de formação intelectual e profissional.

Ao meu pai, por todo o seu apoio e alegria com cada conquista minha e por acreditar em mim, e na minha capacidade.

Ao meu amigo Fábio, que me estendeu sua casa quando precisava passar o dia realizando pesquisa na universidade e por todas as conversas que expandiam a minha mente e visão sobre a vida pessoal, e profissional.

Agradeço aos meus avós por todo o apoio e por estar realizando um sonho meu e deles de ser a primeira neta a se formar em uma universidade, fruto da primeira filha formada na mesma universidade.

Aos meus companheiros do Laboratório de Educação e Evolução Horacio Schneider - LEDEVO, Pedro Teodósio e Isadora Elaine, pelos lanches e papos científicos, além de todo apoio e suporte durante a realização da pesquisa.

Agradeço ao meu ciclo de amigas: Alessandra Malcher, Isabele Pinheiro, Joisiane Carvalho, Larissa Tayara e Patrícia Guimarães que me deram a mão e não soltaram, que se tornaram uma extensão de mim, na qual a minha rede de apoio se tornou mais leve, feliz e acolhedora. Minha gratidão eterna a vocês!

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram com palavras de incentivo e apoio, meu muito obrigada.

*“Nada na biologia faz sentido exceto à
luz da evolução”*

Theodosius Dobzhansky (1973)

RESUMO

Uma nova abordagem chamada de *metabarcoding* para DNA ambiental, que tem como finalidade identificar a diversidade de táxons e a composição da biodiversidade, a partir de primers universais, tem se destacado por sua eficiência. O objetivo deste estudo foi identificar e comparar os microrganismos aquáticos em área de várzea (Pixuna do Tapará e Arapixuna), às margens do rio Amazonas, no município de Santarém-PA e, em diferentes extratos da coluna d'água. As amostras foram filtradas, a partir dos filtros realizou-se a extração de eDNA e o gene rRNA 16S foi amplificado através de PCR. Os produtos foram purificados e utilizados para a construção de bibliotecas que, posteriormente, foram submetidos à técnica de Sequenciamento de Nova Geração. As análises dos dados foram realizadas no software R 4.5.0. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre os índices de diversidade biológica (Riqueza, Diversidade/Shannon e Equitabilidade/Pielou's) entre as regiões analisadas, quando avaliadas a nível de DNA. Os gêneros identificados com abundância maior que 5% foram *Polynucleobacter*, *na* (que são gêneros não identificados, ou que não constam nos bancos de dados de referência), *Hgcl clade* e o grupo marinho *CL500-29*. As famílias que apresentaram valores de abundância relativa maior que 1%, foram: Comamonadaceae, Burkholderiaceae, Ilumatobacteraceae, Methylophilaceae, Pedosphaeraceae e Sporichthyaceae. Estas famílias correspondem a cerca de 99% das sequências analisadas. Desta forma, o estudo do eDNA mostrou-se eficiente para a avaliação dos microrganismos presentes nestas áreas de várzea e, a abordagem de *metabarcoding* mostra-se promissora para auxiliar levantamentos biológicos de grande escala.

Palavras-chave: DNA ambiental. *Metabarcoding*. Diversidade.

ABSTRACT

A new approach called *metabarcoding* for environmental DNA that aims to identify the diversity of taxa and the composition of biodiversity, using universal primers, has been highlighted for its efficiency. Our objective was to identify and compare the aquatic microorganisms in two varzea regions (Pixuna do Tapará and Arapixuna), on the banks of the Amazon River, in the municipality of Santarém-PA, and in different extracts of the water column. The samples were filtered and from the filters the eDNA was extracted, the 16S rRNA gene was amplified through PCR, these products were purified and used for the construction of libraries that were later sequenced using the Next Generation Sequencing technique. Data analyses were performed in R 4.5.0 software. The results showed that there was no statistical difference in biological diversity indices (Richness, Diversity/Shannon and Equitability/Pielou's) among the analyzed regions, when evaluated at the DNA level. The genera identified with abundance greater than 5% were *Polynucleobacter*, *na* (which are unidentified genera, or not listed in the reference databases), *Hgcl clade* and the marine group *CL500-29*. The families that presented relative abundance values higher than 1% were: Comamonadaceae, Burkholderiaceae, Ilumatobacteraceae, Methylophilaceae, Pedosphaeraceae, and Sporichthyaceae. These families correspond to about 99% of the sequences analyzed. Thus, the eDNA study proved to be efficient for the evaluation of microorganisms present in these várzea areas and, the *metabarcoding* approach shows promise to assist large-scale biological surveys.

Keywords: Environmental DNA. *Metabarcoding*. Diversity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Comunidades bacterianas aquáticas	9
1.2 Espécies-chave em microbiomas.....	10
1.3 Composição do bacterioplâncton em sistemas de água doce	10
1.4 Importância dos sistemas de várzeas tropicais	11
1.5 Aplicações do dna ambiental	11
1.6 Justificativa.....	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Área de estudo	14
3.2 Coleta de material biológico.....	15
3.3 Filtragem das amostras	18
3.4 Extração de dna	18
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	18
3.6 Análise dos dados de sequenciamento.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

O significado de microrganismo é arbitrário, sendo empregado para caracterizar grupos de organismos que não são visíveis a olho nu. Os microrganismos são de suma importância para a manutenção dos processos biológicos e ecológicos, como fotossíntese, remineralização de matéria orgânica e ciclos biogeoquímicos (SHERR; SHERR, 1999; MOYER, 2001).

É possível observar com maior nitidez a função dos microrganismos na produção primária quando comparamos as cadeias alimentares de ambientes terrestres e ambientes aquáticos. Entre os benefícios de sua presença em ambientes terrestres está a sua capacidade de melhorar a disponibilidade de nutrientes no solo, através da decomposição e mineralização da matéria orgânica, assim como a fixação biológica de nitrogênio. Já o bacterioplâncton é um componente crucial do ecossistema aquático em razão de sua alta biomassa e capacidade de consumir carbono oriundo da produção primária. A alta influência de nutrientes e predadores no crescimento dos microrganismos define processos ecológicos dentro da cadeia alimentar microbiana, como a delimitação de nichos ou a competição entre bactérias e fitoplâncton. Essa influência da presença de nutrientes e predadores sobre os microrganismos também se reflete na estrutura da comunidade microbiana, definindo sua diversidade, tamanho e abundância, o que, por sua vez, repercute em toda a cadeia trófica (CHRZANOWSKI; SIMEK, 1990; PSENNER; SOMMARUGA, 1992).

1.1 Comunidades bacterianas aquáticas

Embora o seu tamanho seja diminuto, os procariotos compõem uma fração significativa da biomassa planctônica em ecossistemas aquáticos, exercendo papéis fundamentais no funcionamento desses sistemas, como nos ciclos biogeoquímicos, na remineralização de nutrientes, na cadeia trófica microbiana e na produção primária (COTNER & BIDDANDA, 2002). A análise da diversidade procariota era um ponto limitante até alguns anos, já que a caracterização morfológica e as abordagens de cultivo de bactérias são muito restritas e não deixam capturar a real biodiversidade dos microrganismos (PACE, 1997). Porém, nos últimos anos, a ecologia microbiana sofreu uma revolução impulsionada pelas tecnologias de sequenciamento de DNA e alto-rendimento (*high-throughput sequencing*, SOGIN *et al.*, 2006).

Desde então, estas novas ferramentas estão nos ajudando a compreender a estrutura, evolução e ecologia do mundo microbiano e se revelaram extremamente inovadoras na descoberta de novos genes, proteínas, enzimas e outras moléculas bioativas. O uso dessas técnicas aliadas às ferramentas bioinformáticas permitem a caracterização de comunidades microbianas diretamente de amostras ambientais, inclusive de táxons pouco abundantes como os microrganismos não-cultiváveis em laboratório ((LOGARES *et al.*, 2012; SUNAGAWA *et al.*, 2015).

1.2 Espécies-chave em microbiomas

O conceito de espécie-chave (*keystone species*) descreve espécies de animais e plantas que desempenham um papel crucial na manutenção da estrutura e diversidade de suas comunidades ecológicas, afetando sua estabilidade, robustez e resiliência.

Uma espécie-chave microbiana foi proposta como sendo aquela altamente conectada que, individualmente ou em uma guilda, afeta o equilíbrio de comunidades microbianas e a sua retirada causa uma grande alteração na estrutura e função de todo o microbioma (BANERJEE *et al.*, 2018).

Averiguando a composição da comunidade bacteriana, as redes de influência mútua entre bactérias de solos brasileiros (de diferentes biomas e tipos de uso da terra), Lupatini *et al.* (2014) encontraram que membros pertencentes aos filos abundantes de Actinobacteria e Proteobacteria eram espécies-chave compartilhadas em uma ampla variedade de solos. Porém, cada solo apresentou espécies-chave particulares, pertencentes aos filos Chloroflexi, Acidobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes

1.3 Composição do bacterioplâncton em sistemas de água doce

A diversidade bacteriana total de um ecossistema é composta por dois elementos principais: 1) um conjunto de táxons abundantes que realizam um maior número de funções ecossistêmicas e crescem de forma ativa, sofrem intensa predação e lise viral, subsidiando o ciclo do carbono e nutrientes nos sistemas aquáticos. Esses organismos são facilmente recuperáveis por técnicas moleculares, porém, são difíceis de serem cultivados. 2) Muitos táxons raros, que apresentam um crescimento lento e não são facilmente alcançados por predadores e vírus, devido a sua baixa abundância. Esses organismos desempenham funções ecossistêmicas importantes, porém em menor escala.

Além disso, são de difícil recuperação com técnicas moleculares, e alguns são favorecidos em ambientes de cultura, onde a disponibilidade de recursos limitantes é alta (PEDRÓS-ALIÓ, 2006).

1.4 Importância dos sistemas de várzeas tropicais

Os sistemas de várzeas são áreas periodicamente inundadas pelo transbordamento lateral de rios de águas brancas. Esses sistemas compreendem uma complexa rede formada pelos habitats lóticos permanentes (canal principal) e habitats lênticos permanentes (canal principal), conectados pelas extensas zonas úmidas (JUNK *et al.*, 1989). As zonas úmidas são áreas de solo saturados de água e incluem as grandes planícies de inundação e pantanais (KAYRANLI *et al.*, 2010). A interação dinâmica entre água e terra é o principal processo que cria e mantém a rede rio – várzea e afeta a biota desses ambientes (BAYLEY, 1995).

A maioria dos ambientes de inundação estão sujeitos a flutuações de acordo com as estações secas e chuvosas. O pulso de inundação resume os efeitos das oscilações cíclicas no nível da água na biota (comportamento e fisiologia), na disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos e na produtividade desses sistemas, usando informações disponíveis para ambientes tropicais e temperados (JUNK *et al.*, 1989).

1.5 Aplicações do DNA ambiental

O termo ácido desoxirribonucleico ambiental ou DNA ambiental (eDNA) foi expresso para definir o DNA que pode ser recuperado ou detectado no ambiente (por exemplo, solo, ar ou água) sem a necessidade de a amostra estar fisicamente presente. As análises genômicas são baseadas em metodologias moleculares, que mostram avanços importantes nas técnicas de identificação de indivíduos ou espécimes, que permitem detectá-los mesmo sem ter evidências físicas ou visuais do organismo (ANDRUSZKIEWICZ *et al.*, 2017). Ressalta-se que esses estudos podem ser divididos em análises com ou sem amplificação dos ácidos nucléicos, denominadas *metabarcoding* e metagenômica, respectivamente.

Paralelamente, as características de espécies ou organismos selvagens considerados extintos, raros, indescritíveis a olho nu ou que não podem ser cultivados por métodos tradicionais podem ser inferidas pela detecção de seu DNA. A partir daí, surgiu

o conceito de DNA ambiental (eDNA, na sigla em inglês: DNA ambiental), sendo descrito como o DNA que pode ser obtido a partir de amostras colhidas no ambiente sem que nenhum indivíduo esteja fisicamente presente (RUPPERT *et al.*, 2019), ou seja, de amostras de pele, cabelo, fluidos ou outros tecidos ou materiais, como solo, ar ou água. Portanto, detectar o DNA e saber com qual organismo ou entidade biológica ele se assemelha é importante para obter informações sobre espécies, populações e comunidades (THOMSEN e WILLERSLEV, 2015) habitantes de uma área específica ou em um determinado momento no tempo. Garantir o sucesso da detecção de eDNA dependerá de saber como lidar com a amostra coletada e o posterior isolamento e integridade do material genético obtido dessa amostra do ambiente (ANDRUSZKIEWICZ *et al.*, 2017), até sua identificação.

A análise molecular de amostras de água para a detecção precoce de espécies invasoras aquáticas, é uma abordagem particularmente promissora, que está ganhando popularidade na ecologia aquática. Todos os organismos liberam material genético em seu ambiente através de várias fontes biológicas, incluindo fezes, pele, muco e gametas, o que é conhecido coletivamente como DNA ambiental (eDNA). A detecção deste eDNA pode ser usada como um proxy para a presença de uma espécie dentro de um ecossistema (GOLDBERG *et al.* 2015).

O Sequenciamento de Nova Geração ainda é pouco empregado devido ao alto custo, entre outras dificuldades logísticas. Todavia, os esforços para o emprego da técnica visando a ampliação dos bancos de dados de referência, bem como para a revisão de identificações de coleções biológicas já é uma realidade. A exemplo da metodologia de *DNA barcode* proposta por Herbert em 2003, a perspectiva de popularização da técnica, bem como a padronização das metodologias de obtenção de amostras, no intuito de promover uma análise rápida e eficiente da biodiversidade, tem um futuro promissor na região Amazônica, uma vez que a todo o momento fortes pressões antrópicas são causadas pela exploração desordenada de áreas protegidas, instalação de grandes empreendimentos e mineração.

Nas últimas décadas, regiões do gene 16S rRNA começaram a ser analisadas usando técnicas de “*fingerprinting*” (impressão digital) como as RFLP “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (polimorfismo no tamanho do fragmento de restrição) (LIU *et al.*, 1997) em combinação com a construção de bibliotecas de clones e

sequenciamento (LINDSTRÖM; LESKINEN, 2002). No entanto, essas técnicas fornecem uma cobertura escassa para descrever a real diversidade bacteriana das comunidades e compará-las (CURTIS *et al.*, 2006).

O estudo da ecologia microbiana aquática sofreu uma revolução impulsionada pelas tecnologias de sequenciamento de DNA de alto rendimento, que permitem obter uma grande variedade no número de sequências de amostras ambientais, inclusive de grupos pouco abundantes (PEDRÓS-ALIÓ, 2006). As abordagens genômicas estão transformando nossa perspectiva sobre a estrutura, evolução e ecologia do mundo microbiano.

1.6 Justificativa

Para entender a função das bactérias envolvidas em processos relacionados aos ecossistemas aquáticos, é essencial compreender a composição dessas duas frações da coluna d'água em relação a diversidade bacteriana. Esse era um ponto limitante, já que a utilização de caracteres morfológicos não permitia a identificação da diversidade desses microrganismos (POMMIER *et al.*, 2010). Além disso, os métodos tradicionais de cultura oferecem uma abordagem para a compreensão do potencial fisiológico, mas não fornecem informações sobre a diversidade microbiana das comunidades em ambientes naturais, visto que mais de 99 % dos microrganismos não podem ser cultivados em laboratório (PEDRÓS-ALIÓ, 2006).

Considerando que a atividade microbiana afeta o funcionamento dos ecossistemas, estudar as complexas interações entre os microrganismos torna-se indispensável para uma melhor compreensão dos processos que regem o funcionamento ecossistêmico.

Este estudo tem caráter pioneiro, uma vez que o DNA ambiental (eDNA) ainda é pouco estudado e existem muitos limitantes como, por exemplo, a padronização de metodologias de coleta e obtenção das amostras, o uso da tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), que torna possível este estudo, ainda é muito onerosa, especialmente na região amazônica, que conta com pouquíssimas unidades de equipamentos capazes de realizar as análises. E, conseqüentemente, a carência de bancos de dados de referência.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter um panorama da composição e diversidade das comunidades bacterianas e avaliar a distribuição parcial presentes neste sistema várzea localizadas nas margens do rio Amazonas, em Santarém, região oeste do Pará, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

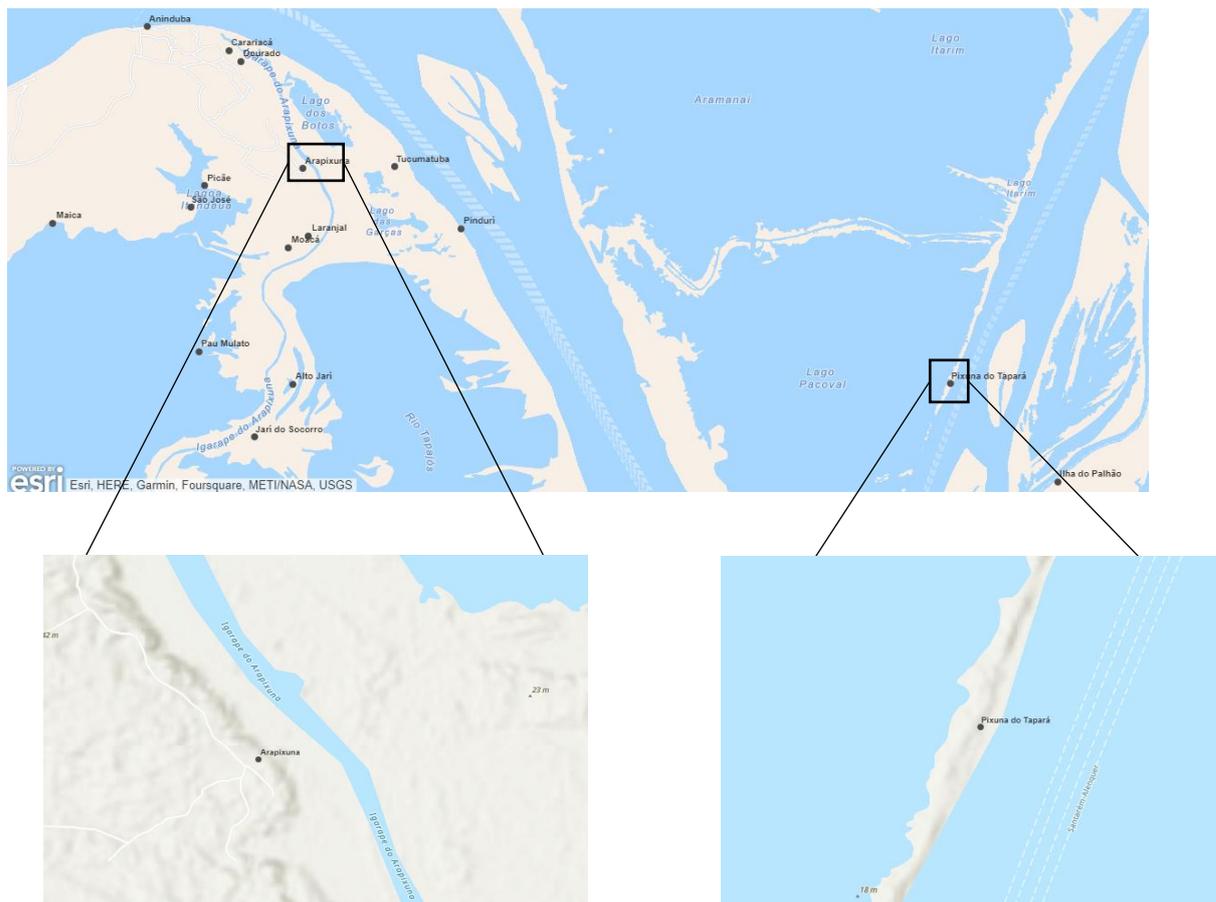
- Avaliar se o marcador RNAr16S é eficiente para a identificação de microrganismos aquáticos;
- Analisar se há diferença na comunidade microbiana em diferentes extratos de profundidade de zonas de várzea do Baixo Amazonas;
- Avaliar se há diferença entre as comunidades de microrganismos aquáticos em diferentes áreas na região de várzea do município de Santarém, Pará, Brasil;
- Iniciar a construção de um banco de dados de referência, a partir de informações de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), para a identificação de microrganismos aquáticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado em áreas de várzea: Arapixuna e Pixuna do Tapará, localizada no município de Santarém, Pará. O distrito de Arapixuna (Lat. 02°13'49" S; Long. 054°50'55" W), situa-se à margem esquerda do rio Amazonas a aproximadamente 30 km da cidade de Santarém, com acesso (no período seco) pelo "Igarapé Arapixuna" um pequeno canal que conecta o rio Amazonas ao rio. A comunidade Pixuna do Tapará (02° 23'76,6" S e 54°34' 20,0" W), situa-se na margem direita do rio Amazonas, e está a 16,5 km de distância da cidade de Santarém, Pará. Em cada uma dessas áreas, foram definidos quatro pontos de amostragens durante o período da cheia (Figura 1).

Figura 1: Mapa de localização das áreas de estudo. Distrito de Arapixuna à esquerda e Pixuna do Taparà à direita no trecho baixo do rio Amazonas, estado do Pará



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2022)

3.2 Coleta de material biológico

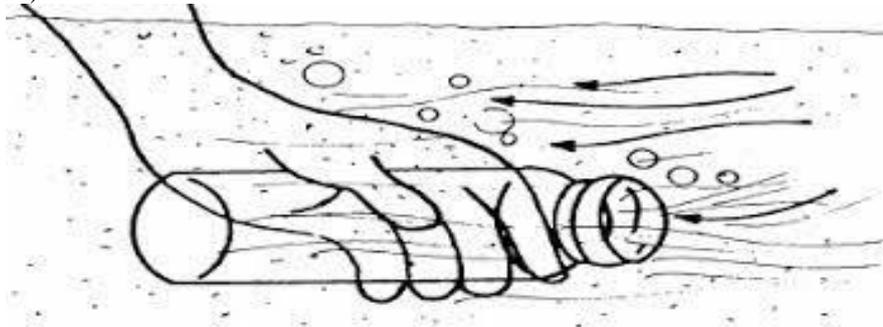
Com todos os cuidados de assepsia, as amostragens de água foram feitas por meio de coleta manual, realizada no mês de maio fazendo apenas uma coleta por ponto amostral e respeitando os seguintes procedimentos:

- Remoção da tampa do frasco juntamente com o papel protetor;
- Com uma das mãos, segurou-se o frasco pela base, mergulhando-o rapidamente com a boca para baixo, a cerca de 20cm abaixo da superfície da água, para evitar a introdução de contaminantes superficiais;
- Direcionou-se o frasco de modo que a boca ficou em sentido contrário à corrente (Figura 2);

- d) Inclinou-se o frasco levemente para cima, para permitir a saída do ar e consequente o seu enchimento.
- e) Após a retirada do frasco da água, ele foi imediatamente fechado e a tampa vedada com PARAFILM;
- f) Cada frasco foi devidamente identificado, acondicionado em saco plástico novo e em gelo.

As amostras foram então, levadas para o Laboratório de Educação e Evolução Professor Horacio Schneider, localizado na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Unidade Rondon, para o procedimento laboratorial de filtração realizado em até 24 horas após a coleta.

Figura 2. Esquema seguido para a amostragem manual de águas superficiais, segundo a NBR 9898 (ABNT, 1987)



Fonte: NBR 9898 (ABNT, 1987) Adaptado

Para a coleta de água do fundo (Tabela 1), utilizou-se uma garrafa de Van Dorn (Figura 3), onde foram obtidos 200ml por amostra de cada ponto de coleta para posterior filtração. A garrafa entre um ponto amostral e outro passava por assepsia utilizando de água sanitária 20% e água destilada para enxaguar, como alternativa para evitar contaminação cruzada.

Figura 3: Garrafa de Van Dorn utilizada nas amostragens de água de profundidade das comunidades Arapixuna e Pixuna do Tapar, região do Baixo Amazonas, Pará.



Fonte: <https://www.shoppingdolaboratorio.com.br/p-2169979-Garrafa-Van-Dorn-Horizontal-ou-Vertical-PVC-5-Litros-%28LMT%29>

Tabela 1. Dados de profundidade em relao a cada ponto de coleta realizado em cada uma das áreas de várzea.

Arapixuna (cheia)	Fundo	Superfície
Ponto 1	1.839 DEP m	0.183 DEP m
Ponto 2	2.256 DEP m	0.228 DEP m
Ponto 3	2.393 DEP m	0.266 DEP m
Ponto 4 (lago)	2.377 DEP m	0.166 DEP m
Pixuna do tapar (cheia)	Fundo	Superfície
Ponto 1	11.672 DEP m	10.409 DEP m
Ponto 2	11.662 DEP m	10.413 DEP m
Ponto 3	-	10.584 DEP m
Ponto 4	-	-

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2023).

O método de filtrao  o mais usado para o enriquecimento de eDNA (DNA ambiental) em amostras de gua (TSUJI, 2019). A filtrao pode processar maiores volumes de água, normalmente 0,5-2 L quando comparado a outros métodos, por isso  a maneira mais promissora e recomendada para obter maior proveito de eDNA (REES et al., 2014).

3.3 Filtragem das amostras

Antes de iniciar a filtragem era obtido um controle negativo (CNF) filtrando-se 1L de água destilada. Antes e entre cada ponto amostrado, todos os materiais utilizados no procedimento, bem como os equipamentos de filtração, foram também esterilizados com água sanitária 10% por 2 minutos, lavados com água destilada em abundância e submetidos a luz UV por 15 minutos, com a utilização de luvas durante todo o processo. O procedimento foi realizado em laboratório utilizando bomba a vácuo filtros de 37 mm e 0,45µm de porosidade.

3.4 Extração de dna

As extrações do eDNA da água (filtros) foram realizadas com o kit *MN NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel, PA, EUA) seguindo um protocolo modificado de LeBlanc et al. (2020). Em cada extração foi utilizado metade do papel filtro e a outra porção foi armazenada como reserva. Durante a extração também foi incluído um controle negativo dos filtros (CNEF), o qual, a partir da sua inclusão, passou a ser tratado como amostra e sequenciado.

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da Polimerase foi realizada em duas etapas. A primeira PCR foi realizada com os *primers* 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' (*forward*) e 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (*reverse*) descritos por Klindworth et al. (2013). Nesta reação, foi utilizado o seguinte programa: 95 °C por 3 minutos, 25 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. Esta PCR foi realizada em triplicata, ou seja, foram realizadas três reações independentes por amostra. As três reações foram então reunidas para purificação e o produto purificado submetido à segunda PCR que foi, posteriormente, também purificada.

Ambos os *primers*, além da sequência específica, também contavam com uma “cauda” com sequência dos adaptadores para a ligação dos índices necessários ao sequenciamento. A ligação destes índices foi realizada através da segunda reação, utilizando o kit Nextera XT Indexs. Tanto a primeira quanto a segunda PCR foram

realizadas com o kit 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, água ultrapura, *primers* (para a primeira PCR) e kit Nextera (para a segunda PCR). Para a segunda PCR, a única alteração realizada nas condições de amplificação foi a redução no número de ciclos para oito.

A purificação de ambas as reações foi realizada com *beads* magnéticas do kit ProNex® Size-Selective Purification System (PROMEGA), seguindo o protocolo do fabricante. Após a purificação da segunda PCR, cada biblioteca foi quantificada com o fluorímetro Quantus (PROMEGA). Em seguida, todas as bibliotecas foram diluídas para 1 μ M. Por fim, foi estabelecido o *pool* de bibliotecas na concentração de 120pM, para obtenção dos arquivos fastq na plataforma Illumina iseq 100, no modo paired-end 150pb, usando procedimento padrão com adição de 10% de *phyX*.

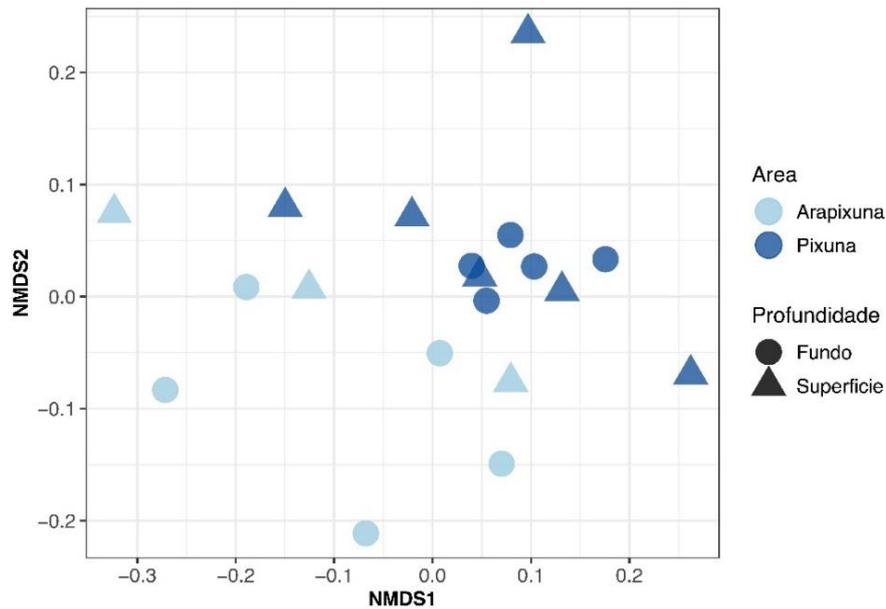
3.6 Análise dos dados de sequenciamento

A abordagem de variantes da sequência do amplicon (ASVs) foi implementada através do pacote Dada2 1.9.3 (Callahan *et al.*, 2016). Inicialmente, as sequências passaram por um processo de curadoria e controle de qualidade e considerando a impossibilidade de margem, devido ao tamanho do fragmento amplificado, optamos por trabalhar somente com as sequências *foward*. No total, foram obtidas pouco mais de dois milhões e oitocentas mil sequências com tamanho padronizado de 131 pb. Utilizamos o método de rarefação, a fim de normalizar para 73.661 o número de sequências por amostra.

O processo de identificação taxonômica das amostras envolveu a comparação das sequências obtidas com o banco de dados de SILVA (<http://www.arb-silva.de>), adotando similaridade de pelo menos 75% em nível de família. Todas as análises foram realizadas no software **R 4.5.0** (RStudio Team, 2021), em ambiente **R Studio**. Para as análises estatísticas e construção de gráficos para representação dos dados, foram utilizados os pacotes *vegan*, *dunn.test* e *ggplot2*. Para as análises de diversidade alfa, foi calculada a riqueza de ASVs, onde cada sequência foi considerada como única. Ainda para a diversidade alfa, foram estimadas a riqueza total de ASVs, a diversidade de Shannon e a Equitabilidade de Pielou's. Já para avaliar a diversidade beta entre as áreas de várzea e entre os ambientes de coleta (fundo e superfície), foi usado permanova com índice de Bray-Curtis. A Análise de Escalonamento Multidimensional não métrico (NMDS) foi utilizada para agrupar e visualizar essa métrica. A dispersão beta foi testada usando a

impacto de grandes empreendimentos, em geral, a ampliação da zona portuária da cidade etc. Entretanto a ausência de dados abióticos limita nossa interpretação.

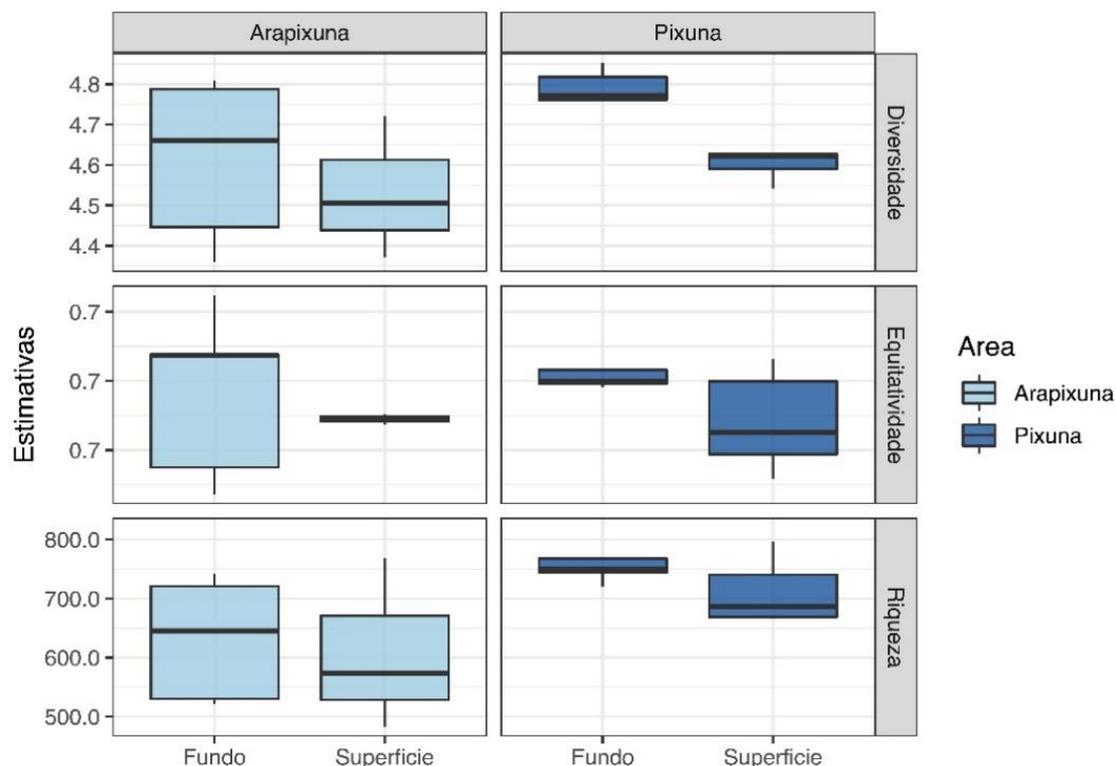
Figura 5: Gráfico com relação a biodiversidade das áreas de várzea do Arapixuna e Pixuna do Tapará coleta e suas diferenças de profundidade.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2022)

A partir da análise da diversidade alfa, foram calculadas a riqueza total de espécies (ASVs), a estimativa de diversidade (Shannon) e Equitabilidade (Pielou's) (Figura 6). As riquezas totais de ASVs nas amostras foram: 1) fundo na região do Arapixuna foi de 651,1 e superfície na região do Arapixuna foi de 587,4; 2) fundo na região do Pixuna do Tapará foi de 747,3 e superfície na região do Pixuna do Tapará foi de 660,2. Para a Equitabilidade (Pielou's), nota-se que o monitoramento durante o período de estudo mudou muito pouco (0,7), isso quer dizer que não houve nenhum evento significativo que alterasse a uniformidade desta área dentro do período de análise. O índice de Shannon foi utilizado para estimar a diversidade de espécies encontradas na área estudo, o qual, na região do Arapixuna no fundo foi 4,66 no fundo e na superfície foi 4,51; já na região do Pixuna do Tapará no fundo, este índice de diversidade foi 4,73 e na superfície foi 4,63.

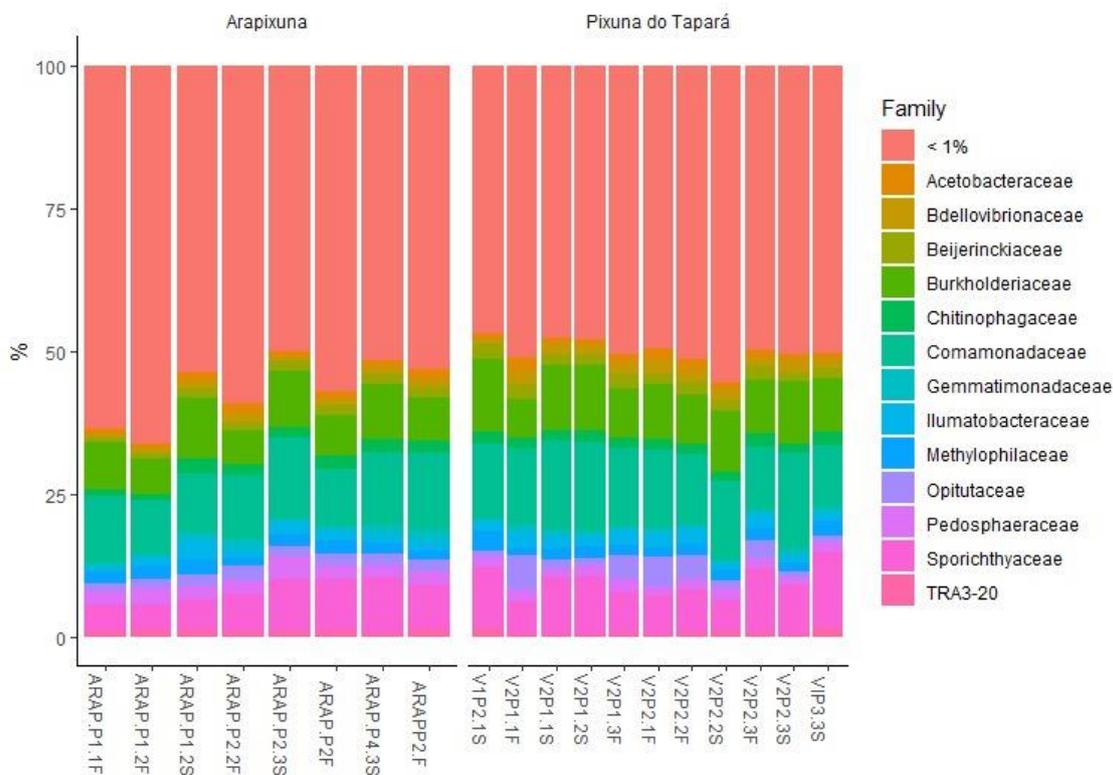
Figura 6: Gráfico que demonstra as estimativas de diversidade biológica (Diversidade/Shannon, Equitabilidade/Pielou's, Riqueza/ASVs) das áreas de estudo por região



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2022).

Entre as famílias dominantes encontradas, pudemos observar que Comamonadaceae, Burkholderiaceae e Sporichthyaceae estiveram presentes de forma significativa entre os microrganismos recuperados a partir das análises, e todas as famílias que preencheram a margem igual ou inferior a 1% também se mostraram bastante relevantes (Figura 7). Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Newton *et al.*, (2011), uma meta-análise que reuniu todos os dados de sequência do gene 16S rRNA do epilímnio de lagos de água doce publicados. Essa análise identificou um total de 12 famílias sendo que as mais comuns foram: Comamonadaceae, Burkholderiaceae, Ilumatobacteraceae, Methylophilaceae, Pedosphaeraceae e Sporichthyaceae. A pesquisa revelou que estas famílias compõem cerca de 99% (> 73.661 sequências) das sequências analisadas.

Figura 7: Representação gráfica das famílias mais abundantes a partir de dados de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para o estudo da composição da biodiversidade microbiana em sistemas de água doce das regiões de várzea do Arapixuna (ARAP) e Pixuna do Tapará (V) em relação a cada ponto de coleta (P) e profundidade: fundo (F) e superfície (S).

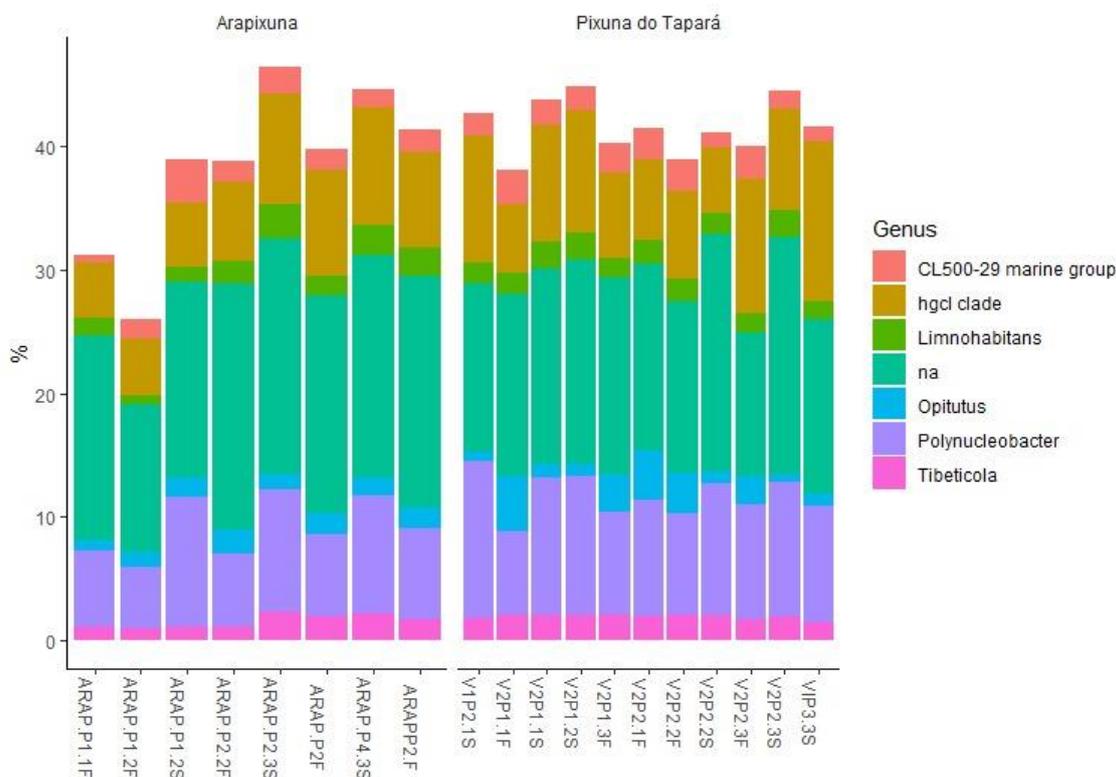


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2022).

Para dados percentuais com relação aos gêneros identificados nas análises (Figura 8), podemos observar que as espécies que preenchem o grupo marinho *CL500-29* se sobressaem numericamente, isto se deve ao fato de não haver dados de referência da região para uma identificação mais precisa e também em virtude do marcador utilizado ser bastante conservado. Outro indicativo da ausência de dados de referência específicos é a significativa ocorrência de *na*, que nada mais são do que “gêneros não identificados” no banco de dados e também dos gêneros *Hgcl* e *Polynucleobacter*, estes dados foram similares aos descritos por Llorós *et. al* (2014) ao analisar composição da comunidade bacteriana em três reservatórios de água doce de diferentes alcalinidades e estados tróficos na Bélgica. Zaitseva e Dagurova (2021), tiveram resultados semelhantes quando analisaram a comunidade bacteriana aquática de diferentes lagos na Rússia utilizados para diferentes atividades econômicas, bem como pela comunidade local para a pesca e consumo da água. Eles associaram estes organismos a áreas fortemente impactadas pela ação humana. O gênero *Tibeticola* teve baixos percentuais, mas não insignificantes.

Essa presença evidente e clara de “na” em uma sequência de amostras, se dá por não haver identificação nos bancos de dados de referência. Diversos estudos já foram feitos em ambientes dulcícolas da Europa e Ásia, isto se reflete nas identificações generalistas do nosso estudo uma vez que estes bancos de dados são utilizados como referência. A ausência de dados para a região Amazônica se reflete não só nas identificações mas, na necessidade de que estudos como o nosso sejam encorajados como, também a necessidade de formação de recursos humanos com expertise para desenvolvê-los.

Figura 8: Percentual dos gêneros identificados em cada uma das regiões de várzea. Arapixuna (ARAP) e Pixuna do Tapará (V) e suas diferentes profundidades: fundo (F) e superfície (S)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2022)

5 CONCLUSÃO

O presente estudo conseguiu realizar as identificações das regiões de várzea do baixo Amazonas no período da cheia (maio de 2022) através do banco de dados de Silva, onde ele utiliza de ferramentas que reconhecem o gene 16S e que definem o grau de similaridade de até 97%, mais que isso seria o grau de espécie e só chegamos até família. O gene se mostrou bastante promissor, assim como outros protocolos com utilização de outras metodologias, como o CO1 e 18S.

A diversidade de bactérias entre diferentes extratos de água mostrou pouca alteração do que a diferença notória entre as regiões de Arapixuna e Pixuna do Tapará. Há algumas hipóteses que permeiam a causa dessa diferença, mas precisa-se de mais estudos e coletas para verificar tal acontecimento.

Estudos adicionais que incluam parâmetros físico-químicos e que considerem os diferentes períodos (cheia e seca), são indispensáveis para aferir se a comunidade microbiana da região de Pixuna do Tapará sofre influência dos impactos ambientais causados pela expansão da zona portuária de Santarém, bem como do despejo de efluentes domésticos que são levados pelo fluxo do rio Amazonas. Uma vez que a posição geográfica de Arapixuna, fora da influência da área urbana da cidade, pode favorecer a comparação entre os dois pontos de várzea, servindo como área controle.

REFERÊNCIAS

ANDRUSZKIEWICZ, E. A., SASSOUBRE, L. M., and BOEHM, A. B. (2017a). **Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight.** *PLoS One*. 12(9).

ANDRUSZKIEWICZ, E. A., STARKS, H. A., CHAVEZ, F. P., SASSOUBRE, L. M., BLOCK, B. A., and BOEHM, A. B. (2017b). **Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding.** *PLoS One*. 12(4): e0176343

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 9898**: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro: ABNT 9898, 1987.

BANERJEE, S; SCHLAEPPI, K; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. **Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning.** *Nat Rev Microbiol* 16(9): 567-576. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>

BAYLEY, P. B. **Understanding large river: floodplain ecosystems.** *BioScience*, v.45, n. 3, p. 153-158, 1995. DOI: <https://doi.org/10.2307/1312554>

CALLAHAN, B. *et al.* **DADA2: Inferência de amostra de alta resolução a partir de dados de amplicon** Illumina. *Nat Methods* 13, 581–583. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

CHRZANOWSKI, T.; SIMEK, K. **Prey-size selection by freshwater flagellated protozoa.** *Limnology and oceanography*, 35: 1429-1436, 1990. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.1990.35.7.1429>

COTNER, J. B.; Biddanda, B. A. **Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems.** *Ecosystems*, v. 5, n. 2, p. 105-121, 2002.

CURTIS, T. P. *et al.* **What is the extent of prokaryotic diversity?** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 361, n. 1475, p. 2023-2037, 2006. DOI: 10.1098/rstb.2006.1921

DIAS, S. C. **Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 26, n. 4, p. 373–379, 2004. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v26i4.1511>

GOLDBERG, C.; STRICKLER, K.; PILLIOD, D. **Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms.** *Conservação Biológica*. 183: 1–3, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040>

JUNK, W.; BAYLEY, P.; SPARKS, R. **The flood pulse concept in river-floodplain systems.** *Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences*, v. 106, n. 1, p. 110-127, 1989.

KAYRANLI, B. *et al.* **Carbon storage and fluxes within freshwater wetlands: a critical review.** *Wetlands*, v. 30, n. 1, p. 111-124, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13157-009-0003-4>

KLINDWORTH, A. *et al.* **Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies.** *Nucleic Acids Research*, Volume 41(1), 2013. DOI: 10.1093/nar/gks808

LEBLANC, F. *et al.* **Environmental DNA (eDNA) detection of marine aquatic invasive species (AIS) in Eastern Canada using a targeted species-specific qPCR approach.** *Management of Biological Invasions*, Vol. 11(2), pp. 201-217, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3391/mbi.2020.11.2.03>

LINDSTRÖM, E.; LESKINEN, E. **Do neighboring lakes share common taxa of bacterioplankton? Comparison of 16S rDNA fingerprints and sequences from three geographic regions.** *Microbial Ecology*, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2002. DOI: 10.1007/s00248-002-0007-6

LIU, W. T.; MARSH, T. L.; CHEN, H.; FORNEY, L.J. **Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA.** *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997. DOI: 10.1128/aem.63.11.4516-4522.1997

LLIRÓS M, INCEOĞLU Ö, GARCÍA-ARMISEN T, ANZIL A, LEPORCQ B, *et al.* (2014) **Bacterial Community Composition in Three Freshwater Reservoirs of Different Alkalinity and Trophic Status.** *PLOS ONE* 9(12): e116145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116145>.

LOGARES, R. *et al.* **Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: Synopsis of current platforms and bioinformatics approaches.** *Journal of Microbiological Methods*. 91(1): 106- 113, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.017>

LUPATINI, M. *et al.* **Network topology reveals high connectance levels and few key microbial genera within soils.** *Frontiers in Environmental Science*, 2(10), 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.017>

MOYER, C. L. **Molecular phylogeny: applications and implications for marine microbiology.** In: *Methods in Microbiology – Marine Microbiology*. J. H. Paul (Ed.). Academic Press, USA. 19:375-394, 2001.

NEWTON, R. *et al.* **A guide to the natural history of freshwater lake bacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 75, n. 1, p. 14-49, 2011. DOI: 10.1128/MMBR.00028-10

PACE, NR (1997). "A molecular view of microbial diversity and the biosphere." *Science*, 276 (5313), 734-740.

PADILLA-GARCÍA, C. Y., CAMACHO-SÁNCHEZ, F. Y., & REYES-LÓPEZ, M. Á. (2021). **Metabarcoding de DNA ambiental: un enfoque para el seguimiento de la biodiversidad.** *Ciencia UAT*, 16(1), 136-149.

PEDRÓS-ALIÓ, C. **Marine microbial diversity: can it be determined?** *Trends in Microbiology*, 14(6): 257-263, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.007>

POMMIER, T. *et al.* **Spatial patterns of bacterial richness and evenness in the NW Mediterranean Sea explored by pyrosequencing of the 16S rRNA.** *Aquatic Microbial Ecology*, v. 61, p. 221-233, 2010. DOI: 10.3354/ame01484

PSENNER, R; SOMMARUGA, R. **Are rapid changes in bacterial biomass caused by shifts from top-down to bottom-up control?** *Limnology and Oceanography*, 37 (5): 1092-1100. *Science* 276(5313): 734-740, 1992. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.5.1092>

REES, H. *et al.* **A detecção de espécies de animais aquáticos usando DNA ambiental - Uma revisão do eDNA como uma ferramenta de pesquisa em ecologia.** *Journal of Applied Ecology*, p.1450–1459, 2014.

RUPPERT, KM, KLINE, RJ e RAHMAN, MS (2019). **Perspectivas passadas, presentes e futuras do metabarcoding de DNA ambiental (eDNA): uma revisão sistemática em métodos, monitoramento e aplicações de eDNA global.** *Ecologia Global e Conservação*. 17:e00547.

SHERR, E. B.; SHERR, B. F. **Microbial activity in aquatic systems from cell to biosphere– Aquatic Biosystems Plenary.** Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canadá, 1999

SOGIN, M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. M. Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta and G. J. Herndl (2006). **"Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”.**" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(32): 12115-12120.

SUNAGAWA, S. *et al.* **Structure and function of the global ocean microbiome.** *Science*, v. 348, n. 6237, p. 1261359, 2015. DOI: 10.1126/science.1261359

TABERLET, P., COISSAC, E., HAJIBABAEI, M., and RIESEBERG, L. H. (2012). **Environmental DNA.** *Molecular Ecology*. 21(8): 1789-1793.

THOMSEN, P. F. and WILLERSLEV, E. (2015). **Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity.** *Biological Conservation*. 183: 4-18.

TSUJI, S. *et al.* **The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis — A review of methods for collection, extraction, and detection.** *Environmental DNA*, v. 1, n. 2, p. 99-108, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/edn3.21>

ZAITSEVA, S. V; DAGUROVA, O. P. **Taxa microbiana de água doce como indicadores de impacto antropogênico nos lagos de água doce da Buriácia.** In: Série de Conferências IOP: Terra e Ciências Ambientais. Editora IOP, 2021. p. 012003.



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: Raquel Silva de Farias

CPF: 031.967.272-70_RG: 6842030_Telefone: (93) 991799885

E-mail: raquel.stmfarias@gmail.com

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

() Sim (X) Não

2. Identificação da obra

(X) Monografia () TCC () Dissertação () Tese () Artigo científico () Outros: _

Título da obra: Identificação de microrganismos aquáticos das regiões de várzea do Arapixuna e do Pixuna do Tapará, através de sequenciamento de nova geração

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

Data da conclusão: 19/01/2023.

Agência de fomento (quando houver): _____

Orientador: Gabriel Iketani Coelho

E-mail: iketani.g@gmail.com _____

Co-orientador: Luciana Pimentel da Silva

Examinadores: Ivana Barbosa Veneza e Diego Maia Zacardi _____

3. Informação de disponibilização do documento:

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

Restrição para publicação: () Total (X) Parcial (x) 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.

Santarém, 01/02/2023

Raquel Silva de Farias

Assinatura do autor

5. Tramitação no curso

Secretaria / Coordenação de curso

Recebido em ____/____/____. Responsável: _____

Siape/Carimbo