



MANUAL PARA O MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA POR MEIO DE DNA AMBIENTAL (eDNA)



Belém / PA
Março / 2021

RELATÓRIO TÉCNICO ITV DS

**MANUAL PARA O MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA
POR MEIO DE DNA AMBIENTAL (eDNA)**

**Paulo Henrique de Oliveira Costa
Gisele Lopes Nunes
Vitória Catarina Cardoso Martins
Jamilly Lorena
Renato Renison Moreira Oliveira
José Augusto Pires Bitencourt
Eder Pires
Rafael Valadares
Santelmo Vasconcelos
Guilherme Oliveira**

**Belém / PA
Março / 2021
Versão 1**

| | |
|---|---------------------------------|
| Título: Manual para o monitoramento da ictiofauna por meio de DNA ambiental – eDNA | |
| PROD. TEC. ITV DS – N24/2020 | Revisão 00 |
| Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (X) Pública | |

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

Citar como COSTA, Paulo Henrique de Oliveria; *et al.* **Manual para o monitoramento da ictiofauna por meio de DNA ambiental - eDNA.** Belém: ITV, 2019. (Relatório Técnico - N024.2020)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C837m Costa, Paulo Henrique de Oliveira.

Manual para o monitoramento da ictiofauna por meio de DNA ambiental – eDNA / Paulo Henrique de Oliveira Costa... [et al]. -- Belém, 2020.

20 p.: il.

Relatório Técnico (Instituto Tecnológico Vale) - 2020
PROD. TEC. ITV DS - N024/2020
DOI 10.2293/PROD.TEC.ITV.DS.2020.24.Oliveira

1. Peixes - pesquisa. 2. Extrativismo. 3. DNA vegetal. 4. Conservação. I. Nunes, Gisele Lopes. II. Martins, Vitória Catarina Cardoso. III. Lorena, Jamily. IV. Oliveira, Renato Renison Moreira. V. Bitencourt, José Augusto. VI. Pires, Eder. VII. Valadares, Rafael. XIII. Vasconcelos, Santelmo. IX. Oliveira, Guilherme. X. Título

CDD 23. ed. 639.90098115

Bibliotecária responsável: Nisa Gonçalves / CRB 2 – 525

RESUMO EXECUTIVO

A ictiofauna amazônica é composta por uma enorme diversidade de peixes sendo muitas espécies de ocorrência local. Programas de conservação e monitoramento são muitas vezes dificultados tanto pela falta de especialistas quanto pela dificuldade da captura dos espécimes. A criação de indicadores biológicos é de suma importância principalmente para mineração, que necessita realizar monitoramento periódico para verificar se suas atividades estão ou podem causar impactos sob a diversidade ao entorno do empreendimento. Na Serra dos Carajás, um dos maiores depósitos mineral do mundo, existem lagoas que demandam monitoramento devido suas peculiaridades e possibilidades de impactos. Essas lagoas são formadas sob crostas lateríticas ricas em ferro, em platôs acima de 770 m acima do nível do mar, no qual o nível de água é mantido pelo regime de chuvas da região. Pensando em estratégias de manejo mais eficientes e rápidos, este trabalho teve como objetivo validar uma nova abordagem de levantamento de biodiversidade da ictiofauna utilizando os rastros de DNA presentes no ambiente. Para isso, foi usado a técnica de DNA *metabarcoding* que permite avaliar a diversidade e riqueza de espécies sem necessidade de captura, e sim através da análise de pequenos fragmentos de DNA a partir de uma amostra ambiental, como água ou sedimentos dos rios e lagoas.

RESUMO

A ictiofauna da região neotropical é composta por uma elevada riqueza de espécies de peixes. Estima-se que a metade das espécies descritas são endêmicas da bacia Amazônica. O uso sustentável e a conservação dos recursos aquáticos na Amazônia são um grande desafio, o reconhecimento de todo o território é algo difícil de ser realizado, bem como todas as relações dos organismos com o ambiente. Nesse contexto, este manual tem como objetivo estabelecer parâmetros experimentais e analíticos para o uso do DNA ambiental de peixes presentes em cursos de água em S11D como uma ferramenta para monitoramento da vida aquática. O DNA *metabarcoding* é uma ferramenta que pode ser aplicada em projetos de monitoramento ambiental, no qual permite estudos de conservação da biodiversidade, proporcionando um resultado econômico, rápido e confiável. Com isso, espera-se captura de sinais da biodiversidade da ictiofauna sem a necessidade de amostragem direta de espécimes.

Palavras-chave: Amazônia. Ictiofauna. DNA *metabarcoding*

ABSTRACT

The ichthyofauna of the neotropical region is composed of a high richness of fish species. It is estimated that half of the described species are endemic to the Amazon basin. Sustainable use and conservation of aquatic resources in the Amazon is a significant challenge. The recognition of the entire territory is something challenging to be accomplished, as well as all the relations of the organisms with the environment. In this context, the present study aims to establish experimental and analytical parameters for using environmental DNA from fish in streams in S11D as a monitoring tool. DNA *metabarcoding* is a tool that can be applied in environmental monitoring projects, which allow biodiversity conservation studies, to provide an economical, fast and reliable result. Thus, it is expected to capture signals of ichthyofauna biodiversity without the need for direct specimen sampling.

Keywords: Amazon. Ichthyofauna. DNA *metabarcoding*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - FILTRO STERIVEX COM A TRAVA “LEUER LOCK” MOSTRADA NA PARTE INFERIOR DO FILTRO EM A. SERINGA COM “LEUER LOCK”. B SERINGA DEVE SER ACOPLADA AO FILTRO COMO MOSTRADO EM C. O SACO WHIRL-PAK É MOSTRADO EM D | 11 |
| FIGURA 2 - ETAPAS PARA COLETA DE AMOSTRA COM FILTRO STERIVEX | 12 |
| FIGURA 3 - PROCESSO DE REMOÇÃO DO FILTRO DO STERIVEX (MILLIPORE) PARA EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS AMOSTRAS | 13 |
| FIGURA 4 - PLATAFORMA MiSEQ SYSTEM ILLUMINA | 16 |
| FIGURA 5 - FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO MOSTRANDO AS ETAPAS DE ANÁLISE DO PIPELINE PIMBA: A PIPELINE FOR METABARCODING ANALYSIS | 19 |
| FIGURA 6 - EXEMPLOS DOS AQUIVOS FINAIS GERADOS PELAS ETAPAS DE ANÁLISE DO PIPELINE PIMBA. ESSES SÃO OS ARQUIVOS QUE PODEM SER UTILIZADOS EM ANÁLISES ESTATÍSTICAS POSTERIORES. | 24 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 MÉTODOS | 10 |
| 2.1 COLETA DE AMOSTRA..... | 10 |
| 2.2 EXTRAÇÃO DO DNA..... | 12 |
| 2.3 AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS | 13 |
| 2.4 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA PARA SEQUENCIAMENTO | 14 |
| 2.5 SEQUENCIAMENTO | 16 |
| 3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA | 17 |
| 3.1 PASSO A PASSO CONTENDO AS ETAPAS E COMANDOS A SEREM UTILIZADOS NO SERVIDOR DO ITV | 19 |
| 3.1.1 Acesso ao Cluster | 19 |
| 3.1.2 Execução do pipeline PIMBA | 21 |
| 4 LISTA DE MATERIAIS | 25 |
| REFERÊNCIAS | 29 |
| ANEXOS | 31 |

1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna da região neotropical é conhecida por sua elevada riqueza e diversidade de espécies de peixes. Estima-se que a metade das espécies descritas da bacia Amazônica são endêmicas (REIS *et al.*, 2016). A diversidade de peixes presentes na bacia Amazônica está associada a vários aspectos ambientais como temperatura, complexidade de rios, variação do nível da água, habitats, condição de acidez, entre outros aspectos associados à geologia da bacia (FREITAS *et al.*, 2014).

A conservação e o uso sustentável dos recursos aquáticos na Amazônia são um grande desafio. O reconhecimento de todo o território é algo difícil de ser realizado, bem como a diversidade de relações que ocorre entre os organismos presentes no ambiente. Com isso, estudos que utilizam estimativas ecológicas como ferramenta para monitoramento de comunidades de peixes são de grande importância por fornecerem indicadores que podem ser úteis para a gestão dos recursos na bacia amazônica. Os bioindicadores podem ser utilizados para estimar a diversidade de um determinado ambiente e também para medir os níveis de contaminação depois de uma mudança ocorrida (JARAMILLO-VILLA; CARAMASCHI, 2008).

Neste sentido, a aplicação de novas tecnologias que viabilizam a caracterização de espécies em larga escala podem ser de grande valia em estudos de levantamento da biodiversidade. A técnica de DNA *metabarcoding* utiliza o DNA presente em água, solos, sedimentos ou tecidos vegetais/animais para a obtenção de fragmentos específicos de DNA, permitindo identificar as espécies presentes em um determinado ambiente sem necessidade de captura (CORLETT, 2017). O sucesso da abordagem de DNA *metabarcoding* está diretamente associado a disponibilidade de bancos de dados de códigos de barra de DNA, que são construídos a partir de sequências de DNA de uma espécie específica com identificação taxonômica determinadas previamente por especialistas (FAZEKAS, 2009). A construção desses bancos referenciados é um pré-requisito para a obtenção de resultados confiáveis, uma vez que a técnica identifica de forma simultânea múltiplas espécies com base na comparação dos códigos de barras de DNA de uma amostra ambiental com os depositados em banco de dados de referência (HEBERT *et al.*, 2003).

O DNA *metabarcoding* é uma ferramenta que pode ser aplicada em projetos de monitoramento ambiental, possibilitando avaliar a eficiência das estratégias de manejo, assim como de estudos de conservação da biodiversidade, proporcionando

um resultado econômico, rápido e confiável (VAFEIADOU, 2019). Assim, esse trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia DNA *metabarcoding* para captura de sinais da biodiversidade da ictiofauna utilizando sequenciamento massivo do DNA a partir de amostras ambientais.

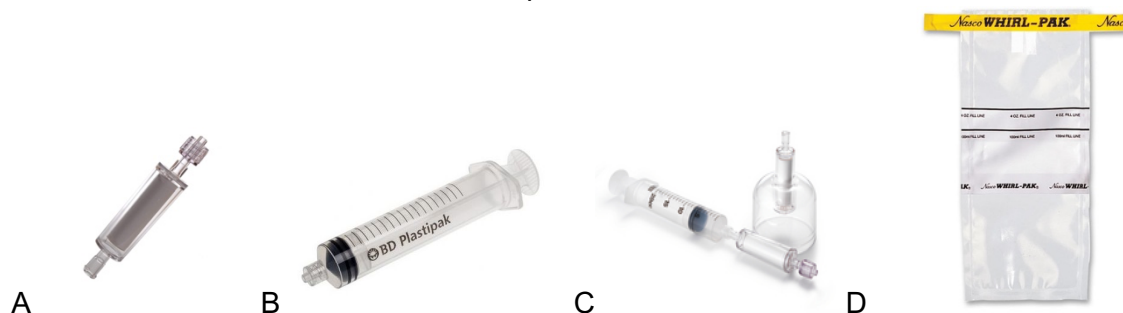
2 MÉTODOS

2.1 COLETA DE AMOSTRA

Todo o procedimento de filtragem deve ser conduzido com luvas de acetonitrila descartáveis. Um par de luvas diferentes deve ser utilizado para cada local amostrado. Caso a luva toque uma superfície que esteja contaminada ela deve ser trocada.

As amostras são coletadas com o uso de tubos com filtros de 0,22 µm tipo Sterivex com trava do tipo “Leuer Lock”. O pacote do filtro deve ser aberto no topo e guardado. No filtro é em seguida colada uma etiqueta com um número identificador único. A água deve ser coletada com uma seringa de 50 ou 60 mL que tenha também uma trava “Leuer Lock”. Após a coleta da água a seringa deve ser acoplada ao Sterivex pela trava “Leuer Lock” e apertada manualmente para o líquido ser filtrado. Após a filtragem de todo o líquido a seringa é desacoplada e o processo repetido. O filtro deve ser colocado dentro do pacote em que estava após ser descoplado para evitar contaminação. O processo é repetido pelo número de vezes necessário para que o filtro sature e não seja mais possível forçar a filtragem. O número de vezes em que o processo é repetido depende da quantidade de partículas e de matéria orgânica na água.

Figura 1 - Filtro Sterivex com a trava “Leuer Lock” mostrada na parte inferior do filtro em A. Seringa com “Leuer Lock”. B seringa deve ser acoplada ao filtro como mostrado em C. O saco whirl-pak é mostrado em D



Fonte: Millipore (2019)

Filtros devem ser coletados em triplicata e a cada filtro deve ser dado um número identificador único. Escrever em um saco whirl-pak novo informações sobre o local da coleta. Os três filtros do mesmo local devem ser colocados em um saco whirl-pak que é em seguida fechado. O saco em seguida é colocado em uma sacola térmica contendo gelo químico que foi congelado de um dia para o outro a -20°C .

Para cada local amostrado metadados associados devem ser coletados. Os metadados a serem coletados dependem do projeto e devem ser descritos em uma planilha antes da campanha de campo. Metadados como coordenadas GPS do local, código da amostra, data da coleta e coletor são obrigatórios. Fotos do local de coleta são também desejáveis. Todos os metadados devem ser coletados e anotados no papel no momento da coleta, exceto material que poderá ser enviado para análises adicionais. A esses materiais deve ser anexada uma identificação que o conecte às amostras. Idealmente devem ser preparadas etiquetas adesivas para o número de tubos e amostras a serem coletada e uma para a folha da coleta. Na folha da coleta são coladas as etiquetas associadas e os metadados associados. Ao final da anotação dos metadados a mesma câmera utilizada para as fotos é utilizada para bater uma foto das anotações. Assim, fica fácil de conectar as fotos tiradas aos dados do local, que representa a última foto. A planilha com os metadados deve ser digitalizada preferencialmente no mesmo dia da coleta.

O saco contendo os tubos deve ser colocado em freezer -20°C ao final do dia de trabalho. O transporte aéreo deve ser feito na sacola térmica com o gelo químico congelado a -20°C . Ao chegar ao laboratório o material deve imediatamente ser armazenado a -80°C .

Figura 2 - Etapas para coleta de amostra com filtro Sterivex



Fonte: The eDNA Society (2019)

2.2 EXTRAÇÃO DO DNA

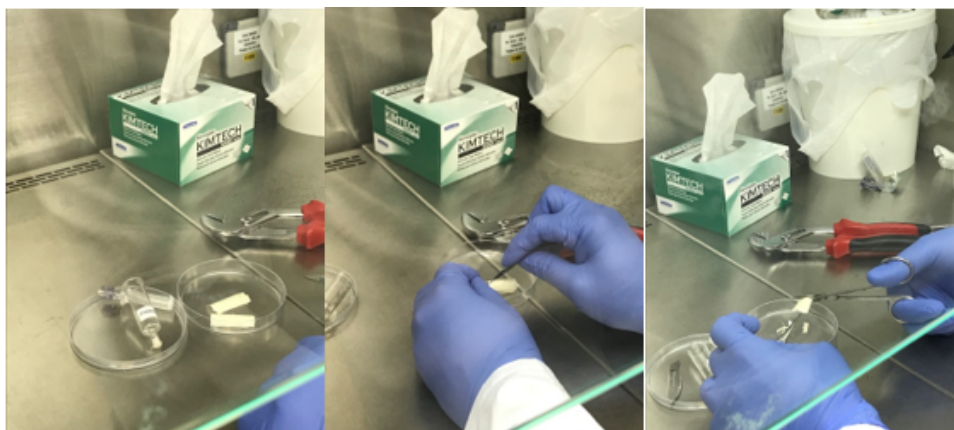
O processo de extração de DNA deve ser realizado em capela de fluxo laminar, previamente limpa e esterilizada com UV para evitar contaminação. Além disso, controles negativos devem ser utilizados. A extração de DNA deve ocorrer para cada tubo Sterivex (Millipore) que é aberto utilizando um alicate esterilizado. O filtro é retirado do tubo e cortado em pequenas seções, como demonstrado na (Figura 3). Em seguida, o DNA é extraído das seções usando o kit QIAGEN PowerSoil® DNA Isolation Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Para cada microtubo são adicionados 60 µL de solução C1. O microtubo é invertido manualmente por 10 vezes. Posteriormente, os microtubos são agitados em *vortex* horizontal adaptado (Mix Mate) por 10 minutos em velocidade máxima. Os microtubos devem ser centrifugados por 14.000 rpm a 30 segundos e 500 µL de sobrenadante é transferido para um novo microtubo, proporcionado pelo kit.

Adiciona-se 250 µL de solução C2, e o tubo é agitado no *vortex* (Mix Mate) por 5 segundos e imediatamente incubado a 4°C por 5 minutos. Logo após, deve ser centrifugado por 1 minuto a 14.000 rpm e 600 µL do sobrenadante transferido de para um novo microtubo. Em seguida, são adicionados 200 µL de solução C3 e o tubo agitado no *vortex* (Mix Mate) por 5 segundos e incubado novamente a 4°C por 5 minutos. Os microtubos são centrifugados a 14.000 rpm por um minuto e 750 µL do sobrenadante é transferido para um novo microtubo, onde é adicionado 1.200 µL da solução C4 e o tubo agitado no *vortex* (Mix Mate) por 5 segundo.

Posteriormente, são adicionados 675 μ L da solução agitada em um microtubo que contém uma coluna de sílica acoplada e centrifugar por um minuto a 14.000 rpm. Esse passo é repetido três vezes e logo após são adicionados 500 μ L de solução C5. O microtubo é centrifugado por 30 segundos a 14.000 rpm. Em seguida, a coluna de sílica é transferida para um novo microtubo ao qual são adicionados 50 μ L de solução C6 no centro da coluna para fazer a eluição do DNA. O microtubo é em seguida centrifugado por 30 segundos a 14.000 rpm. A coluna de sílica é descartada e o DNA é armazenado a temperatura de 4°C.

A concentração de DNA deve ser verificada através do Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific) com o kit Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay (Thermo Fisher Scientific). A qualidade do DNA é obtida através de eletroforese em gel de agarose a 1% (LifeTechnologies, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Figura 3 - Processo de remoção do filtro do Sterivex (Millipore) para extração de DNA total das amostras



Fonte: Autoria própria (2019)

2.3 AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS

Para a realização da técnica de PCR utilizar os pares de *primers* L1091 (AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT) e H1478 (TGA CTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT) (YANG *et al.*, 2014), com adaptadores para a plataforma MiSeq-Illumina. Esse conjunto de *primer* altamente recomendado para peixes permite amplificar fragmentos de DNA pertencentes ao gene mitocondrial 12S DNAr. Os *primers* podem ser sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA technologies) em escala de síntese padrão.

As amplificações devem ser feitas em triplicatas para cada amostra e combinadas na etapa da primeira purificação. Controles negativos devem ser feitos

para cada PCR realizada. Para a primeira PCR, utilizar 2,5 µL 5x Buffer, 1,2 µL 25 mM MgCl₂, 1 µL 2 mM dNTP, 0,25 µL L1091 10 pmol, 0,25 µL H1478 10 pmol, 0,1 µL Taq, 4,2 µL H₂O ultrapura e 3 µL DNA totalizando um volume de 12,5 µL para cada amostra. O volume dos reagentes deve ser multiplicado pelo número de amostras +1 e adicionados a um tubo eppendorf para formulação do MIX, excluindo apenas o DNA. Adicionar aos tubo identificados com o nome da amostra a quantidade de 9,5 µL do MIX + 3 µL de DNA de amostra. As reações de PCR devem ser amplificadas no termociclador Veriti 96 com as seguinte configurações: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; seguida por 30 ciclos de amplificação com 1 minuto a 94°C (desnaturação do DNA), 1 minuto a 57°C (anelamento dos *primers*) e 1 minuto à 72°C (extensão da fita de DNA); e a extensão final por 2 minutos a 72°C.

- Preparo da solução de estoque (*Primer*)

Antes de preparar a solução estoque deve-se centrifugar o tubo do *primer* liofilizado por 30 segundos. Para a solução estoque, a quantidade de número de mols é multiplicada por 10. O valor da multiplicação é a quantidade em microlitros de água ultrapura que precisa ser adicionada ao *primer* liofilizado. Recomenda-se vortexar por 30 segundos a 1 minuto para ter certeza que o *primer* está bem dissolvido.

- Preparo da solução de uso (*Primer*)

Para preparar a solução que vai ser adicionada na reação em cadeia da polimerase (PCR) é necessário diluir para 10 micromolar. Para tanto, utiliza-se 10 µL da solução estoque em 90 µL de água ultrapura.

2.4 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA PARA SEQUENCIAMENTO

Recomendamos para a construção da biblioteca utilizar o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA), com modificação somente dos *primers* para a construção da biblioteca referente ao gene mitocondrial 12S DNAr. Os *primers* modificados (L1091 e H1478) contêm sequências nucleotídicas chamadas *overhang*, que permitem a adição dos *indexes* nas etapas posteriores. Os procedimentos da primeira purificação do DNA devem ser feitos a partir do produto da PCR (*amplicons*) utilizando o kit Agencourt Ampure XP beads (Bechman Coulter, Inc., Brea, EUA).

Para avaliar a qualidade dos amplicons, as amostras devem ser submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Para preparo do gel, 1g de agarose é adicionado a 100 mL de TBE 1X e a solução dissolvida em micro-ondas por 2 minutos. Posteriormente, o corante fluorescente Syber Safe Thermo Fisher Scientific (10 µL para cada 100 mL de gel de agarose) é adicionado ao gel e a mistura adicionada na cuba de eletroforese para solidificação (aproximadamente 30 minutos). Para preparo da amostra, 5 µL de produto de PCR, 1 µL de DNA-ladder 50 pb (Invitrogen™) e 1,0 µL de corante azul de bromofenol devem ser misturados. Assim que o gel estiver solidificado, inserir o tampão TBE 1X ou 0,5X na cuba de eletroforese juntamente com o gel e aplicar as amostras nos poços com uma ajuda de uma pipeta. Iniciar a corrida utilizando uma corrente elétrica de 90 V por 40 minutos. Para uma verificação mais precisa dos tamanhos dos amplicons, utiliza-se o Bioanalyzer Agilent Technology 2100 (PANARO et al. 2000), de acordo com instruções do kit Agilent DNA 1000 (Agilent Technologies).

Após a verificação dos *amplicons*, adaptadores de sequências únicas (*indexes*) devem ser adicionados a cada amostra através da etapa de Index utilizando o kit Nextera XT Library prep (Illumina), conforme instruções do protocolo (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina). Para a segunda PCR, utilizar 5 µL de Nextera XT index Primer1, 5 µL de Nextera XT index Primer2, 25 µL de enzima 2x Kapa Hifi HotStart Ready Mix, 10 µL de água ultrapura e 5 µL de DNA totalizando um volume de 50 µL. As PCRs devem ser realizadas no termociclador Veriti 96 com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; seguida por 8 ciclos de amplificação com 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C; com extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto do index de PCR deve ser purificado novamente com o kit de esferas magnéticas AMPure XP beads (Beckman Coulter), quantificado através do Kit de DNA Qubit™ dsDNA HS (High Sensitivity) Assay (Thermo Fisher Scientific) e fluorímetro Qubit®3.0 (Thermo Fisher Scientific). A qualidade dos *amplicons* é verificada quanto ao tamanho dos fragmentos, por meio de eletroforese capilar, utilizando o Bioanalyzer Agilent Technology 2100 (PANARO et al., 2000). Todos os procedimentos também foram feitos com os controles negativos.

2.5 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento deve ocorrer com a padronização da biblioteca para a concentração de 4 nM, processo que equaliza a quantidade de DNA em cada biblioteca, e certifica uma representação igualitária de todas as amostras. Logo após, o *pool* genômico é agrupado em um único tubo de acordo com o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation da Illumina (Illumina). Em seguida, o pool de biblioteca deve ser codificado com PhiX, uma biblioteca padrão da Illumina utilizada para aumentar a diversidade de fragmentos nas corridas de sequenciamento. Por fim, é realizado o sequenciamento de *amplicons* na plataforma MiSeq-Illumina como demonstrado na figura 4, utilizando o kit de corrida MiSeq 300 ciclos.

Figura 4 - Plataforma MiSeq System Illumina



Fonte: Illumina (2020)

Passo a passo de execução do sequenciamento acordo com o protocolo Guia do Sistema MiSeq (Apêndice):

1° Passo: Preparar o cartucho de reagente pré-carregado para uso.

2° Passo: Desnaturar e diluir as bibliotecas.

3° Passo: Colocar a mistura da biblioteca no cartucho de reagente no reservatório designado.

4° Passo: Na interface do *software*, selecionar Sequence (Sequenciamento) para iniciar as etapas de configuração da execução ou conecte-se ao BaseSpace ou ao BaseSpace Onsite.

5° Passo: Limpar e secar cuidadosamente a lâmina de fluxo. Carregar a lâmina de fluxo.

6° Passo: Carregar o frasco de PR2 e verificar se o frasco de resíduos está vazio. Carregue o cartucho de reagente.

7° Passo: Revisar os parâmetros da execução e os resultados da verificação pré-execução. Selecionar Start Run (Iniciar execução).

8° Passo: Monitorar a execução pela interface do MCS ou por outro computador usando o Sequencing Analysis Viewer (SAV).

9° Passo: Realizar uma limpeza após a execução.

3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As sequências brutas geradas pelo sequenciamento devem ser submetidas ao PIMBA (A Pipeline for MetaBarcoding Analysis) (OLIVEIRA *et al.*, 2021), um *pipeline* voltado para análise de dados de DNA *metabarcoding* que permite a utilizar bancos de dados taxonômicos distintos. A escolha do banco de dados é uma etapa muito importante na análise de DNA *metabarcoding* pois depende do alvo amostral (plantas, animais, microrganismos etc.) e marcador utilizado (ITS, COI, 12S DNAr, 16S DNAr etc.).

O PIMBA foi desenvolvido pelo grupo de bioinformática do Instituto Tecnológico Vale – Desenvolvimento Sustentável para análise de metabarcodes de plantas e tem como base o *pipeline* QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO *et al.*, 2010, BOYLEN *et al.*, 2019), um *pipeline* referência desenvolvido para estudos de microbioma. Este *pipeline* é composto por várias etapas (tratamento e qualidade das sequências, classificação taxonômica, reconstrução filogenética, análise de diversidade) que foram adaptadas para a análise de DNA *metabarcoding* de plantas (Figura 4). O download do *pipeline* e manual de

uso está disponível no GitHub (<https://github.com/reinator/pimba>). O PIMBA funciona nos seguintes sistemas operacionais: LINUX e macOS.

Resumidamente, o PIMBA fará a etapa de trimagem (remoção de adaptadores) e filtragem por qualidade (Phred >20) utilizando a ferramenta Adapter Removal (SCHUBERT, LINDGREEN & ORLANDO, 2016). Posteriormente, somente sequências *forward* e *reverse* de alta qualidade serão montadas através do montador Pear (ZHANG *et al.*, 2014). Após a montagem, ocorre a etapa de derreplicação para a remoção das sequências duplicadas e em seguida a exclusão de sequências com cópia única. Com intuito de melhorar a qualidade dos dados, as sequências menores que 100 pb são descartadas (isso depende do tamanho do marcador molecular utilizado). Em seguida, as sequências são agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) utilizando o VSEARCH (ROGNES *et al.*, 2016). O agrupamento das sequências OTUs é usada para classificar grupos de indivíduos com similaridade > 97% (essa percentagem depende do grupo de organismo a ser trabalhado ou marcador molecular utilizado). Finalmente as OTUs são comparadas com sequências disponíveis em bancos de dados públicos como o NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ou bancos específicos como no caso do ITVBioBase, um banco de dados que contém sequências de plantas (*matK*, *rbcL*, *rpoB*, and *rpoC1*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI* and *trnH-psbA* e ITS2), invertebrados (COI), morcegos (COI) e peixes (12S e 16S DNAr) que ocorrem em Carajás. Esse banco foi devidamente construído e curado por especialistas com foco na área de atuação da Vale.

Guilherme Oliveira pelo email guilherme.oliveira@itv.org. Uma vez liberado, um **usuário** e **senha** serão disponibilizados e estes serão utilizados a seguir

1. Entrar no terminal

```
ssh <usuário>@uv3000
```

2. Criar uma pasta com seu projeto dentro da sua pasta principal

```
mkdir <nome_projeto>
```

3. Entrar na pasta criada

```
cd <nome_projeto>
```

4. Copiar para sua pasta **<nome_projeto>** os arquivos os “pbs” que estão dentro da pasta **pimba_prepare** (illumina ou ionTorrent), **pimba_run** e **pimba_plot** que estão alocados no endereço **/bio/pimba_metabarcoding/docker/examples/**

```
cp  
/bio/pimba_metabarcoding/docker/examples/pimba_prepare/illumina/job  
_prepare.pbs .
```

```
cp  
/bio/pimba_metabarcoding/docker/examples/pimba_run/job_pimba.pbs .
```

```
cp  
/bio/pimba_metabarcoding/docker/examples/pimba_run/databases.txt .
```

```
cp  
bio/pimba_metabarcoding/docker/examples/pimba_plot/job_pimbaplot.p  
bs .
```

```
cp  
/bio/pimba_metabarcoding/examples/pimba_prepareData/illumina/adapt  
ers.txt .
```

(configurar o arquivo adapters.txt de acordo com seus marcadores moleculares utilizados)

5. Criar uma pasta chamada rawdata para alocar os dados brutos

```
mkdir rawdata
```

```
chmod 777 rawdata (permissão de acesso a pasta)
```

OBS : Os dados do sequenciamento que serão copiados para a pasta rawdata devem ser solicitados a Gisele Nunes (gisele.nunes@itv.org) ou Eder Pires (eder.pires@itv.org).

3.1.2 Execução do pipeline PIMBA

Assim que os dados do sequenciamento estiverem disponíveis na pasta rawdata execute os comandos abaixo. Lembrar que para executar o comando, o usuário deve estar dentro da pasta **<nome_projeto>**

Os comandos executados no cluster ITV devem ser via *pbs* chamado pela função *qsub*, na fila 2 (-q) e arquivo contendo os scripts desejados (*arquivo.pbs*)

Passo 1: Prepare seus dados (pimba_prepare.sh)

A primeira etapa executa os scripts de tratamento de qualidade como controle de qualidade e merge das sequências caso seja paired-end.

```
qsub -q op2 job_prepare.pbs
```

OBS: caso queira editar os parâmetros de tratamento deve se editar o arquivo.

```
job_prepare.pbs
```

O comando padrão é o seguinte :

```
/bio/pimba_metabarcoding/docker/pimba_prepare.sh      illumina      <rawdata_dir>  
<output_reads> <num_threads> <adapters.txt>
```

Parâmetros

<rawdata_dir> = caminho dos arquivos R1 e R2 reads;

<output_reads> = nome da pasta dos resultados;

<num_threads> = número de *threads*;

<adapters.txt> = arquivo contendo os adaptadores usados no sequenciamento.

EXEMPLO:

```
/bio/pimba_metabarcoding/docker/pimba_prepare.sh illumina rawdata_illumina/  
AllSamples 24 adapters.txt
```

Caso queira editar, abra o arquivo no terminal usando o comando `vim`. Para editar apertar *i*; para salvar apertar *ESC*, digitar `:wq` e dar *ENTER*; para sair sem salvar apertar *ESC*, digitar `:q` e dar *ENTER*

```
vim job_prepare.pbs
```

Passo 2: Análise de clusterização (OTU) e atribuição taxonômica (pimba_run.sh)

O arquivo *fasta* da etapa anterior é mandatório na etapa 2. Verificar se o arquivo foi gerado.

```
qsub -q op2 job_pimba.pbs
```

OBS: caso queira editar os parâmetros de similaridade para agrupamento das OTUs, nome da pasta contendo os resultados ou bancos de dados a ser utilizado para classificação taxonômica das sequências, deve-se editar o arquivo **job_pimba.pbs** utilizando a função *vim*

O comando padrão é o seguinte :

```
/bio/pimba_metabarcoding/docker/pimba_run.sh -i <input_reads> -o <output_dir> -s  
<otu_similarity> -a <assign_similarity> -c <coverage> -l <otu_length> -h  
<hits_per_subject> -g <marker_gene> -t <num_threads> -e <E-value> -d  
<databases.txt>
```

Parâmetros

-i <input_reads> = arquivo FASTA contendo as *reads* geradas pelo `pimba_prepare.sh`

-o <output_dir> = Diretório com os resultados.

-s <otu_similarity> = Porcentagem de similaridade utilizada para clusterização das OTUs. *Default* é 0.97

-a <assign_similarity> = Porcentagem de similaridade utilizada para atribuição taxonômica. *Default* é 0.9

-c <coverage> = cobertura mínima para alinhamento. *Default* é 0.9

-l <otu_length> = comprimento da trimagem das reads. Se 0, *reads* são trimadas.

-h <hits_per_subject> = Se 1, escolhe o melhor *best hit*. If > 1, escolhe pela maioria. *Default* é 1

-g <marker_gene> = gene marcador e database. Pode ser: (16S-SILVA, 16S-GREENGENES, 16S-RDP, 16S-NCBI, ITS-FUNGI-NCBI, ITS-FUNGI-UNITE, ITS-PLANTS-NCBI, COI-NCBI, 12S-BIOBASE).

-t <num_threads> = número de *threads* usado para *blast*. *Default* é 1.

-e = e-value usado para *blast*. *Default* é 10.

-d <databases_file.txt> = Arquivo contendo caminho da base de dados.

EXEMPLO:

```
/bio/pimba_metabarcoding/docker/pimba_run.sh -i AllSamples.fasta -o 12Sbiobase -s 0.97 -a 0.7 -c 0.8 -l 100 -h 1 -g 12S-BIOBASE -t 24 -e 0.1 -d databases.txt
```

Passo 3: Plot os resultados (pimba_plot.sh)

Quando terminar o `pimba_run.sh`, você será capaz de gerar alguns gráficos básicos para seus resultados, como PCoA, curvas de rarefação, gráficos de diversidade alfa e beta. Tudo o que você precisa são dois arquivos que o `pimba_run.sh` irá gerar (`otu_table.txt` e `tax_assignment`) e um arquivo de metadados (tabela em formato csv) que você terá que fornecer (`metadata.csv`) (Figura 6).

```
qsub -q op2 job_pimbaPlot.pbs
```

```
/bio/pimba_metabarcoding/docker/pimba_plot.sh -t <otu_table> -a <tax_assignment> -m <metadata> -g <group_by>
```

Parâmetros

-t <otu_table> = Tabela OTU gerada por `pimba_run`

-a <tax_assignment> = Arquivo de atribuição taxonômica gerado por `pimba_run`

-m = arquivo CSV com colunas "sample_id" (primeira coluna contendo os IDs das amostras) e outros atributos relacionados a cada amostra (local, estação do ano etc.)

-g = indica a coluna que deseja realizar as análises. Por exemplo, local. Se não quiser agrupar os resultados, não o especifique.

EXEMPLO:

```
/bio/pimba_metabarcoding/docker/pimba -t AllSamples_otu_table.txt -a  
AllSamples_otus_tax_assignments.txt -m mapping_file.csv -g local
```

Figura 6 - Exemplos dos arquivos finais gerados pelas etapas de análise do pipeline PIMBA. Esses são os arquivos que podem ser utilizados em análises estatísticas posteriores.

Example of OTU table (otu_table.txt) generated by pimba_run.sh:

| OTUId | EXTB | MB211 | MB214 | MB217 | MB223 | MB224 | MB227 | MB230 | MB233 | MB236 | MB239 | MB242 | MB245 | MB248 | PCRB |
|--------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|------|
| OTU955365479 | 74371 | 116 | 24 | 52 | 236 | 98 | 147 | 19 | 45 | 1839 | 2355 | 60 | 16 | 3 | 20 |
| OTU812100800 | 155496 | 225 | 32 | 88 | 86 | 152 | 525 | 17 | 147 | 329 | 126 | 308 | 73 | 9 | 35 |
| OTU789743117 | 54074 | 21 | 15 | 22 | 20 | 48 | 191 | 8 | 11 | 329 | 14 | 2 | 71 | 4 | 14 |
| OTU645601205 | 8938 | 4 | 2 | 7 | 3 | 5 | 27 | 2 | 4 | 10 | 6 | 1 | 8 | 0 | 1 |
| OTU212911189 | 2037 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OTU964442511 | 140 | 76 | 82 | 227 | 64 | 128 | 291 | 135 | 94 | 373557 | 265 | 167 | 957 | 113 | 76 |
| OTU533344192 | 164 | 133 | 62 | 265895 | 97 | 67 | 246 | 43 | 55 | 444 | 106 | 31 | 124 | 51 | 92 |
| OTU103992458 | 724 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 6 | 1 | 1 | 9 | 0 | 0 | 0 |
| OTU524853145 | 530 | 389 | 212 | 799483 | 347 | 3301 | 722 | 142 | 183 | 1150 | 284 | 118 | 377 | 165 | 236 |
| OTU844428705 | 310 | 310 | 180 | 390 | 320 | 253 | 350 | 518 | 214 | 353599 | 610124 | 64796 | 39526 | 1131 | 212 |
| OTU293268522 | 270 | 37 | 28 | 92 | 1007 | 120 | 121096 | 48 | 14 | 51 | 33 | 71 | 71 | 76 | 18 |
| OTU884692304 | 253 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OTU986112541 | 434 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OTU176656043 | 97 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OTU689340459 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 296 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 |
| OTU886162264 | 411 | 2 | 0 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 |
| OTU771688223 | 499 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| OTU484930833 | 8 | 10 | 6 | 4 | 14 | 3 | 1 | 11940 | 272 | 3 | 4 | 5 | 2 | 9 | 0 |
| OTU467557698 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 202 | 5 | 243 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Example of OTU Tax assignment (tax_assignment.txt):

```
OTU698595363 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Lepidoptera; f Eriocraniidae; g Eriocrania; s sp.ER06 0.96154  
OTU766111137 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Diptera; f Calliphoridae; g Huascaromusca; s sp.1MATM-2015 0.94574  
OTU670530351 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Lepidoptera; f Nymphalidae; g Hypothyris; s moebiusmoebiusi 0.96154  
OTU120497499 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Diptera; f Culicidae; g Anopheles; s koliensis 0.84733  
OTU977420622 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Lepidoptera; f Nymphalidae; g Ideopsis; s gaura 0.95385  
OTU374660010 k Metazoa; p Arthropoda; c Arachnida; o Scorpiones; f Buthidae; g Isometrus; s maculatus 0.87692  
OTU8660394 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Diptera; f Empididae; g Rhamphomyia; s sp.1BKC-2015 0.96899  
OTU261821968 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Diptera; f Syrphidae; g Toxomerus; s aegiensis 0.95349  
OTU302289343 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Lepidoptera; f Lycaenidae; g Allotinus; s davidis 0.84733  
OTU412412883 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Diptera; f Drosophilidae; g Zygophora; s ptialisalis 0.94615  
OTU285620827 k ; p ; c Florideophyceae; o Gigartinales; f Peyssonneliaceae; g Riquetophycus; s sp.HSY-2014a 0.91473  
OTU288350188 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Lepidoptera; f Nymphalidae; g Hypomenitis; s alphasiboea 0.96124  
OTU425378105 k Metazoa; p Nematoda; c Chromadorea; o Tylenchida; f Aphelenchoididae; g Bursaphelenchus; s paraluxuriosae 0.89552  
OTU733572620 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Diptera; f Syrphidae; g Toxomerus; s difficilis 0.96923  
OTU240332622 k Metazoa; p Arthropoda; c Insecta; o Diptera; f Culicidae; g Anopheles; s nuneztovari 0.93846
```

Example of Metadata file (metadata.csv):

```
SampleID,SampleName,BarcodeSequence,LinkerPrimer,Description  
EXTB,EXTB,CGTACTAG+GCGTTAGA,CTGTCTCTTATACATCT,Branco  
PCRB,PCRB,CGTACTAG+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Branco  
MB211,MB211,AGGCAGAA+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav1  
MB214,MB214,TCCTGAGC+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav1  
MB217,MB217,GGACTCCT+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav1  
MB223,MB223,TAGGCATG+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav2  
MB224,MB224,CTCTCTAC+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav2  
MB227,MB227,CAGAGAGG+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav2  
MB230,MB230,GCTACGCT+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav3  
MB233,MB233,CGAGGCTG+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav3  
MB236,MB236,AAGGCGCA+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav3  
MB239,MB239,GTAGGGA+TCTTACGC,CTGTCTCTTATACATCT,Cav4  
MB242,MB242,TAAGGCGA+ATAGAGAG,CTGTCTCTTATACATCT,Cav4  
MB245,MB245,CGTACTAG+ATAGAGAG,CTGTCTCTTATACATCT,Cav4  
MB248,MB248,AGGCAGAA+ATAGAGAG,CTGTCTCTTATACATCT,Cav4
```

Fonte: Oliveira *et al.*, (2021)

OBS: Caso for correr o PIMBA em um computador pessoal ou outro servidor, o manual de uso e instalação está disponível em <https://github.com/reinator/pimba>

4 LISTA DE MATERIAIS

| Íte m | Descriçã o | Fabric ante | Núm. Parte | Site |
|----------|--|------------------|--------------------------|---|
| 1 | Filtro tipo sterivex com poro de 0.22 um de poliethers ulfona com acoplame nto tipo Leuer- lock e saída tipo nipple | Millipor e | SVGPL1 0RC | https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/svgpl10rc?lang=en&region=US |
| 2 | Seringa de 50 ml | Sarstedt | 94.6077. 137 | https://www.sarstedt.com/pt/produtos/laboratorio/cultura-de-celulas-e-de-tecidos/biorreator-minipermr/product/94.6077.137/ |
| 3 | Luvas de nitrila sem pó | Merck | Z672327- 50EA | https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z672327?lang=pt&region=BR |
| 4 | Whirl-Pak | Sigma | WPB015 46WA- 500EA | https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/wpb01546wa?lang=pt&region=BR&cm_sp=Insite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold10-1 |
| 5 | Gelo artificial reutilizáv el | Americanas | 9405582 1 | https://www.americanas.com.br/produto/94055821/kit-com-10-unidades-gelo-artificial-reutilizavel-cliogel-rigido-500-ml?DCSext.recom=RR_item_page.rr1-CategorySiloedViewCP&dcsext.recom=RR_item_page.rr1-CategorySiloedViewCP&nm_origem=rec_item_page.rr1-CategorySiloedViewCP&nm_ranking_rec=5 |
| 6 | Sacola térmica | Americanas | 9314435 3 | https://www.americanas.com.br/produto/93144353/sacola-termica-poliester-yins-cinza?pfm_carac=sacola%20t%C3%A9rmica&pfm_index=4&pfm_page=search&pfm_pos=grid&pfm_type=search_page |
| 7 | Qubit™ 4 Fluorome ter | Thermo Fisher | Q33226 | https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33226?SID=srch-srp-Q33226#/Q33226?SID=srch-srp-Q33226 |

| | | | | |
|----|---|--------------------------------|---|---|
| 8 | Qubit™ dsDNA HS Assay Kit | Thermo Fisher | Q32854 | https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32854#/Q32854 |
| 9 | Eppendorf Safe- Lock Tubes 1,5 ml | Eppendorf | 0030120 086 | https://online-shop.eppendorf.com.br/BR-pt/Ponteiras-tubos-e-placas-44512/Tubos-44515/Eppendorf-Safe-Lock-Tubes-PF-8863.html |
| 10 | Veriti 96- Well Thermal Cycler1 | Thermo Fisher | 4375786 | https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4375786#/4375786 |
| 11 | Ponteiras com barreiras para PCR | Thermo Fisher | AM12650 , AM12660 , AM12635 , AM12648 | https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/rna-extraction/rna-extraction-products/nuclease-free-tubes-tips-and-buffers/nuclease-free-tubes-and-tips.html?gclid=CjwKCAiA_f3uBRAMeiwAzPuaM2QKXJO0XfyKOWifG68RPM0KDA2G1k1K6evZmKUIQvmD-iTtyq47IRoC_clQAvD_BwE&s_kwcid=AL!3652!3!350493651280!b!!g!!%2Bbarrier%20%2Btips&ef_id=CjwKCAiA_f3uBRAMeiwAzPuaM2QKXJO0XfyKOWifG68RPM0KDA2G1k1K6evZmKUIQvmD-iTtyq47IRoC_clQAvD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!350493651280!b!!g!!%2Bbarrier%20%2Btips |
| 12 | Pipetadores automáticos | Eppendorf | 3120000 020, 3120000 011 | https://online-shop.eppendorf.com.br/BR-pt/Pipetas-e-Dispensadores-44563/Pipetagem-manual--dispensacao-44564/Eppendorf-Research-plus-PF-534798.html |
| 13 | 96-well 0.2 ml skirtless PCR plates | Fisher | 14-222- 321 | https://www.fishersci.com/shop/products/axygen-96-well-semi-skirted-pcr-microplates-2/p-4104932 |
| 14 | Agencourt AMPure XP 60 ml kit | Beckman Coulter Genomics | A63881 | https://www.mybeckman.com.br/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/pcr/a63881 |
| 15 | Alcool absolute para | Sigma | E7023 | https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/e7023?lang=pt&region=BR&gclid=CjwKCAiA_f3uBRAMeiwAzPuaMyDQvnYQ4JXhsrF6Z3BqTGkQwiPhQNqleHpfNN7n4vGZ9PpKL83wsxoCVLEQAvD_BwE |

| | | | | |
|----|--------------------------------|---------------|--------------|---|
| | biologia molecular | | | |
| 16 | Microseal 'A' adhesive seals | Bio-Rad | MSA-5001 | https://www.bio-rad.com/pt-br/sku/msa5001-microseal-pcr-plate-pcr-tube-sealing-film?ID=msa5001 |
| 17 | Microseal 'B' adhesive seals | Bio-Rad | MSB-1001 | https://www.bio-rad.com/pt-br/sku/msb1001edu-microseal-b-adhesive-seals?ID=msb1001edu |
| 18 | MiniSeq Reagent | Illumina | MS-102-3003 | https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/miniseq-reagent-kit.html |
| 19 | Nextera XT Index Kit | Illumina | FC-131-1001 | https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-xt-dna.html |
| 20 | PhiX Control Kit | Illumina | FC-110-3001 | https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/cluster-gen-sequencing-reagents/phix-control-v3.html |
| 21 | Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 | Sigma | 1081284 6001 | https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=10+mM+Tris-HCl&interface=All&N=0&mode=partialmax&lang=pt&region=global&focus=product |
| 22 | Magnetic stand-96 | Thermo Fisher | AM10027 | https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM10027?SID=srch-srp-AM10027#/AM10027?SID=srch-srp-AM10027 |
| 23 | Centrifugação de microplaca | Eppendorf | 5804 R | https://online-shop.eppendorf.com.br/BR-pt/Centrifugacao-44533/Centrifugas-44534/Centrifuge-5804-5804R-PF-240993.html |
| 24 | TruSeq Index Plate Fixture Kit | Illumina | FC-130-1005 | https://www.illumina.com/products/by-type/ivd-products/truseq-custom-amplicon-dx.html |
| 25 | High Speed Micro | VWR | 13500-890 | https://us.vwr.com/store/product/4779955/vwr-signaturetm-high-speed-microplate-shaker |

| | | | | |
|----|-------------------------------------|---------------|-------------|---|
| | Plate Shaker | | | |
| 26 | Espátulas de metal | Sigma | Z283274-1EA | https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z283274?lang=pt&region=BR |
| 27 | Direct Thermal Cryo-Tags | Sigma | | https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/directthermalcryotags1234598765?lang=pt&region=BR |
| 28 | DNeasy PowerSoil Kit Print | Qiagen | 12888-100 | https://www.qiagen.com/de/products/dneasy-powersoil-kit/#orderinginformation |
| 29 | Capela de fluxo laminar | SPLabor | Linha100 | http://www.splabor.com.br/produto/capela-de-fluxo-laminar-vertical-dimensoes-internas-1890x652x652-mm-linha-100/ |
| 30 | Agarose | Thermo Fisher | 16500100 | https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-electrophoresis/agarose-gel-electrophoresis/routine-dna-gels.html?open=pure#pure |
| 31 | Kit de eletroforese horizontal | BioRad | 1655044EDU | https://www.bio-rad.com/pt-br/sku/1655044edu-wide-mini-sub-cell-gt-with-powerpac-mini-power-supply?ID=1655044EDU |
| 32 | Bioanalyzer Agilent Technology 2100 | Agilent | G2939BA | https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-instrument/2100-bioanalyzer-instrument-228250 |
| 33 | DNA 1000 Kit | Agilent | 5067-1504 | https://www.agilent.com/store/productDetail.jsp?catalogId=5067-1504 |
| 34 | 4200 TapeStation System | Agilent | G2991AA | https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/tapestation-systems/tapestation-instruments/4200-tapestation-system-228263 |

REFERÊNCIAS

BOLYEN, Evan *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.

CAPORASO, J. Gregory *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

CORLETT, Richard T. A bigger toolbox: biotechnology in biodiversity conservation. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 55-65, 2017.

DEINER, Kristy *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular ecology**, v. 26, n. 21, p. 5872-5895, 2017.

FAZEKAS, Aron J. *et al.* Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers?. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 130-139, 2009.

FREITAS, Carlos EC *et al.* The importance of spatial scales to analysis of fish diversity in A mazonian floodplain lakes and implications for conservation. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 23, n. 3, p. 470-477, 2014.

HEBERT, Paul DN *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

JARAMILLO-VILLA, Ursula; CARAMASCHI, Érica Pellegrini. Índices de integridade biótica usando peixes de água doce: uso nas regiões tropical e subtropical. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 7, 2008.

OLIVEIRA, Renato R. M. *et al.* PIMBA: a Pipeline for MetaBarcoding Analysis. **BioRxiv** 2021.03.23.436646, 2021.

PANARO, Nicholas J. *et al.* Evaluation of DNA fragment sizing and quantification by the agilent 2100 bioanalyzer. **Clinical chemistry**, v. 46, n. 11, p. 1851-1853, 2000.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

The eDNA Society. Environmental DNA Sampling and Experiment Manual. Version 2.1. Otsu, Japan; 2019. Available from: http://ednasociety.org/eDNA_manual_Eng_v2_1_3b.pdf.

VAFEIADOU, Anna-Maria; MOENS, Tom. Effects of temperature range changes and interspecific competition to population development and behaviour of marine nematodes. **In: International Meiofauna Conference**, 17., p. 57-58. 2019.

YANG, L., TAN, Z., WANG, D. et al. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. **Scientific Reports**, v.4, p. 4089, 2014.

ZHANG, J. *et al.* Bioinformatics. **PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR**, p. 614-620, 2014.

ANEXOS

ANEXO A - Kit de extração de DNA DNeasy PowerSoil

O manual pode ser obtido neste link:

<https://www.qiagen.com/th/resources/download.aspx?id=91cf8513-a8ec-4f45-921e-8938c3a5490c&lang=en>

ANEXO B - Qubit™ 4 Fluorometer

O manual do Qubit™ 4 Fluorometer pode ser obtido neste link:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33226?SID=srch-srp-Q33226#/Q33226?SID=srch-srp-Q33226>

ANEXO C - Qubit® dsDNA HS Assay Kit

O manual do Qubit® dsDNA HS Assay Kits pode ser obtido neste link:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33226?SID=srch-srp-Q33226#/Q33226?SID=srch-srp-Q33226>

ANEXO D - Qubit® dsDNA BR Assay Kit

O manual do Qubit® dsDNA BR Assay Kits pode ser obtido neste link:

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32853#/Q32853>

ANEXO E - 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

O manual do procedimento para a construção das bibliotecas pode ser obtido neste link:

https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf

ANEXO F - MiSeq System Guide

O manual do MiSeq System pode ser obtido neste link:

https://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq/documentation/on.html

ANEXO G - Guia de instalação e uso do PIMBA

<https://github.com/reinator/pimba>