



ASSIGNMENT 2

Análise da diversidade microbiana em montes
e depressões do planalto Tibetano-Qinghai

Escola Superior de Tecnologia do Barreiro

Análise de sequências biológicas
Professor Francisco Pina Martins

Afonso Cabaço nº 202200295
Francisca Figueiredo nº202200580
Ravi Bonjardim nº202100191

Índice

Índice de tabelas	2
Introdução	3
Objetivos	4
Materiais & Métodos.....	4
Resultados	5
Discussão.....	8
Referencias	10

Índice de tabelas

Figura 1 - barplot das diferentes bactérias	6
Figura 2 - barplot de comparação entre gamma's e alpha's.....	6
Figura 3 - mapa de calor dos clusters	7
Figura 4 - Principais coordenadas de análise.....	7

Introdução

O artigo foca-se na importância das comunidades microbianas do solo em sistemas de zonas húmidas para os ciclos biogeoquímicos e funções desses ecossistemas (1). Devido às vantagens das tecnologias de sequenciamento de nova geração, o estudo da diversidade microbiana em diversas zonas húmidas naturais progrediu rapidamente. Técnicas como a piro sequenciação do gene 16S rRNA têm sido utilizadas para investigar a diversidade microbiana em diferentes zonas húmidas naturais, como as do norte dominadas por *Sphagnum* na Rússia (2), os pântanos em Massachusetts (3), as turfeiras na região do Lago Glacial Agassiz (4), e as zonas húmidas de água doce na Virgínia (5). Apesar do progresso significativo, ainda são necessárias mais pesquisas para uma caracterização completa da diversidade microbiana em zonas húmidas naturais (6).

A introdução também destaca a singularidade da Planície Qinghai-Tibetana, a maior e mais alta planície do mundo, com áreas de zonas húmidas (7). Estas zonas diferem das zonas boreais de altas latitudes por estarem em baixa latitude e alta altitude, apresentando microtopografia de hummock-hollow e vegetação dominada por ciperáceas (8). As zonas húmidas da Planície Qinghai-Tibetana são muito sensíveis às mudanças climáticas e desempenham um papel vital no armazenamento de carbono terrestre, além de fornecer importantes serviços ecológicos, como a manutenção da produtividade das pastagens e pasto para milhares de animais de gado (9).

No entanto, a composição das comunidades microbianas do solo nesse ecossistema distinto não foi completamente investigada. A pesquisa microbiológica na região tem se concentrado principalmente em grupos funcionais específicos de microrganismos, como metanogénicos e metanotróficos (10).

A principal hipótese do estudo foi explorar a diversidade microbiana em solos com montículos e ocos de três zonas húmidas no planalto Qinghai-Tibetano, focando especificamente em como as comunidades microbianas diferem com base na variação espacial dentro destas zonas húmidas e como os factores ambientais influenciam esta diversidade.

Esta hipótese teve como objetivo fornecer informações sobre os papéis ecológicos e distribuições de micróbios nestes ambientes únicos de zonas húmidas, contribuindo para a compreensão da ecologia microbiana em sistemas de zonas húmidas de alta altitude.

Objetivos

O objetivo principal deste projeto é reavaliar o trabalho previamente feito pelos investigadores (no artigo Deng, Y., Cui, X., Hernández, M., & Dumont, M. G. (2014)), para compreender melhor as comunidades microbianas nos solos chineses, com os conhecimentos obtidos durante as aulas de Análise e Sequências Biológicas (ASB). Usando ferramentas como o 'R', conseguiremos recriar tabelas como o *barplot* que engloba as diferentes espécies nos diferentes solos e posteriormente analisar a nossa tabela com a original do *paper*, comparando as 2 no final.

Materiais & Métodos

Para iniciar a recriação do artigo, procuraram-se os dados no *Sequence Read Archive* (SRA) do NCBI utilizando o código "SRP033622". Os resultados foram

então processados através de um *Run Selector*, a partir do qual foi descarregada a metadata necessária para a recriação.

Com os dados iniciais, a tabela foi filtrada de forma a incluir apenas duas colunas: uma coluna “Run” e outra que será utilizada para os nomes atribuídos às figuras futuras.

Run	Sample Name
SRR1048470	HYa.1
SRR1048471	HYa.2
SRR1048472	HYa.3
...	...

Utilizando esta nova tabela, os dados foram processados através de um *script* em *Shell* (process_metadata.sh). Este programa irá correr a tabela anterior e extrair a informação sobre cada entrada através do *Run Code*. Tanto este *script* como todos os outros programas utilizados podem ser encontrados no [repositório de GitHub](#). Este processo resultou na produção de ficheiros no formato “.fastq.gz”.

Os ficheiros obtidos foram então processados pela “Nextflow Pipeline-16s”, resultando em cinco outputs: dois barplots (“Class” e “Phylum”), um *heatmap* e dois *scatterplots* (“Class” e “Phylum”).

Resultados

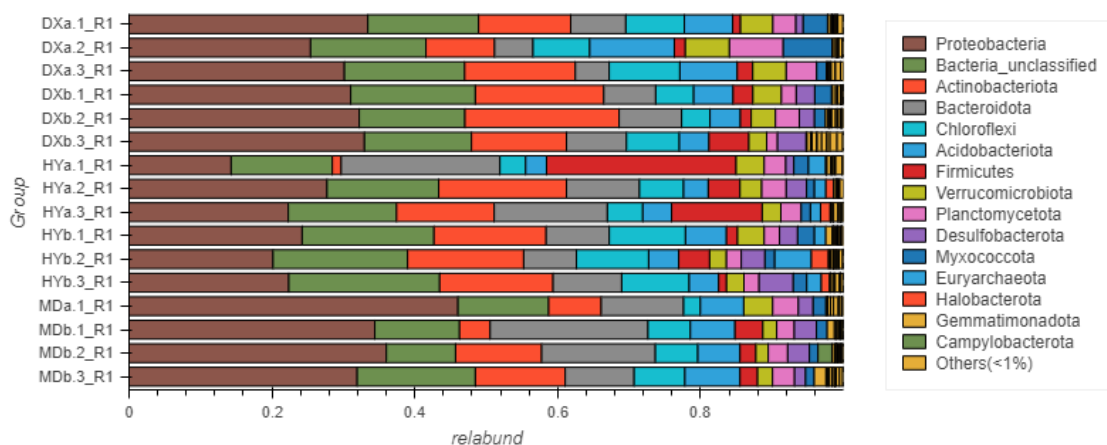


Figura 1 - barplot das diferentes bactérias

Neste barplot é possível observar que, em todos os solos, o ser com maior abundância relativa é a Proteobactéria, à exceção do grupo “HYa.1_R1” (solo Hongyuan – HY, montículo) onde o ser com maior abundância relativa é a Firmicutes.

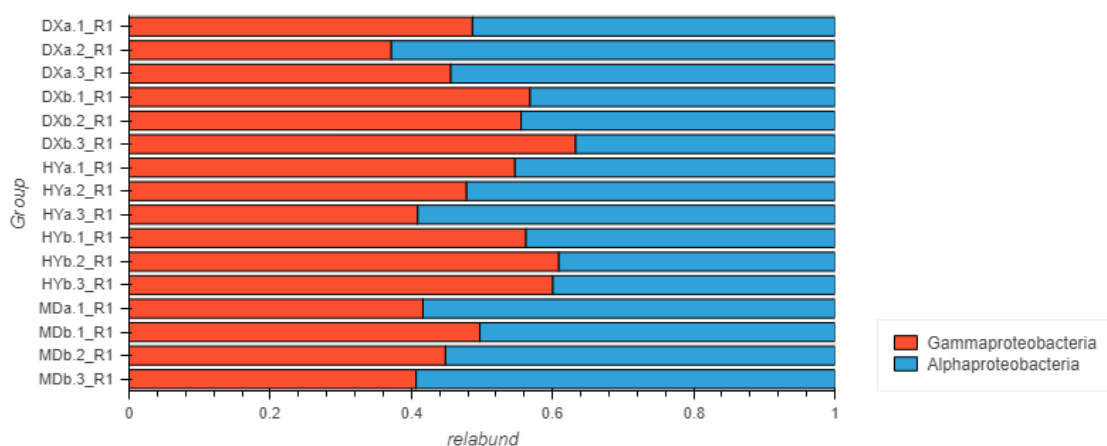


Figura 2 - barplot de comparação entre gamma's e alpha's

Uma comparação entre gammaproteobactérias e alphaproteobactérias entre os diferentes solos (Dangxiong - DX, Hongyuan - HY, e Maduo – MD; ‘a’- montículos, ‘b’- ocos; N° - repetições [1,2 ou 3])

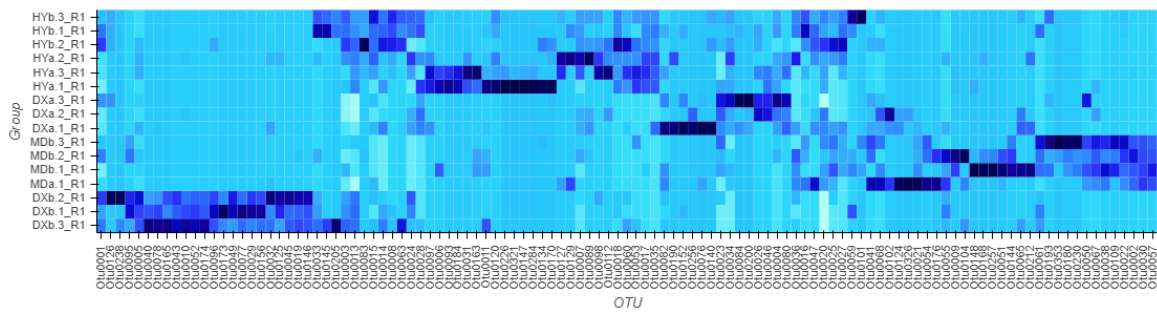


Figura 3 - mapa de calor dos clusters

Esta figura apresenta um mapa de calor dos clusters onde, nas cores mais fortes (azuis-escuros) é possível observar um maior valor do z-score (>3). Apresenta uma muita variação entre os diferentes solos e OTU's (unidades taxonómicas operacionais).

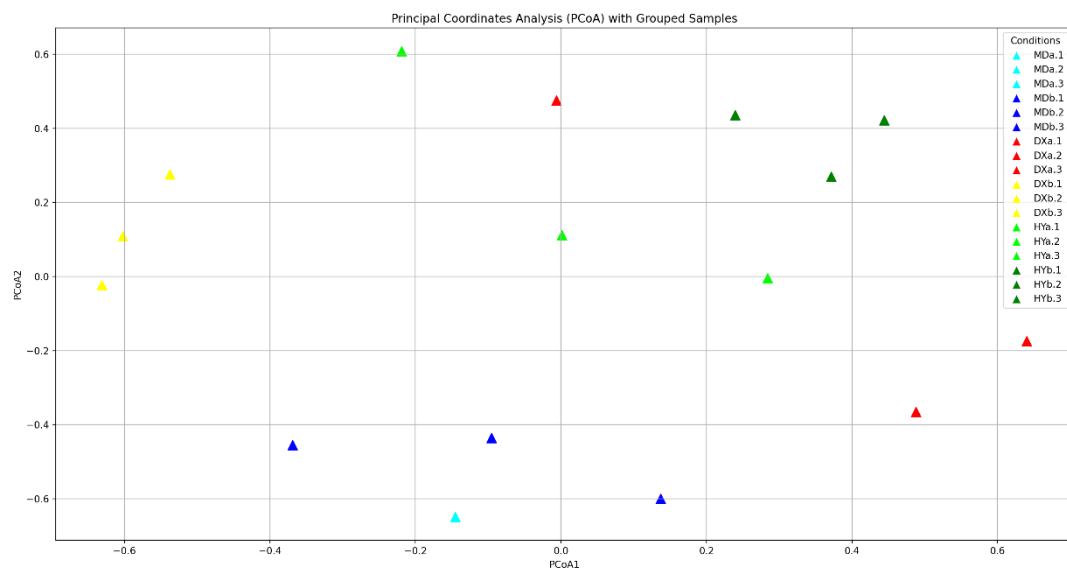


Figura 4 - Principais coordenadas de análise

Na figura 4 é possível ver as principais coordenadas de análise (PCoA) com as amostras agrupadas. Os diferentes tipos de amostras são os 3 diferentes solos (Dangxiong - DX, Hongyuan - HY, e Maduo - MD), sendo o 'a' solos com montículos, 'b' são os solos ocos e os números são os números de repetição dos ensaios.

Discussão

Comparando a nossa figura 1 com a figura 3 do paper, é possível observar que o número de proteobactérias é relativamente o mesmo em ambos os gráficos, tal como o número de actinobactérias. Algo que varia muito entre ambos é o número relativo de abundância de *firmicute* pois, no nosso *paper*, no solo com montículos de *Hongyuan* existe com muito mais abundância que no *paper* original. Isto pode-se dever pois no nosso *paper*, separámos os solos em número de repetições também, algo que originalmente não aconteceu.

A figura 2 é apresentada para demonstrar a que tipo de proteobactérias existem mais em cada solo, existindo mais bactérias *Alpha* nos solos em *Dangxiong* com montículos e em *Maduo*, independentemente de ser com montículos ou solos ocos. O único solo em que a variante gamma existe em maior número é no solo oco de *Hongyuan*. Nos restantes solos dá para verificar que existe um certo equilíbrio entre ambos.

Falando do *heatmap* da figura 3, oferece uma visualização clara das distribuições relativas de *OTU's* nas diferentes amostras de solo, corroborando as conclusões do paper sobre a diversidade microbiana e as diferenças entre solos com montículos e ocos nas três zonas húmidas estudadas. A variação na abundância relativa dos *OTU's* destacada no *heatmap* é consistente com os resultados detalhados no paper, reforçando a importância dos fatores ambientais na determinação das comunidades microbianas do solo.

O paper destaca que há diferenças significativas nas comunidades microbianas entre os montículos e ocos, influenciadas por fatores ambientais como pH do solo, humidade e carbono orgânico. O *heatmap* reflete essas diferenças, mostrando padrões distintos de abundância de *OTU's* entre os diferentes tipos de solo.

Já na figura 4, as diferentes áreas de estudo tendem a agrupar-se perto umas das outras como podemos ver com os solos de *Maduo* e *Hongyuan*, mesmo sendo diferentes solos com ocos e montículos estão próximos. Tal não acontece com *Dangxiong*, é possível observar que os solos ocos e com montículos estão presentes em lados opostos do espectro, existindo também um *outlier* de DXa entre os valores de *Hongyuan*

Então, é possível ver as principais coordenadas de análise (PCoA) e este fornece uma representação visual das diferenças nas comunidades microbianas entre as amostras de solo das diferentes zonas húmidas e tipos de solo. Comparado com o *paper*, este gráfico corrobora as conclusões sobre as diferenças significativas

na estrutura da comunidade microbiana devido a fatores geográficos e microtopográficos, reforçando a importância das condições ambientais na determinação da diversidade microbiana do solo.

Referencias

- (1) Bodelier PL, Dedysh SN (2013) Microbiology of wetlands. *Front Microbiol* 4: 79.
- (2) Serkebaeva YM, Kim Y, Liesack W, Dedysh SN (2013) Pyrosequencing-based assessment of the bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions. *PLoS One* 8: e63994.
- (3) Bowen JL, Ward BB, Morrison HG, Hobbie JE, Valiela I, et al. (2011) Microbial community composition in sediments resists perturbation by nutrient enrichment. *ISME J* 5: 1540–1548.
- (4) Lin X, Green S, Tfaily MM, Prakash O, Konstantinidis KT, et al. (2012) Microbial community structure and activity linked to contrasting biogeochemical gradients in bog and fen environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. *Appl Environ Microbiol* 78: 7023–7031.
- (5) Peralta RM, Ahn C, Gillevet PM (2013) Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands. *Sci Total Environ* 443: 725–732.
- (6) Shen H, Tang Y, Washitani U (2006) Morphological plasticity of *Primula nutans* to hummock-and-hollow microsites in an alpine wetland. *J Plant Res* 119: 257–264.
- (7) Gao J, Li XL, Brierley G (2012) Topographic influence on wetland distribution and change in Maduo County, Qinghai-Tibet Plateau, China. *J Mt Sci* 9: 362–371.
- (8) Zhang GS, Tian JQ, Jiang N, Guo XP, Wang YF, et al. (2008) Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC-I. *Environ Microbiol* 10: 1850–1860.
- (9) Tian JQ, Wang YF, Dong XZ (2010) *Methanoculleus hydrogenitrophicus* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from wetland soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2165–2169.
- (10) Deng Y, Cui X, Lüke C, Dumont MG (2013) Aerobic methanotroph diversity in Riganqiao peatlands on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Environ Microbiol Rep* 5: 566–574.