



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

GILBERTO DE AGUIAR PEREIRA

**ESTUDO DO METABARCODING DE ITS E DAS
CELULASES MICROBIANAS DO SOLO/SERAPILHEIRA
DO PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY**

Projeto apresentado ao Instituto Ambiental do Paraná
para solicitar autorização para a realização de
pesquisas no Parque Estadual Mata dos Godoy

Orientador: Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos

Londrina – Paraná

2016

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Serapilheira	1
1.2 - Serrapilheira em Florestas Estacionais Semidecíduais	2
1.3 - Microrganismos na serapilheira	3
1.4 - <i>Metabarcoding</i> de Fungos	4
1.5 - Celulases.....	5
1.6 - Metagenômica Funcional	6
1.7 - LAGEM, Celulases, Microrganismos não-cultiváveis e Metagenomas.....	7
2 - JUSTIFICATIVA	8
3 - OBJETIVOS	9
Geral	9
Específicos	9
4 - METODOLOGIA	10
4.1 - Coleta do solo/serapilheira	10
4.2 - Análises químicas do solo	11
4.3 - Extração de DNA para o metabarcoding	11
4.4 - Sequenciamento do metabarcoding ITS.....	11
4.5 - Análise das sequências do metabarcoding ITS	11
4.6 - Enriquecimento das amostras solo para o desenvolvimento do metagenoma funcional.....	12
4.7 - Extração de DNA para o metagenoma funcional	12
4.8 - Clonagem.....	12
4.9 - Triagem da atividade celulolítica	12
4.10 - Sequenciamento dos clones positivos para produção da enzima celulase.....	13
4.11 - Identificação das sequências gênicas obtidas e da presença de domínios conservados de proteínas.....	13
5 – CUSTOS DO PROJETO	14
6 - CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	15
7 - REFERÊNCIAS	16

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Serapilheira

Serapilheira, serrapilheira, liteira ou foliço são termos utilizados para se referir a camada mais superficial do solo na qual é incorporada por deposição restos de animais e os componentes senescentes da parte aérea das plantas (folhas, frutos, sementes, cascas e gravetos). Neste trabalho, o termo serapilheira foi o termo selecionado para referir-se a esta camada, no entanto, é importante salientar que todos os outros termos são sinônimos e representam tentativas de traduzir para a língua portuguesa o termo em inglês *litter* (GOMES *et al.*, 2009).

Em se tratando da formação da camada de serapilheira, este processo está associado a taxa de deposição e a taxa de decomposição dos resíduos que foram incorporadas a este horizonte orgânico do solo (GEETHANJALI; JAYASHANKAR, 2016). A deposição dos resíduos sobre o solo está diretamente relacionada a fatores como o clima (precipitação e temperatura), o solo (quantidade de nutrientes e água necessários para a produção de fitomassa) e idade, densidade e diversidade do povoamento florestal; já a decomposição é regulada pelas características do material orgânico, a natureza da comunidade decompositora e pelas condições físico-químicas do ambiente (altitude, latitude e tipo de floresta) (MISHRA; KUMAR, 2016). Desta forma a espessura da serapilheira está diretamente associada ao ajuste fino entre estes dois processos, sendo assim, caso o processo de deposição supere o de decomposição a espessura da serapilheira será maior, no entanto, caso o processo de decomposição seja mais efetivo a espessura da serapilheira será menor.

Neste sentido, para além da função de camada depositária de resíduos, a serapilheira acumulada exerce um papel fundamental na disponibilização de nutrientes para o crescimento das plantas e microrganismos, sendo este último grupo beneficiado duplamente, pois, ela também os possibilita que eles se desenvolvam numa grande variedade de microhabitats. Além de tudo isso, a serapilheira acumulada atua também como isolante térmico (melhoras as condições térmicas dos horizontes mais profundos), atenuador de efeitos erosivos e também como um filtro armazenador de água proveniente da atmosfera que penetra no solo (PARRON *et al.*, 2015). Desta forma, ao participar de vários processos funcionais dos ecossistemas nos quais estão inseridas a serapilheira

presta inestimáveis serviços ambientais que inclusive possuem reflexos sobre questões pertinentes ao bem estar humano, evidenciando mais uma vez, a sua grande importância.

1.2 - Serapilheira em Florestas Estacionais Semidecíduais

O conceito ecológico da Floresta Estacional Semidecidual é estabelecido em função da ocorrência de clima estacional que determina a semidecidualidade da cobertura de todo o conjunto florestal que pode perder entre 20 e 50% das folhas na estação com menor incidência de chuvas (IBGE, 2012). Em consequência a este acontecimento, parte do material vegetal será incluído as camadas mais superficiais do solo destas florestas, tornando as então, locais privilegiados para o desenvolvimento de investigações sobre a serapilheira.

Nesta perspectiva, Vital *et al.* (2004) desenvolveram o sua investigação em uma mata ciliar com vegetação do tipo Floresta Estacional Semidecidual, localizada no centro-sul do Estado de São Paulo, a partir das informações que coletaram, obtiveram como resultados que a produção anual total de serapilheira foi de 10.646,0 kg.ha⁻¹.a⁻¹, que a maior deposição ocorreu no fim da estação seca e ainda que o tempo necessário para o desaparecimento de 95% dos resíduos depositados foi de 639 dias.

Já Pezzatto e Wisniewski, (2006) estudaram diferentes seres sucessionais de uma Floresta Estacional Semidecidual ao longo das margens do reservatório de uma hidrelétrica no oeste do estado do Paraná e obtiveram como resultado que a produção anual total de serapilheira foi de 10.372,39 kg.ha⁻¹.a⁻¹ para o capoeirão; além disso, puderam observar que a quantificação da serapilheira depositada apresenta uma correlação positiva significativa com a velocidade média dos ventos e uma correlação negativa significativa com a com a umidade relativa do ar.

Adicionalmente, Pinto *et al.* (2008) desenvolveram sua pesquisa num município pertencente a zona da mata mineira numa estação de pesquisa e educação ambiental; neste local obtiveram como resultado que a produção anual de serapilheira na “floresta madura” foi de 8.819 kg.ha⁻¹.a⁻¹, além disso constataram que a serapilheira era composta predominante pela fração foliar (55,9%), seguida da frações ramos (36,4%), frutos e sementes (6,2%) e flores (1,5%) e ainda que apesar de ser produzida de forma contínua ao longo de todo o período analisado, a produção total de serapilheira apresentou um modelo sazonal onde os maiores valores de deposição foram observados no período da primavera.

Inserindo-se então neste contexto e compartilhando algumas das peculiaridades inerentes a cada estudo já apresentado, o Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) também já foi objeto de estudos sobre a serapilheira. Pimenta *et al.* (2011) por exemplo, constatou que a produção anual de serapilheira no PEMG foi de $8.212 \text{ kg.ha}^{-1}.\text{a}^{-1}$, que a fração folha contribuía com a maior quantidade de toda a deposição (79%) e que outubro apresentou os maiores valores de deposição da biomassa; além disso constatou também que a taxa instantânea de decomposição (K) era de 2,45 e que a floresta do PEMG apresenta produção de serapilheira e ciclagem de nutrientes características de uma Floresta Estacional Semidecidual bem preservada; então, por estes e outros motivos que ainda serão apresentados neste trabalho, o PEMG foi o selecionado para o desenvolvimento da investigações que estamos nos propondo a realizar.

1.3 - Microrganismos na serapilheira

Ao contrário do que já se pensou, a comunidade de microrganismos não é amplamente distribuída pelo solo, ela possui distribuição restrita e ocorre em microambientes que compreendem menos de 1% do volume total deste ecossistema, os chamados *hotspots* (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015). Nestes locais, os microrganismos só deixam o seu estado dormente, por exemplo, quando eventos biológicos como a deposição de resíduos sobre serapilheira acontece, neste sentido, este evento e este momento (*hotmoment*), são considerados muito importantes para a comunidade de microbiana, pois, entre outras coisas, permite que a biomassa de microrganismos ativos nesta camada chegue a ser de 4 a 20 vezes maior do que em outros locais do solo neste mesmo momento (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015); evidenciando assim a importância deste evento e deste momento para os microrganismos.

Ainda com relação aos microrganismos, os fungos são considerados os melhores degradadores da serapilheira, pois, possuem um sistema de enzimas extracelular eficiente (ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012), a capacidade de penetrar em materiais sólidos (FOUDYL-BEY; BRAIS; DROUIN, 2016) e são resistentes ao pH ácido, uma condição notadamente privilegiadora do crescimento destes microrganismos (GROSSO; BÅÅTH; NICOLA, DE, 2016). Desta forma, cada vez mais, fica claro que o PEMG foi uma boa escolha para a realização deste estudo, pois até mesmo os solos do tipo nitossolo presentes amplamente no parque, possuem pH ligeiramente ácido (IAP, 2016), sendo este um pH favorecedor do crescimento dos fungos.

1.4 - *Metabarcoding* de Fungos

Atualmente a maior parte dos fungos ainda não são cultiváveis em laboratório, mesmo que fossem, métodos baseados em cultivo deturpam a composição das populações microbianas, pois só conseguem amostrar como é composta uma parte dela; desta forma, o sequenciamento de alto rendimento vêm se tornando uma alternativa para identificar e quantificar os membros de comunidades microbianas com mais resolução e magnitude; neste sentido, a metodologia de *Metabarcoding* que é uma abordagem molecular baseada na suposição de que cada Unidade Taxonômica Operacional (OTU) pode ser inequivocamente identificada, através de uma sequência específica de DNA (ORGIAZZI *et al.*, 2015) foi a técnica selecionada para estudar os fungos que compõe a serapilheira do PEMG, pois com esta metodologia, será possível caracterizar as comunidades fúngicas desta camada com mais fidedignidade.

Um outro aspecto muito importante sobre a realização deste trabalho é que ele ao nos oferecer a oportunidade de conhecer como é composta a comunidade de fungos do PEMG, nos permitirá termos ao menos um ponto de partida, para podermos refletir sobre ações que visem a preservação da microbiota local e de todo o patrimônio genético a ela associado; estas reflexões são necessárias pois no PEMG, foi possível encontrar *gap* sobre esse conteúdo que inclusive foi omitido do plano de manejo do parque; então, com intuito de contribuir com a mudança deste paradigma, ao menos ao que se refere a comunidade de fungos, o nosso trabalho se coloca como uma alternativa para incrementar os conhecimentos científicos sobre essa temática, contribuindo assim, com a construção de novos conhecimentos sobre esse tema no se refere ao âmbito do PEMG.

Prova de que os microrganismos não são um tema recorrente entre as pesquisas desenvolvidas no PEMG, é que nos últimos 10 anos, dos 98 trabalhos científicos desenvolvidos no PEMG (IAP, 2016) apenas 2 envolviam diretamente a temática microrganismos, dentre eles, apenas Zangaro *et al.*, (2013) disponibilizou os resultados que obteve através da publicação do artigo científico intitulado *Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil*; onde descreveu que observou e identificou com base na morfologia dos esporos fungos micorrízicos arbusculares, contudo, ainda neste trabalho, os autores salientam que o investimento que as plantas fazem nesta relação mutualística, decresce com os estágios tardios de sucessão florestal, assim puderam observar que o potencial do inóculo de fungos micorrízicos arbusculares foi reduzido no

PEMG, desta forma, além de trabalharem com um grupo restrito de fungos, a diversidade encontrada foi ainda diminuída pelo estágio avançado de sucessão do conjunto florestal do PEMG; sendo assim, apesar de poder ser considerada uma primeira aproximação sobre a tarefa de inventariar como é composta a comunidade de fungos no PEMG, esta tarefa ainda não foi concluída e poderá contar com a metodologia metabarcoding de ITS (ITS = *Internal Transcribed Space* que se trata da região espaçadora transcrita interna do DNA ribossomal e que é atualmente a região *barcoding* para fungos) como uma ferramenta muito útil para a realização deste trabalho.

1.5 - Celulases

A serapilheira acumulada é composta principalmente por celulose, o polímero mais abundante da biosfera (BAKESKI; VARMA, 2011), a celulose é degradada por um complexo composto por três enzimas conhecidas como celulases; as endoglucanases, que degradam as cadeias internas da celulose, as exoglucanases que liberam celobioses e as β glicosidases que hidrolisam as celobioses (YANG *et al.*, 2016). A nossa compreensão atual sobre o processo de decomposição da serapilheira, atribui aos microrganismos o papel de componentes imprescindíveis neste processo (ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012), sendo então os fungos considerados como os melhores degradadores; pois, somente algumas bactérias possuem os recursos celulolíticos que são comuns a várias espécies fúngicas (BALDRIAN *et al.*, 2012), contudo, as bactérias são mais eficientes em absorver as moléculas de carbono (ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012), e por este motivo, podem ser também consideradas como participantes importantes no processo de decomposição da serapilheira.

Além da sua inquestionável importância na degradação da serapilheira, as enzimas celulolíticas podem ser utilizadas também em diversas aplicações biotecnológicas; na indústria têxtil por exemplo, elas são utilizadas para tornar os tecidos mais lisos, macios e com melhor caimento, já na fabricação de bebidas, elas facilitam a extração de sucos, a produção de néctares e melhoram a produção de pigmentos e substâncias aromático-flavorizantes nos vinhos. As celulases podem ser utilizadas ainda como probióticos que aumentam a digestibilidade dos alimentos vegetais ingerido pelos animais; podem ser utilizadas para proporcionar maior limpeza e menor degradação dos tecidos quando adicionadas a compostos detergentes e também são utilizadas para tornar o papel mais branco e liso entre outras aplicações (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011); sendo assim e

graças a sua importância econômica e ampla utilização em processos industriais, a realização de estudos com enzimas celulolíticas inclusive as que utilizam metodologias não baseadas em cultivo (como a metagenômica funcional), são sempre encorajadas, mesmo que novas outras celulasas sempre vêm sendo descobertas com o passar do tempo (YANG *et al.*, 2016).

1.6 - Metagenômica Funcional

Um metagenoma funcional baseia-se na construção e rastreamento de bibliotecas com clones obtidos a partir da inserção em vetores do DNA extraído de amostras ambientais. Atualmente, especialmente na área de inovação e desenvolvimento tecnológico as metodologias que utilizam abordagens relacionadas a metagenômica funcional são consideradas muito importantes, pois, a partir delas é possível descobrir novas enzimas cuja função não seria previsível com base somente em sequências depositadas em bancos de dados de DNA ou RNA (LAM *et al.*, 2015), contribuindo desta forma, como a geração de novas informações que poderão inclusive vir a se tornar novos parâmetros para o processo de anotação de genomas e metagenomas; assim como foi o caso de Faoro *et al.* (2011) que descobriram através da análise de um metagenoma, uma nova enzima de uma nova família enzimática ainda não descrita anteriormente.

Neste sentido, vários substratos já foram utilizados para o desenvolvimento de trabalhos científicos que utilizem abordagens relacionadas a metagenômica com o propósito de descobrir novas enzimas; no caso das enzimas celulolíticas, isso também não é diferente, contudo pela proximidade com o foco estabelecido para o desenvolvimento desta investigação; resolvemos destacar o trabalho que descobriu e caracterizou a enzima Umcel9B a partir do metagenoma de um solo associado a decomposição de matéria orgânica; esta nova enzima foi considerada pelos pesquisadores como sendo uma endoglucanase de alta atividade e estabilidade a temperaturas baixas, evidenciando assim, o seu grande potencial biotecnológico (PANG *et al.*, 2009). Sob esta perspectiva, inúmeras outras investigações já foram ou estão sendo conduzidas com a temática, celulasas, microrganismos não-cultiváveis e metagenomas, inclusive o nosso grupo de trabalho já realizou algumas investigações sobre esse tema (tópico 1.7).

1.7 - LAGEM, Celulases, Microrganismos não-cultiváveis e Metagenomas

O Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), recentemente implantou entre as suas linhas de pesquisa as temáticas; celulase, microrganismos não-cultiváveis e metagenoma; nesta perspectiva uma das primeiras investigações realizadas pelo nosso grupo de pesquisa se refere àquela em que constatamos que em um nitossolo (tipo de solo semelhante aos encontrados no PEMG) com diferentes deposição de serapilheira, não apresentou diferença estatística significativa entre o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC); quer sejam para os Microrganismos Celulolíticos - MC (aqueles capazes de crescer nomeio de cultura CMC) ou então para Microrganismos Veradeiramente Celulolíticos – MVC (aqueles que além decrescer nomeio CMC, produzem um halo claro maior que 1 mm ao redor da sua colônia após a coloração com vermelho congo) (PEREIRA *et al.*, 2016), no entanto, o solo com maior deposição de serapilheira apresentou uma atividade celulolíticas 33 vezes maior que o solo com menor deposição de serapilheira (13,16 g/L e 0,4 g/L), evidenciando assim, que toda esta atividade celulolíticas detectada, possivelmente deva estar relacionada com os microrganismos ainda não-cultiváveis em laboratório, já que o número de microrganismos cultiváveis foi semelhante entre as duas condições avaliadas (PEREIRA *et al.*, 2016). Sabendo disso, Pereira e Barcellos, 2016, desenvolveram um projeto relacionado a “mineração” do banco de dados metagenômicos *EBI metagenomics* onde buscaram através de perfis *Hidden Markov Models* (HMM) por homólogos distantemente relacionados a celulases classificadas como endoglucanases, nos metagenomas tipo *shot gun* de diversos tipos de solos já depositados naquele banco de dados; como resultado, constataram que o melhor *hit* dentre todos os que obtiveram, se referia a um projeto relacionado a deposição de matéria orgânica no solo (identificação *EBI metagenomics* - ERR1303295), confirmando assim, a hipótese de que ambientes como serapilheira onde ocorre uma grande deposição de matéria orgânica no solo, são locais privilegiados para bioprospecção de enzimas celulolíticas, tornando se assim, mais um motivo que justifica a realização deste trabalho.

2 - JUSTIFICATIVA

A seguir serão rerepresentados de forma sumária os argumentos que justificam a realização do trabalho. Em primeiro lugar como já foi pontuado anteriormente, a serapilheira além de nos prestar inestimáveis serviços ambientais, também pode ser considerada um *hotspot* e um *hotmoment* para o desenvolvimento microbiano, contudo, mesmo diante desta informação tão relevante, nenhuma pesquisa com microrganismos no PEMG estabeleceu esta importante camada do horizonte orgânico do solo, como o foco principal de suas investigações. Além disso, nos últimos dez anos, apenas duas das noventa e oito pesquisas científicas realizadas no PEMG estudou microrganismos, dentre elas, apenas uma investigou a comunidade fúngica, no entanto, ela o fez de forma parcial e identificou os fungos somente com base em aspectos morfológicos o que é atualmente já não é uma conduta muito usual em microbiologia. Adicionalmente, por ter o PEMG um conjunto florestal bem preservado, possivelmente a microbiota associada ao solo/serapilheira já esteja bem estabelecida e abrigue novas celulases que inclusive podem vir a se tornar muito uteis para a humanidade, sendo assim, este trabalho além de contribuir com a tarefa de inventariar como é composta a comunidade fúngica de microrganismos associados ao solo/serapilheira, o nosso grupo de pesquisa, contribuirá ainda com a conservação de uma pequena fração do patrimônio genético de microrganismos do PEMG que serão preservadas através das bibliotecas com clones que serão construídas, além disso, existe uma grande possibilidade de encontrarmos novas enzimas celulolíticas com grande potencial de aplicações em biotecnologia; por todos estes motivos este trabalho deve ser realizado.

3 - OBJETIVOS

Geral

- Caracterizar como é composta a comunidade total dos fungos que estão presentes na serapilheira do Parque Estadual Mata dos Godoy e investigar sobre a atividade celulolíticas de enzimas obtidas a partir desta camada.

Específicos

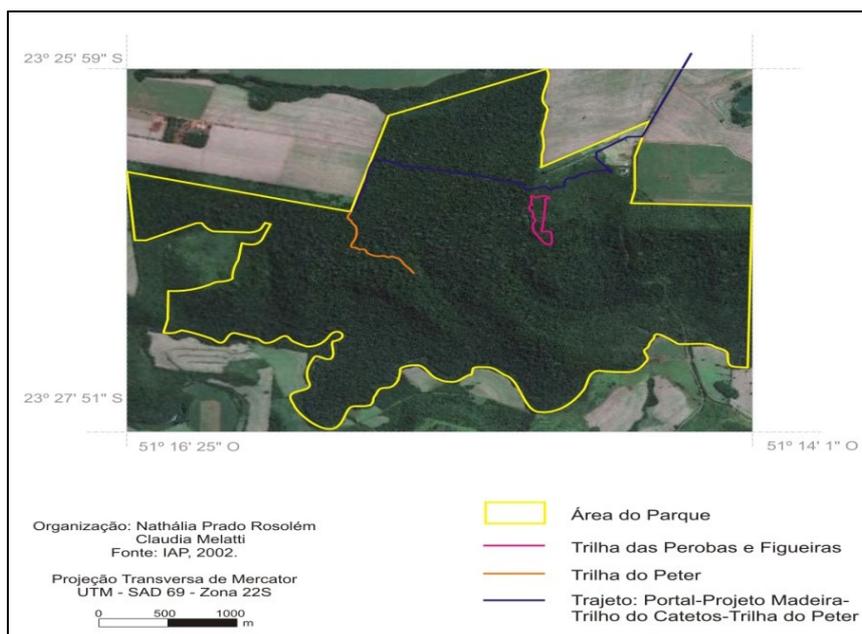
- Extrair DNA a partir da serapilheira.
- Sequenciar e analisar o metabarcoding de ITS
- Construir uma biblioteca metagenômica funcional para análise de enzimas com potencial celulolítico.
- Caracterizar bioquímica e molecularmente todos os clones positivos encontrados.

4 - METODOLOGIA

4.1 - Coleta do solo/serapilheira

As amostras de solo/serapilheira serão coletadas próximas a Trilha das Perobas e Figueiras (figura 1 – linha rosa), em local ainda a ser definido por análise visual no momento da coleta (local com presença de fungos visíveis). As amostras serão obtidas com o auxílio de um cilindro de aço estéril (autoclavado) cuja capacidade para coletar material é de aproximadamente trezentos e cinquenta gramas, sendo assim, este será o valor em peso aproximado que cada amostra conterà. Após cada coleta, as amostras passarão a ser denominadas de subamostras e irão compor ao final de todas as coletas, uma única amostra que conterà todo o conteúdo material das quinze subamostras que planejamos coletar (aproximadamente cinco quilogramas de solo/serapilheira) (Belanger e Res, 2008). Em seguida toda a amostra obtida será acondicionada em um único saco plástico com fecho tipo ziplock e serão transportadas até o Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) numa caixa térmica de isopor com gelo, para preservar a amostra até que ela possa ser analisada.

Figura 1- Trilhas e trajetos do Parque Estadual Mata dos Godoy



Fonte: Mellatti e Archela (2014)

4.2 - Análises químicas do solo

Uma parte da amostra coletada será encaminhada a um laboratório parceiro, onde então serão realizadas as análises de macro e micronutrientes.

4.3 - Extração de DNA para o metabarcoding

A extração de DNA da amostra do solo, serão realizadas utilizando o kit PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) seguindo as recomendações do fabricante.

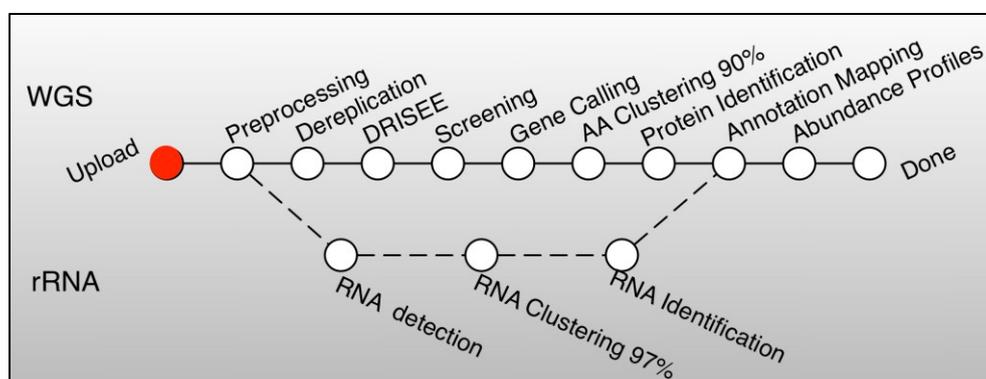
4.4 - Sequenciamento do metabarcoding ITS

O sequenciamento metabarcoding ITS será realizado num sequenciador Illumina por uma empresa de sequenciamento de nova geração.

4.5 - Análise das sequências do metabarcoding ITS

A pipeline de bioinformática selecionada para a realização da análise do metabarcoding de ITS foi a oferecida pela ferramenta MGRAST (*metagenomic analysis server*) (figura 2) do *Argonne National Laboratory* (WILKE *et al.*, 2015) pois ela é *user friendly* e reuni ferramentas adequadas e atualizadas.

Figura 2: Etapas que compõe a pipeline das análises realizadas pelo MGRAST.



Fonte: Wilke *et al.*, 2015

4.6 - Enriquecimento das amostras de solo para o desenvolvimento do metagenoma funcional

Para enriquecer a produção de enzimas celulolíticas, amostras do solo serão incubadas com 25 mL de tampão acetato pH 4 e 0,5 g de papel filtro em um banho-maria com agitação constante por 24 h (40°C e 120 rpm).

4.7 - Extração de DNA para o metagenoma funcional

A extração de DNA da amostra enriquecida será realizada utilizando o kit PowerMax Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) a partir de 10g do solo seguindo as recomendações do fabricante.

4.8 - Clonagem

O DNA genômico obtido a partir da extração anterior será fragmentado com auxílio da enzima de restrição BglII, e ligados no vetor TOPO TA (Invitrogen), conforme protocolo descrito pelo fabricante; em seguida os vetores recombinantes serão introduzidos na cepa de *Escherichia coli DH5 α* por choque térmico conforme protocolo descrito por Sambrook et al., 2006.

4.9 - Triagem da atividade celulolítica

A avaliação da atividade celulolítica será realizada em meio sólido CMC (2 g/L de extrato de levedura, 1 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L MgSO_4 , 5 g/L de papel filtro e 15 g/L de ágar) e incubado a 37°C por 2 dias, após este período, as placas serão coradas por 15 min com uma solução aquosa de vermelho congo (1mg/mL) e descoradas por 5 min com uma solução de NaCl 1M; serão considerados clones positivos aqueles capazes de crescer no meio sólido CMC e também de produzir um halo claro ≥ 1 mm ao redor da sua colônia. Os clones com maiores halos serão selecionados para ensaios para a otimização da produção da enzimas celulolíticas e também para o sequenciamento de DNA (SETHI *et al.*, 2013).

4.10 - Sequenciamento dos clones positivos para produção da enzima celulase

O sequenciamento do gene da celulase será realizado em um sequenciador por eletroforese capilar em um laboratório parceiro.

4.11 - Identificação das sequências gênicas obtidas e da presença de domínios conservados de proteínas

As sequências gênicas obtidas serão identificadas com base em análises de similaridade com sequências gênicas depositadas no banco de dados GenBank utilizando o programa BLASTN (NCBI). A presença de domínios conservados de proteínas serão analisadas com base em análises de similaridade com sequências de proteínas depositadas no banco de dados GenBank utilizando o programa BLASTX (NCBI).

5 – CUSTOS DO PROJETO

Reagentes	Valor Unitário (R\$)	Quant.	Valor Total (R\$)
1 kb plus dna ladder, fr c/ 250ug	803,00	1	803,00
Acido Bórico Granulado PA, fr c/ 500g	12,80	1	12,80
Ácido Clorídrico 1N, fr c/ 1L	9,00	1	9,00
Ácido Nalidixico, fr c/ 1g	85,00	1	85,00
Ágar Bacteriológico, fr c/ 500g	447,40	2	894,80
Agarose Ultrapura, fr c/ 100g	817,00	2	1.634,00
Álcool Isoamílico PA, fr c/ 1L	52,50	1	52,50
Álcool Isopropílico PA, fr c/ 1L	26,00	1	26,00
Ampicilina, fr c/ 200mg	148,00	1	148,00
Azul de Bromofenol, fr c/ 5g	15,00	1	15,00
BamHI, fr c/ 2000U	246,00	1	246,00
Carboximetilcelulose, fr c/ 250g	40,00	1	40,00
Cloroformio PA, fr c/ 1L	35,00	1	35,00
Criotubo, cap. 2,0mL, pct c/ 100un	110,00	5	1.100,00
CTAB, fr c/ 100g	335,20	1	335,20
DMSO PA, fr c/ 1L	91,00	1	91,00
dNTPs kit c/ 4 x 25umol	577,50	1	577,50
EDTA, fr c/ 500g	499,00	1	499,00
Fenol, fr c/ 100ml	484,50	1	484,50
Glicerol, fr c/ 500ml	275,50	1	275,00
IPTG, fr c/ 1g	300,00	1	300,00
LB Broth, fr c/ 500g	447,00	2	854,00
Luva tam. M, cx c/ 100un	25,50	5	127,50
Microtubo cap. 0,6ml, pct c/1000un	120,00	5	600,00
Microtubo cap. 1,5ml, pct c/ 500un	215,00	5	1.075,00
Power Soil DNA Isolation Kit (50 reações)	1.200,00	1	1.200,00
Purelink Genomic DNA, kit c/ 250rxn	3.012,00	1	3.012,00
Purelink Quick Mini, kit c/ 250rxn	1606,00	1	1606,00
SDS, fr c/ 500g	926,00	1	926,00
Sulfato de Magnésio PA, fr c/ 1kg	15,00	1	15
Sybr Safe, fr c/ 400uL	323,00	1	323,00
Tris ultrapuro, fr c/ 1kg	532,00	1	532,00
Vermelho Congo PA, fr c/ 25g	17,00	1	17,00
X-gal, fr c/ 100mg	426,00	1	426,00
TOTAL	-	-	18.376,80

6 - CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

ATIVIDADES	2016	2017			
	4ºtrim	1ºtrim	2ºtrim	3ºtrim	4ºtrim
Coletar o Material					
Extrair o DNA					
Analisar as sequências obtidas a partir sequenciamento do metabarcoding de ITS					
Inserir em plasmídeos o DNA extraído					
Triar os clones para a atividade celulítica					
Sequenciar os clones positivos					
Analisar as sequências					
Realizar ensaios enzimáticas adicionais					

7 - REFERÊNCIAS

- BALDRIAN, P. *et al.* Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 248–258, 2012.
- SHUKLA, G.; VARMA, A. Soil enzymology. In: BURNS, R. G. **Soil Biology**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 1–23.
- FAORO, H. *et al.* Identification of a new lipase family in the brazilian atlantic forest soil metagenome. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 6, p. 750–755, 2011
- FOUDYL-BEY, S.; BRAIS, S.; DROUIN, P. Litter heterogeneity modulates fungal activity, c mineralization and n retention in the boreal forest floor. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 100, p. 264–275, 2016.
- GEETHANJALI, P. .; JAYASHANKAR, P. M. A review on litter decomposition by soil fungal community. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p. 01–03, 2016.
- GOMES, A. P. *et al.* Uso de variáveis dendrométricas na estimativa de serrapilheira em área de floresta secundária inicial e floresta madura. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 7, n. 1, p. 13–21, 2009.
- GROSSO, F.; BÅÅTH, E.; NICOLA, F. DE. Bacterial and fungal growth on different plant litter in mediterranean soils: effects of c/n ratio and soil ph. **Applied Soil Ecology**, v. 108, p. 1–7, 2016
- IAP - Instituto Ambiental do Paraná. 2016. Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/>> Acesso em: 20 out 2016.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. 2ª ed. 2012. 271p.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-10, 2011.
- KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA, E. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 184–199, 2015.
- LAM, K. N. *et al.* Current and future resources for functional metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–8, 2015.
- MISHRA, G.; KUMAR, R. Plant litter decomposition: drivers insight to the ecological process. **European Journal of Biological Research**, v. 6, n. 3, p. 176–185, 2016.
- ORGIAZZI, A. *et al.* Soil biodiversity and dna barcodes: opportunities and challenges. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 80, p. 244–250, 2015.

- PANG, H. *et al.* Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. **Current Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 404–408, 2009.
- PARRON, L. M. *et al.* **Serviços ambientais em sistemas agrícolas e florestais do bioma mata atlântica**. 2015. 370 p.
- PEREIRA, G.A; BARCELLOS. Carboximetilcelulase (CMCase) minerada a partir de um banco de dados metagenômico. In: Workshop de Bioinformática da UTFPR. Anais do Workshop de Bioinformática. Cornélio Procópio, 2016.
- PEZZATTO, A. W.; WISNIEWSKI, C. Produção de serapilheira em diferentes seres sucessionais da floresta estacional semidecidual no oeste do paraná. **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 111–120, 2006.
- PIMENTA, J. A. *et al.* Produção de serrapilheira e ciclagem de nutrientes de um reflorestamento e de uma floresta estacional semidecidual no sul do brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 53–57, 2011.
- PINTO, S. I. D. C. *et al.* Produção de serapilheira em dois est dios sucessionais de floresta estacional semidecidual na reserva mata do paraíso, em viçosa, mg. **Revista  rvore**, v. 32, n. 3, p. 545–556, 2008.
- SAMBROOK, J. *et al.* **The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- SETHI, S. *et al.* Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 7, 2013.
- ŠTURSOVÁ, M. *et al.* Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 735–746, 2012.
- VITAL, A. R. T. *et al.* Produção de serapilheira e ciclagem de nutrientes de uma floresta estacional semidecidual em zona rip ria. **Revista  rvore**, v. 28, n. 6, p. 793–800, 2004
- WILKE, A. *et al.* **Mg-rast manual for version 3.6, revision 3**. 2015.
- YANG, C. *et al.* Discovery of new cellulases from the metagenome by a metagenomics-guided strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 138, 2016.
- ZANGARO, W. *et al.* Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an atlantic rainforest biome in southern brazil. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 3, p. 221–233, 2013