



EFEITOS DO AQUECIMENTO GLOBAL SOBRE O MICROBIOMA DE SISTEMAS AQUÁTICOS

Palavras-chave: aquecimento global; microbioma; bioinformática.

ALUNA: MARIA EUGÊNIA BETIM - UNICAMP

ORIENTADORA: PROF. DRA. VALERIA MAIA MERZEL - UNICAMP

Introdução geral

O agravamento das mudanças climáticas no Antropoceno é responsável por causar grande impacto na vida do planeta Terra (Cavicchioli et al. 2019). Ações antrópicas afetam diretamente plantas e animais, promovem a destruição de habitats, e a perda da diversidade e produtividade das espécies (Johnson et al. 2017; Pecl et al. 2017). Estes impactos podem levar à extinção de espécies e modificar a estrutura e funcionamento do meio ambiente, resultando em perdas irreversíveis e extremamente prejudiciais ao funcionamento do ecossistema (Millennium Ecosystem Assessment 2005).

O mundo microbiano é a base para a manutenção da vida na biosfera. Embora não sejam visíveis a olho nu, os microrganismos são essenciais para que haja diversidade e estabilidade no meio ambiente (Colwell 1997; Tardy 2014). São responsáveis pelo processo de ciclagem de energia e nutrientes (Colwell 1997; Cavicchioli et al. 2019), e sua diversidade é fundamental na manutenção e conservação global dos recursos (Colwell 1997; Falkowski, Fenchel & Delong 2008; Raina et al. 2009). Portanto, quando a diversidade microbiana é afetada, causa grande impacto na vida terrestre.

Desse modo, pesquisas sobre a diversidade microbiana vêm auxiliando no estudo e previsão dos impactos das mudanças climáticas sobre os micro e macrobiomas e como a estabilidade dos sistemas ecológicos é afetada em consequência das mesmas (Dillon et al. 2010). As mudanças climáticas em decorrência do aquecimento global previsto para o ano de 2100 provocarão alterações tanto no ambiente quanto nos organismos nele presentes (Urban et al. 2016), uma vez que, além de alterar redes de interação interespecíficas, também vão acelerar a taxa de liberação de carbono por florestas, lagos e pelo permafrost. Desta forma, o carbono se tornará mais acessível para ser utilizado na respiração microbiana, causando um feedback positivo capaz de promover aumento nas emissões de gases do efeito estufa (Karhu et al. 2014; Cavicchioli et al. 2019). Portanto, incluir esses organismos como foco de pesquisas poderá auxiliar no entendimento dos efeitos que as mudanças climáticas e perturbações ambientais provocam em suas comunidades (Astudillo-García et al. 2019), permitindo a projeção de curto a longo prazo desses impactos (Ancion, Lear & Lewis 2010).

Segundo relatório especial do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) de 2018, os efeitos do aquecimento global sobre o ecossistema já são nítidos e o nível de agravamento destes depende do ritmo da emissão de gases no decorrer das décadas até o ano de 2100. De acordo com Behrenfeld et al. (2006), o aumento na temperatura, além de afetar processos biológicos do ecossistema, no ambiente aquático, diminui a densidade da água e, como resultado, a dispersão dos organismos e o transporte de nutrientes das profundezas até a superfície, provocando a diminuição da produtividade primária. Desse modo, para projetar quais serão as consequências das mudanças climáticas em decorrência do aquecimento global em comunidades microbianas, tanto na sua filogenia quanto na diversidade funcional, é necessário a utilização de modelos de estudo eficazes na realização da projeção. Tendo isso em vista, a presente pesquisa tem como objetivo o estudo de micro-organismos aquáticos em mesocosmos artificiais, com água coletada de diferentes lagoas, mantidos em temperaturas controladas. Mesocosmos são sistemas capazes de reproduzir em menor

escala o ecossistema a ser estudado de maneira controlada e eficaz, e os dados obtidos permitem o desenvolvimento de modelos preditivos de quais serão os efeitos das alterações climáticas sobre o ambiente e seu funcionamento (Kratina et al. 2012; Shurin et al. 2012). Seu uso é importante para obter informação a respeito das respostas dadas pela comunidade para analisá-las em nível do ambiente real (Cavichioli et al. 2019).

Atividades desenvolvidas no período de 06/09/2022 a 03/07/2023 (10 meses)

O presente projeto de Iniciação Científica tem como base o experimento de mesocosmos, conduzido no âmbito do Projeto Temático “Ecossistemas aquáticos continentais sob mudanças climáticas: impactos em múltiplos níveis de organização (FAPESP/21/14192-5)”, liderado pelo Prof. Gustavo Romero, com co-coordenação da Prof. Dra. Valéria Maia Merzel. O estudo tem o intuito de analisar o efeito do aumento de temperatura sobre as comunidades microbianas de ecossistemas tropicais de água doce. Para buscar responder o questionamento do estudo, foram realizadas 8 coletas a partir dos tanques de mesocosmos, totalizando 480 amostras ambientais. O experimento teve duração de Setembro/2022 a Março/2023 e durante este tempo as temperaturas foram monitoradas e controladas por sistema automatizado. Após coleta das amostras de água dos mesocosmos, foi realizada a extração de DNA total da comunidade microbiana. Além disso, foram realizadas as análises de qualidade e quantificação do DNA ambiental extraído das amostras através de técnicas de eletroforese em gel de agarose e leitura de absorbância nos equipamentos NanoDrop e Qubit. O sequenciamento do DNA das amostras está sendo realizado através das tecnologias MinION Nanopore Oxford e Illumina e, com base nos dados obtidos do sequenciamento, será iniciada a última etapa, que inclui as análises estatísticas através de ferramentas em bioinformática. As atividades deste projeto estão sendo desenvolvidas com a colaboração do pós-doutorando Leandro Lemos e da bolsista de treinamento técnico Alejandra Calderon.

Objetivo geral

O objetivo deste presente estudo é investigar como os efeitos do aquecimento global previsto para o ano de 2100 afetam a diversidade filogenética das comunidades de micro-organismos de sistemas de água doce. Para isso, usamos mesocosmos com água coletada de lagoas naturais e que passaram por diferentes tratamentos de aquecimento.

Objetivos Específicos

3.2.1. Extração de DNA total das amostras de água dos tanques dos mesocosmos submetidos a diferentes tratamentos;

3.2.2 Sequenciamento dos *amplicons* de genes RNAr 16S em plataforma Illumina;

3.2.3. Análise de bioinformática dos dados do sequenciamento massivo de amplicons para comparação dos padrões taxonômicos (diversidade e composição) do microbioma de sistemas lacustres, a fim de investigar as variações ocorridas e eleger grupos taxonômicos que possam servir como bioindicadores de aquecimento global.

Material e métodos

Para investigar como os efeitos do aquecimento global interferem na composição e estrutura das comunidades microbianas de água doce, com o intuito de investigar as variações ocorridas e indicar grupos taxonômicos que possam ser usados como bioindicadores de aquecimento global, os seguintes métodos foram utilizados:

Coleta de amostras dos mesocosmos. Foram realizadas 8 coletas ao longo de 6 meses (tempos 0, 3, 7, 40, 80, 120, 160 e 180) dos tanques de mesocosmos. Alíquotas de 15 mL de água dos mesocosmos foram coletadas com pipetas de vidro esterilizadas em 3 diferentes níveis (do fundo do tanque, do meio e da superfície) e armazenados em tubos Falcon. Após, todo o conteúdo foi misturado em centrífuga, a fim de representar de maneira homogênea a comunidade microbiana em todo o mesocosmo, a água foi descartada e o pellet foi armazenado em microtubos e congelado para posterior preparo e extração do DNA.

Extração de DNA. Para extração, foram realizados procedimentos de preparo das amostras seguindo o protocolo de extração do fabricante do kit DNeasy Power Soil Pro QIAcube. As extrações ocorreram com o auxílio do robô de extração QIAcube Connect, que realiza a extração de DNA de 12 amostras por vez, automaticamente. Após a extração, o conteúdo foi armazenado em tubos de eluição e congelado, para posterior análise da qualidade do DNA.

Integridade e quantificação de DNA. Para verificação da qualidade e quantidade do DNA obtido nas extrações, foram realizadas as seguintes técnicas moleculares: eletroforese em gel de agarose, e leitura da absorbância nos equipamentos NanoDrop e Qubit..

Sequenciamento de DNA. O sequenciamento do DNA está sendo realizado através da tecnologia portátil MinION, um dispositivo desenvolvido pela Oxford Nanopore Technologies, e realiza o sequenciamento através da ligação de adaptadores nas extremidades do DNA, para permitir a passagem deste pelos nanoporos do equipamento, gerando sinais elétricos que permitem a identificação das sequências de DNA e posterior montagem desta. Os dados obtidos no sequenciamento são armazenados em arquivos. Posteriormente, será realizado novo sequenciamento utilizando a plataforma Illumina - MiSeq -, que realiza o sequenciamento por sínteses, onde os fragmentos são imobilizados em lâminas de fluxo e há incorporação de bases a cada ciclo, atividade registrada pelo sequenciador que permite identificar a sequência do DNA. Após obter informações acerca do sequenciamento pelo MinION e da plataforma Illumina, esses dados serão comparados, a fim de obter maior precisão acerca dos dados obtidos e, por fim, identificar se houve ou não alteração na composição da comunidade de uma espécie para outra.

Análise de dados. A análise dos dados obtidos no sequenciamento será realizada através do sistema operacional Linux, com a ajuda da ferramenta Porechop, necessária para remoção dos adaptadores nas extremidades do DNA, para que a qualidade e interpretação dos dados não seja afetada. Assim, o Porechop ajuda a melhorar a qualidade e precisão dos dados. (completar com as informações do Illumina)

Resultados

As 8 coletas, realizadas nos tempos 0, 3, 7, 40, 80, 120, 160, 180 foram finalizadas, totalizando 480 amostras ambientais. Além disso, as extrações, quantificação e análise de integridade do DNA de todas as amostras foram concluídas, mostrando um resultado satisfatório para praticamente todas as amostras, com alta concentração e integridade do DNA, indicando que o DNA das amostras está adequado para a etapa de sequenciamento, que está sendo realizada.

Como exemplificação de resultados neste relatório parcial, iremos reportar os resultados do tempo inicial do experimento (tempo 0) (Figura 1). O resultado obtido pelo gel de agarose indica indiretamente uma alta concentração e integridade do DNA. Para validar esses resultados, as análises foram realizadas também nos equipamentos Nanodrop e Qubit. Todas as rotinas de Biologia Molecular estão sendo realizadas em colaboração com a bolsista de Treinamento Técnico III/FAPESP (Angie Alejandra Calderon Fajardo).

O valor da razão A260/A280 obtido para as 480 amostras analisadas foi satisfatório, indicando alta pureza do DNA e, portanto, que estão adequadas para o sequenciamento. Além disso, as 480 amostras analisadas no Qubit mostraram que os valores de concentração de DNA variaram de 5,92 a 632 ng/μL, menor e maior concentração, respectivamente. Tais dados indicam boa

concentração do DNA para as etapas subsequentes de amplificação do gene RNAr 16S e sequenciamento.

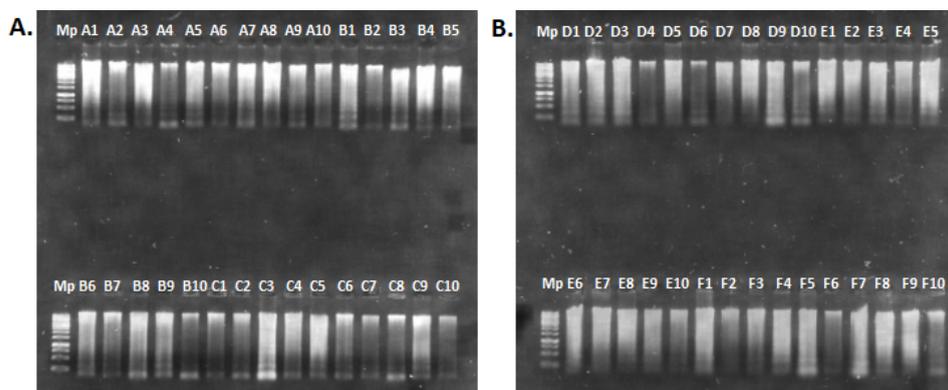


Figura 1. Análise de eletroforese em gel de agarose de DNA das amostras coletadas do tempo inicial do experimento de mesocosmos.

Cronograma

As etapas de revisão bibliográfica, coletas, extração e avaliação da qualidade e quantidade do DNA das amostras ambientais foram concluídas no período de Set/22 - Jun/23. As etapas de sequenciamento e análise dos dados através de bioinformática estão atualmente em andamento.

Referências bibliográficas

- Ancion, P. Y., Lear, G. & Lewis, G. D. 2010. Three common metal contaminants of urban runoff (Zn, Cu & Pb) accumulate in freshwater biofilm and modify embedded bacterial communities. *Environmental Pollution*. 158(8), 2738–2745. doi:10.1016/j.envpol.2010.04.013
- Astudillo-García, C. et al. 2019. Microbial assemblages and bioindicators as proxies for ecosystem health status: potential and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103:6407–6421 doi:10.1007/s00253-019-09963-0
- Behrenfeld, M. J. et al. 2016. Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature* 444: 752–755.
- Cavicchioli, R. et al. 2019. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*. 17: 569-586 doi:10.1038/s41579-019-0222-5
- Colwell, R. R. 1997. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18: 302–307. doi:10.1038/sj.jim.2900390
- Dillon, M. E., Wang, G. & Huey, R. B. 2010. Global metabolic impacts of recent climate warming. *Nature* 467: 704–706.
- Falkowski, P. G., Fenchel T. & DeLong, E. F. 2008. The microbial engine that drives the Earth's biogeochemical cycles. *Science* 320:1034–1039
- IPCC 2018. Global warming of 1.5°C. Summary for policymakers. ISBN 978-92-9169-151-7.
- Johnson, C. N. et al. 2017. Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. *Science* 356: 270–275
- Karhu, K. et al. 2014. Temperature sensitivity of soil respiration rates enhanced by microbial community response. *Nature* 513, 81–84
- Pecl, G. T. et al. 2017. Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being. *Science*. 355: eaai9214 doi: 10.1126/science.aai9214
- Raina, J. B. et al. 2009. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Appl Environ Microbiol* 75:3492–3501. https://doi.org/10.1128/AEM.02567-08
- Shurin, J. B. et al. 2012. Warming shifts top-down and bottom-up control of pond food web structure and function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* vol. 367: 3008-3017.
- Tardy, V. et al. 2014. Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity. *Environ Microbiol Rep* 6(2):173–183. doi:10.1111/1758-2229.12126
- Urban, M. C. et al. 2016. Improving the forecast for biodiversity under climate change. *Science*, 353(6304), aad8466–aad8466. doi:10.1126/science.aad8466