

ANELI EIKO ABE

**DIVERSIDADE VIRAL EM AMOSTRAS DE SOLO: PADRONIZAÇÃO E
VALIDAÇÃO METODOLÓGICA E ESTUDO DA DIVERSIDADE VIRAL EM
AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

T

Abe, Aneli Eiko, 1990-
A138d Diversidade viral em amostras de solo : padronização e validação
2016 metodológica e estudo da diversidade viral em amostras de solo da região
 Amazônica / Aneli Eiko Abe. - Viçosa, MG, 2016.
 xiii, 87f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Cynthia Canêdo da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Solos florestais - Amazônia. 2. Solos florestais - Rondônia. 3. Micro-
organismos do solo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola.
II. Título.

CDD 22 ed. 631.448111

ANELI EIKO ABE

**DIVERSIDADE VIRAL EM AMOSTRAS DE SOLO: PADRONIZAÇÃO E
VALIDAÇÃO METODOLÓGICA E ESTUDO DA DIVERSIDADE VIRAL EM
AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO AMAZÔNICA**

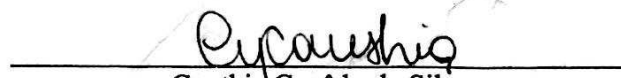
Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 23 de agosto de 2016.


Roberto Sousa Dias
(Coorientador)


Poliane Alfenas Zerbini


Monique Renon Eller


Cynthia Canêdo da Silva
(Orientadora)

Agradecimentos

Seria impossível listar o nome de todos que direta ou indiretamente participaram da minha formação como pessoa e como profissional. Entretanto, algumas pessoas merecem destaque e meus sinceros agradecimentos.

Gostaria de agradecer primeiramente os meus pais, Pedro e Leni, por tudo que me proporcionaram em todos esses anos! Vocês são meus maiores exemplos. Espero um dia poder retribuir tudo que vocês fazem por mim! Obrigada pelos conselhos e apoio nas minhas decisões!

Obrigada aos meus tios, tias, avós, primos e irmão pelo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, obrigada pela oportunidade!!

Agradecer à CAPES pela bolsa, ao CNPQ pelo financiamento do projeto e FAPEMIG pelo suporte à pesquisa.

Obrigada Cynthia e Roberto pela orientação durante o mestrado.

Obrigada ao Sérgio que permitiu que meu trabalho fosse desenvolvido no Laboratório de Immunovirologia Molecular (LIVM).

Obrigada aos professores da banca pela disponibilidade.

Obrigada à todos do LIVM.

Obrigada aos meus amigos da micro, que fizeram meus dias mais felizes!!! Obrigada pelas saídas, viagens, almoços/jantares, e apoio nos momentos difíceis!

Obrigada aos amigos de Arujá, que pretendo ver com mais frequência a partir de agora!

Obrigada aos meus queridos amigos da UNESP, que fazem muita falta!

Obrigada ao pessoal do Núcleo de Microscopia e Microanálise por me auxiliarem nas minhas análises no MET.

Obrigada aos professores do Departamento de Microbiologia que contribuíram para minha formação acadêmica.

Obrigada ao Pedro, que sempre ajudou nas análises de bioinformática!!

Obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação durante esses dois anos!!

BIOGRAFIA

Aneli Eiko Abe, filha de Pedro Tikashi Abe e Leni Tomita Abe, nasceu no dia 9 de janeiro de 1990, em São Paulo, SP. Em 2013 graduou-se em Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Bauru. Em 2014/2, ingressou como discente de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em 23 de Agosto de 2016.

Sumário

Lista de figuras	viii
Resumo	x
Abstract	xii
1 Introdução geral	1
2 Revisão de literatura	3
2.1 Bacia Amazônica	3
2.2 Micro-organismos do solo e conversão de floresta para pastagem e áreas de cultivo agrícola	4
2.3 Diversidade e técnicas de concentração viral	6
2.4 Estudo de diversidade viral em amostras ambientais	8
3 Referências	11
4 Objetivos	18
4.1 Objetivo geral	18
4.2 Objetivos específicos	18
5 Apresentação da dissertação	19
CAPÍTULO 1 - Determination of viral concentration methods for diversity study in soil samples	20
Abstract	21
1 Introduction	22
2 Material and methods	23
2.1 Sample collection	23
2.2 Sample processing	24
2.3 Viral concentration	24
2.3.1 Negatively charged membrane HA	24
2.3.2 Polyethylene Glycol (PEG)	25
2.3.3 Ultracentrifugation	25
2.4 Viral DNA extraction	26
2.5 Molecular characterization	26

2.5.1	RAPD	26
2.6	Morphological characterization	27
2.6.1	TEM	27
3	Results	27
3.1	RAPD	27
3.2	Morphological diversity	31
3.3	Sample quality	34
4	Discussion	34
5	Conclusion	36
6	Acknowledgments.....	36
7	References	37
CAPÍTULO 2 - Viral diversity in soil of agricultural areas with different fertilization systems		
Abstract		41
Abstract		42
1	Introduction	43
2	Material and methods	44
2.1	Sample collection	44
2.2	Sample processing	45
2.3	Viral concentration	45
2.4	Viral DNA extraction and molecular characterization	45
2.5	Morphological characterization	46
2.6	pH	46
3	Results	46
3.1	RAPD	46
3.2	Morphological characterization	48
4	Discussion	51
5	Conclusion	53
6	Acknowledgments	53
7	References	54

CAPÍTULO 3 - Diversidade viral em amostras de solo de floresta e pastagem da região amazônica	58
Resumo	59
Abstract	60
1 Introdução	61
2 Material e métodos	64
2.1 Amostragem	64
2.2 Avaliação da diversidade em amostras de solo de floresta e pastagem	64
2.2.1 Extração de DNA total e sequenciamento das amostras de solo ...	64
2.2.2 Concentração viral e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	65
3 Resultados	66
3.1 Análise metagenômica	66
3.2 Análise morfológica por MET	69
4 Discussão	74
5 Conclusão	78
6 Referências	79
7 Material Suplementar	85
6 Conclusões gerais	87

Lista de figuras

CAPÍTULO 1 - Determination of viral concentration methods for diversity study in soil samples

Figure 1. Band patterns obtained from RAPD reaction using RAPD5 primer.

Figure 2. Band patterns obtained from RAPD reaction using OPL5 primer.

Figure 3. Band patterns obtained from RAPD reaction using P2 primer.

Figure 4. Transmission electron micrographs of viruses after concentration with HA membrane.

Figure 5. Transmission electron micrographs of viruses after concentration with PEG.

Figure 6. Transmission electron micrographs of viruses after concentration by ultracentrifugation.

Figure 7. Transmission electron micrographs of samples after concentration showing the difference in the sample backgrounds.

CAPÍTULO 2 - Viral diversity in soil of agricultural areas with different fertilization systems

Figure 1. Band patterns obtained after RAPD reaction for each site using RAPD5 primer.

Figure 2. Band patterns obtained after RAPD reaction for each site using OPL5 primer.

Figure 3. Band patterns obtained after RAPD reaction for each site using P2 primer.

Figure 4. Morphological analysis of viral diversity from site 1.

Figure 5. Morphological analysis of viral diversity from site 2.

Figure 6. Morphological analysis of viral diversity from site 3.

CAPÍTULO 3 - Diversidade viral em amostras de solo de floresta e pastagem da região amazônica

Figura 1. Classificação das sequências virais presentes no metagenoma de amostras de floresta e amostras de pastagem.

Figura 2. Proporção das sequências pertencentes a diferentes famílias virais. (a) *pool* de amostras de floresta e (b) *pool* de amostras de pastagem.

Figura 3. Proporção das sequências pertencentes às famílias da ordem *Caudovirales*.

Figura 4. Diversidade viral em amostras de Fta (plintossolo argilúvico alumínico) de floresta e pastagem.

Figura 5. Diversidade viral em amostras de Ftd (plintossolo argilúvico distrófico) de floresta e pastagem.

Figura 6. Diversidade viral em amostras de LVAd (latossolo vermelho-amarelo distrófico) de floresta e pastagem.

Figura 7. Diversidade viral em amostras de PVAd (argissolo vermelho-amarelo distrófico) de floresta e pastagem.

Material suplementar

Figura 1. Mapa da bacia Hidrográfica do rio Mutum-Paraná com localização dos 20 pontos de coleta.

Resumo

ABE, Aneli Eiko, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Padronização metodológica de concentração e estudo de diversidade viral em amostras de solo da região Amazônica.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Roberto Sousa Dias.

A floresta Amazônica é a maior e mais diversa floresta tropical do mundo, localizada em nove países da América do Sul, sendo a maior parte presente em território brasileiro, nas regiões Norte e Centro-Oeste. Até a década de 1970, a Amazônia brasileira era pouco explorada, porém após criação de projetos para ocupação e desenvolvimento do local, iniciou-se a migração para essas regiões, e regiões de floresta foram transformadas em áreas de cultivo agrícola e pastagem. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de acessar a diversidade viral em amostras de solo de floresta e pastagem da bacia do Rio Mutum Paraná, no estado de Rondônia, por meio do sequenciamento do metagenoma e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de concentrado viral. Entretanto, para isso foi feita a padronização de metodologias para o estudo da diversidade viral em amostras de solo e avaliação do efeito de diferentes sistemas de fertilização sobre diversidade viral em solos de áreas de cultivo agrícola, localizados na área da Universidade Federal de Viçosa. Os resultados da padronização de metodologias para concentração viral por ultracentrifugação, polietilenoglicol (PEG) e membrana HA, mostraram que esta última apresentou os resultados mais satisfatórios, quando a diversidade viral foi acessada por meio de RAPD e MET. O material preparado para o MET foi o que teve menor *background*, ao passo que a concentração viral por PEG foi a que apresentou os piores resultados para a amostra de solo analisada. Os resultados obtidos no estudo do efeito dos diferentes fertilizantes utilizados mostraram por meio de RAPD e MET que a combinação dos fertilizantes orgânico e inorgânico aumentam a diversidade viral. Em relação às amostras de solo de floresta e pastagem da bacia do Rio Mutum Paraná, a análise taxonômica das sequências do metagenoma pelo MetaVir mostraram que o solo de pastagem apresentou maior número de famílias virais. Em ambas as amostras, os vírus de DNA dupla fita foram os mais abundantes. Dentre os vírus caudados, as famílias *Myoviridae* e *Siphoviridae* foram as mais abundantes

para as duas amostras analisadas. As análises morfológicas pelo MET mostraram que as amostras de floresta apresentaram maior diversidade morfológica viral, com relação às amostras de pastagem.

Abstract

ABE, Aneli Eiko, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Standardization of concentration method and study of viral diversity in soil samples from Amazonic region.** Adviser: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Roberto Sousa Dias.

The Amazon rainforest is the largest and more diverse tropical forest in the world, located in nine countries of South America, in which most part of it is located in Brazilian territory, in the North and Midwest regions. Until the 1970's the Brazilian Amazon was little explored, however after creation of occupation and local development projects, migration to these areas began, and the forest was converted to agricultural areas and pasture. Thus, this work aimed to get access to viral diversity in soil samples of forest and pasture from Mutum Paraná river basin, in Rondônia state, by metagenome sequencing and transmission electron microscopy (TEM) of viral concentrate. However, firstly standardization of methodologies for study of viral diversity in soil samples and evaluation of the effect of different fertilization systems on viral diversity in agricultural areas, located at Federal University of Viçosa were done. The results from standardization of viral concentration methods by ultracentrifugation, polyethylene glycol (PEG) and HA membrane, showed that the last method had better results, after random amplified polymorphic DNA (RAPD) reaction and TEM analysis. The material obtained after concentration showed less background. On the other hand, viral concentration using PEG had worse results for the soil sample analyzed. The results obtained in the study of the effect of different fertilizers over viral diversity showed by RAPD and TEM that the combination of organic and inorganic fertilizers increase viral diversity. In relation to forest and pasture soils from Mutum Paraná river basin, the taxonomic analysis from metagenome sequences using MetaVir showed that pasture have more viral families. Both samples dsDNA viruses were more abundant. Among tailed viruses, *Myoviridae* and *Siphoviridae* families

are more abundant in both samples. Morphological analysis by TEM showed that the forest samples had greater morphological diversity, in relation to pasture samples.

1 Introdução geral

A floresta Amazônica é a maior e mais diversa floresta tropical que existe no planeta (BORNEMAN & TRIPLETT, 1997; DA SILVA et al., 2005). Cerca 63% de sua área total presente no território brasileiro (ESPINOZA VILLAR et al., 2009), em nove estados localizados nas regiões norte e centro-oeste. Na Amazônia brasileira, a ocupação se deu principalmente durante as décadas de 1970 e 1980, após a criação de políticas públicas de desenvolvimento e financiamento que apoiavam a ocupação para o avanço da agropecuária (NEVES JUNIOR et al., 2013). A maior parte da sua área convertida foi transformada em áreas de pastagem, sendo a queimada a principal forma para realização desta conversão (DE SOUZA BRAZ et al., 2013). A degradação do solo decorrente da instalação de pastagens é um processo contínuo de alterações, que se inicia com a perda de vigor e produtividade (NEVES JUNIOR et al., 2013) e diminuição da biodiversidade local (PEREIRA et al., 2016).

Apesar de a conversão de florestas a pastagens ser economicamente importante, a floresta amazônica como um todo tem grande importância nos ciclos do carbono, água (GALFORD et al., 2010; HAMAOUÏ et al., 2016), nitrogênio e temperatura do planeta (HAMAOUÏ et al., 2016). Os micro-organismos presentes no solo têm papel essencial na realização desses processos, uma vez que participam de ciclos biogeoquímicos e contribuem para a manutenção da produtividade de plantas por diferentes mecanismos (VAN DER HEIJDEN et al., 2008). As cinzas geradas com as queimadas do processo de conversão reagem com o solo (DE SOUZA BRAZ et al., 2013), e alteram suas propriedades químicas, físicas e biológicas, alterando também a comunidade microbiana. Durante o processo de queimada pode haver a retirada total ou parcial da comunidade microbiana original, uma vez que temperaturas acima de 127 ° C são capazes de esterilizar o solo, e a exposição do solo a 70 ° C por dez minutos é capaz de matar fungos não esporulantes, protozoários e bactérias (RAISON, 1979).

A utilização do solo como área de cultivo agrícola também causa alteração na composição da comunidade microbiana (CHEN et al., 2014), uma vez que o uso de fertilizantes muda a estrutura da comunidade microbiana local (DRENOVSKY et al., 2004; CHEN, 2006; JANGID et al., 2008) e também o perfil funcional (BENDING et al., 2002).

Áreas de cultivo agrícola que utilizam fertilizantes orgânicos apresentam maior diversidade bacteriana do que áreas de cultivo agrícola que utilizam fertilizantes inorgânicos (JANGID et al., 2008). Além disso, os fertilizantes inorgânicos podem mudar o pH do solo, acidificando ou alcalinizando o solo (CHEN, 2006), afetando a comunidade microbiana local (ROUSK et al., 2010). A combinação dos dois tipos de fertilização mostrou ser capaz de aumentar a biomassa microbiana, podendo estar associada a maior atividade biológica e mineralização (NZIGUHEBA et al., 1998).

Os vírus fazem parte destes micro-organismos presentes no solo, e são importantes para a manutenção das funções entre os diferentes ecossistemas (CHEN et al., 2014). Como nestes ambientes as bactérias são as hospedeiras mais comuns, a maioria das partículas tipo vírus (VLPs) encontrada é considerada como pertencente ao grupo dos bacteriófagos, vírus que são capazes de infectar células bacterianas (SANO et al., 2004). Os bacteriófagos influenciam diretamente na atividade e ecologia de populações bacterianas (SRINIVASIAH et al., 2013) por meio dos seus ciclos lítico e lisogênico. Além disso, eles são capazes de influenciar na evolução bacteriana, já que os bacteriófagos caudados são as partículas mais eficientes na transferência de genes desenvolvidas na evolução, por meio da transdução (CANCHAYA et al., 2003).

Os bacteriófagos encontrados naturalmente no solo, podem ser considerados potenciais controladores de bactérias patogênicas que causam impacto econômico. As principais característica dos bacteriófagos que os tornam potenciais agentes controladores bacterianos é que além de infectarem exclusivamente bactérias (FRAMPTON et al., 2014), estes apresentam alta especificidade com a espécie hospedeira a ser infectada e são capazes de matar a célula rapidamente (SPRICIGO et al., 2013).

Neste contexto, o estudo desses micro-organismos em ambientes do solo é interessante para o entendimento da dinâmica e funcionamento das comunidades microbianas do ambiente.

2 Revisão de literatura

2.1 Bacia Amazônica

A Bacia Amazônica, tem a maior floresta equatorial do mundo (BORNEMAN & TRIPLETT, 1997; CENCIANI et al., 2009), englobando 9 nações, sendo o Brasil apresentando a maior parte, 5,0 milhões de km² dos 7 milhões de km² total (IPEA). Sua ocupação intensa começou no início da década de 1970 (FEARNSIDE, 2005), devido à grande expansão econômica que havia no local (DE MIRANDA & MATTOS, 1992), e a partir disso as áreas de floresta passaram a ser convertidas principalmente áreas de cultivo agrícola (NAVARRETE et al., 2011) e áreas de pastagem para gado, que tem sido o principal uso das áreas desmatadas da Amazônia (FEARNSIDE, 1996), já que a região tem um terço do rebanho bovino brasileiro (GEEA., 2011). Até 2007, a floresta natural amazônica teve uma área desmatada de cerca de 17,2% (ARAÚJO et al., 2011).

Os tipos de solos predominantes na região amazônica são das classes do latossolos e argissolos, que têm como característica a baixa fertilidade (CAMPOS et al., 2012), que é mantida principalmente pelos processos geoquímicos, bioquímicos e biogeoquímicos (MOREIRA e FAGERIA, 2009). A retirada da vegetação natural para conversão para áreas de cultivo e áreas de pastagem leva a um aumento temporário da fertilidade do solo (MOREIRA & FAGERIA, 2009), porém afeta os ciclos biogeoquímicos e clima, devido à emissão de gases traço como CH₄, CO, N₂O e NO_x, (FEARNSIDE & BARBOSA, 1998). Além da derrubada de árvores, são feitas queimadas durante o processo de conversão de florestas em pastagens (GRAÇA et al., 1999). Essas queimadas influenciam nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, assim como na comunidade microbiana, que pode ser eliminada do ambiente, já que temperaturas acima de 127° C podem esterilizar o solo, e exposição do solo a 70° C por dez minutos é capaz de matar fungos não esporulantes, protozoários e bactérias (RAISON, 1979).

2.2 Micro-organismos do solo e conversão de floresta para pastagem e áreas de cultivo agrícola

A microbiologia do solo é descrita em números, atividade e interações dos micro-organismos presentes no solo, os quais são afetados pelo ambiente ou pelas atividades humanas (GABRIEL, 2010). Os micro-organismos do solo são responsáveis por atuarem na produtividade de plantas nos ecossistemas terrestres e na manutenção de ciclos biogeoquímicos (VAN DER HEIJDEN et al., 2008; NANNIPIERI et al., 2003), fazendo degradação de todos os compostos orgânicos, inclusive compostos xenobióticos (NANNIPIERI et al., 2003). Além disso, estes participam da promoção de crescimento de plantas (PII et al., 2015), germinação de sementes (KAZAZ et al., 2010) e da agregação do solo (TISDALL, 1994).

O solo representa a maior fonte de micro-organismos em todo planeta, que podem ser estudados por meio de métodos de cultivo e/ou métodos independentes de cultivo, como de biologia molecular (MOCALI & BENEDETTI, 2010). Cerca de 1% da diversidade microbiana é representada como organismos cultiváveis, enquanto os 99% restantes têm suas características e funções ainda desconhecidas (BODELIER, 2011). Existem diversos motivos pelos quais os micro-organismos não podem ser cultivados em condições de laboratório, como por exemplo, a alta concentração de um substrato ou ausência de um nutriente específico necessário para seu crescimento (MOCALI & BENEDETTI, 2010).

Cientes destas limitações, nas últimas décadas o estudo da microbiologia do solo apresentou grande progresso, graças a novas técnicas desenvolvidas, principalmente na área de biologia molecular. Dentre elas destacam-se as baseadas em PCR e sequenciamento de nova geração (NGS); bem como de novas tecnologias para cultivo, como simulação das condições naturais a fim de estudar a atividade bioquímica, ecologia e função dos micro-organismos presentes em amostras ambientais (GABRIEL, 2010).

Os micro-organismos podem ser utilizados como indicadores do estado do solo, já que respondem rápido a estresse ajustando a atividade, biomassa e estrutura da comunidade (SCHLOTTER et al., 2003), podendo reduzir a capacidade metabólica dos micro-organismos em ambientes menos diversos (HATTENSCHWILER et al., 2005). Diversos trabalhos

podem ser encontrados na literatura evidenciando os micro-organismos como indicadores de alterações do uso do solo.

Nas áreas de cultivo agrícola, o tipo de fertilização utilizada tem impacto na comunidade microbiana do solo e suas atividades (CHEN et al., 2014), sendo os fertilizantes orgânicos fontes de nutrientes balanceada, que é capaz de aumentar a atividade biológica, a colonização local, além de ajudar na melhoria da matéria orgânica e na estrutura do solo (CHEN, 2006). Já os fertilizantes inorgânicos possuem nutrientes solúveis que estão prontamente disponíveis para as plantas e têm maior quantidade de nutrientes quando comparado aos fertilizantes orgânicos (CHEN, 2006).

Trabalhos encontrados na literatura mostraram que a adição de fertilizantes orgânicos é capaz de determinar a diversidade funcional da comunidade (BENDING et al., 2002), e alterar a estrutura da comunidade, selecionando populações mais competitivas em termos de taxa de crescimento e habilidade de absorção de nutrientes (DRENOVSKY et al., 2004). Áreas de cultivo agrícola que utilizam fertilizantes orgânicos mostraram ter a diversidade bacteriana maior do que áreas que utilizam fertilizantes inorgânicos (JANGID et al., 2008). Além disso, os fertilizantes inorgânicos podem mudar o pH do solo, podendo acidificar ou alcalinizar o solo (CHEN, 2006), afetando assim a comunidade microbiana local (ROUSK et al., 2010). A combinação dos dois tipos de fertilização mostrou ser capaz de aumentar a biomassa microbiana, que pode estar associada a maior atividade biológica e mineralização (NZIGUHEBA et al., 1998).

Já áreas de floresta que foram convertidas para pastagem foi investigada por Paula e colaboradores (2014) em que foi avaliado se houve alteração da diversidade funcional de micro-organismos e se a diversidade funcional observada na floresta primária foi restabelecida na floresta secundária. Para isso, foram coletadas amostras de uma floresta primária, de duas pastagens (6 anos e 38 anos) e de uma floresta secundária, todas na região amazônica, no estado de Rondônia. O acesso à diversidade funcional foi realizado pela técnica de microarranjo utilizando o Geochip. Em comparação com a floresta primária, as duas amostras de pastagem apresentaram menor riqueza e diversidade de genes funcionais. Com relação à floresta primária e a floresta secundária, foi observada similaridade na riqueza

e diversidade de genes funcionais, mas apresentaram diferenças da composição de genes, sugerindo que a recuperação da comunidade na floresta secundária não foi completa.

No trabalho de Moraes e colaboradores (1996) foi feito o estudo das mudanças das propriedades químicas e físicas do solo, bem como da matéria orgânica após o desmatamento da área de floresta e estabelecimento de área para pastagem. Para realização do estudo, foram selecionadas duas regiões no estado de Rondônia em que haviam áreas de floresta e áreas convertidas para pastagem com diferentes idades. Foi possível observar que as características morfológicas do solo eram similares entre os pontos de cada região, e que a conversão para pastagem levou a um aumento dos cátions e do pH no solo por cinco anos após o estabelecimento da área de pastagem, seguidos de decréscimo nos anos posteriores. A retirada da vegetação para estabelecimento da pastagem foi associada com a mudança significativa da matéria orgânica do solo, que resultou no aumento da quantidade de carbono no solo.

Cenciani e colaboradores (2009) avaliaram o impacto da mudança de uso do solo da região Amazônica na estrutura da comunidade bacteriana, e observou que a conversão de floresta em pastagem para gado e o seu posterior abandono afetou as propriedades químicas do solo, a biomassa microbiana e a estrutura das comunidades bacterianas. Além disso, o trabalho mostrou que as bactérias do solo variaram significativamente de acordo com as diferentes fontes de matéria orgânica e propriedades físico-químicas de cada ponto analisado.

2.3 Diversidade e técnicas de concentração viral

Vírus são considerados micro-organismos ubíquos e estão presentes em todos os ambientes onde há vida (ROHWER et al., 2009). Na maioria dos ambientes, as partículas semelhantes a vírus (VLPs) são consideradas bacteriófagos (BREITBART & ROHWER, 2005). Os bacteriófagos fazem parte do grupo de entidades biológicas mais abundante no planeta (ROHWER, 2003), e a presença destes no solo pode influenciar na atividade, ecologia e evolução de populações bacterianas hospedeiras (SRINIVASIAH et al., 2013).

Os bacteriófagos, como todo vírus, são parasitas obrigatórios e precisam da maquinaria celular para a formação de novas partículas virais. Iniciam o ciclo infeccioso primeiramente se ligando aos receptores presentes na superfície da bactéria e injetando seus genomas dentro das células (OWENS & HODGSON, 2013; VOS et al., 2009). Após a injeção do genoma na célula, o bacteriófago pode seguir os ciclos lítico ou lisogênico. No ciclo lítico, o bacteriófago utiliza a maquinaria celular para replicar seu genoma, montar novas partículas virais que são liberadas após a lise celular. No ciclo lisogênico, o DNA do vírus integra no genoma bacteriano, e como profago é replicado como se fosse parte do cromossomo bacteriano, sem formação de novas partículas virais ou lise celular (PENADÉS et al., 2015). Pelo ciclo de infecção eles podem atuar na evolução de bactérias, por meio da transferência horizontal de genes via transdução, onde o vírus introduz material genético novo em uma bactéria, que foi adquirido de uma outra bactéria, a doadora (OCHMAN et al., 2000). Desta forma, a bactéria receptora pode adquirir novos genes, que sejam necessários para ocupar um novo ambiente (JAIN et al., 2003).

Os vírus, como os outros micro-organismos, podem ser estudados por meio de técnicas dependentes ou independente de cultivo (BREITBART & ROHWER, 2005). Entretanto, o estudo de diversidade viral é difícil de ser realizado, uma vez que vírus não possuem um gene conservado, como genes de RNAr em organismos celulares, e pelo fato de existirem hospedeiros virais difíceis de serem cultivados (ROHWER & THURBER, 2009). Assim, para a recuperação de um maior número de espécies virais em uma amostra, diferentes métodos de concentração são utilizados em estudos de diversidade. As primeiras técnicas desenvolvidas para o estudo viral foram para vírus que infectam humanos, animais e plantas (COLOMBET & SIME-NGANDO, 2012), sendo posteriormente adaptadas para o estudo destes micro-organismos em amostras ambientais.

Dentre as técnicas comumente utilizadas para concentrar partículas virais está o uso do polietilenoglicol (PEG), que é um polímero capaz de cristalizar partículas virais na presença de sais monovalentes (COLOMBET & SIME-NGANDO, 2012) e concentra as partículas da amostra, precipitando-as. Na técnica da membrana carregada negativamente ocorre a acidificação ou adição de sais na amostra que fazem com que a partícula fique com carga

positiva (KATAYAMA *et al.*, 2002) e acaba influenciando na adsorção dos vírus na membrana (HAMZA *et al.*, 2009), que após passar por eluição em menor volume concentra as partículas virais. Na ultracentrifugação, as partículas virais são separadas de acordo com seu tamanho e densidade, migrando por um gradiente de concentração até encontrar a região em que a densidade da solução se iguala a densidade da partícula (IKNER *et al.*, 2012).

2.4 Estudo de diversidade viral em amostras ambientais

O estudo da diversidade viral por métodos independente de cultivo tem permitido a realização da manutenção do solo e minimizado impactos ambientais negativos, uma vez que possibilita uma melhor compreensão das comunidades microbianas, cultiváveis e não cultiváveis, responsáveis por determinadas atividades e como elas respondem ao estresse ambiental, à mudanças climáticas, dentre outras variáveis (HIRSCH *et al.*, 2010). Dentre as técnicas independentes de cultivo utilizadas está o RAPD e a metagenômica, que consiste do sequenciamento direto do DNA total extraído de amostras ambientais, ou pela eventual clonagem deste DNA seguindo de estratégias de *screening* e sequenciamento dos clones, seguido de processamento dos dados e bioinformática (MOCALI e BENEDETTI, 2010).

Ainda existem poucos trabalhos de diversidade viral numa abordagem independente de cultivo para amostras de solo, a literatura tem mostrado um maior número de trabalhos de estudo de diversidade viral para amostra de ambientes aquáticos (DÍEZ *et al.*, 2000; ROSARIO *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015). Kim e colaboradores (2015) utilizaram a metagenômica para determinar e comparar a diversidade taxonômica e composição de comunidades virais em águas de lastro e águas de portos. Foram coletadas amostras de água de lastro de tanques de diferentes origens e as amostras de água de portos foram retiradas do mesmo lago, mas em diferentes pontos. O resultado mostrou que dentre as trinta e quatro famílias identificadas, doze eram comuns a todas as amostras, sugerindo que a composição viral entre os lagos de origem dos tanques apresentou similaridades. Seis famílias virais, exclusivas das amostras de água de lastro, portanto não detectadas nas amostras do porto,

sugerem que pode ter ocorrido um despejo de águas de lastro contendo vírus não nativo no porto, e sua colonização ser feita no local.

Rosario e colaboradores (2009) verificaram a diversidade viral utilizando a metagenômica em amostras de águas reutilizadas e compararam com a diversidade viral observada em amostras de água potável. Os resultados mostraram que bacteriófagos eram os vírus mais abundantes nas águas reutilizadas e nas águas potáveis, porém as famílias mais abundantes em cada uma das amostras eram diferente. Nas sequências de RNA, os vírus mais abundantes encontrados em todas as amostras foram de eucariotos. Além da análise metagenômica, foi feita a análise morfológica por TEM e enumeração de partículas semelhantes a vírus (VLPs) por microscopia epifluorescência. Na enumeração viral a amostra de água reutilizada apresentou cerca de mil vezes mais VLPs do que na água potável. E o resultado da MET, corroborando com análise metagenômica, mostrou que em ambas amostras haviam mais partículas semelhantes a bacteriófagos.

Outra técnica independente de cultivo que foi utilizada para análise da diversidade viral em amostras ambientais é a eletroforese em campo pulsado (PFGE). Esta permite a separação de pequenas moléculas de DNA de maneira dependente de tamanho, mas que tem um mecanismo de separação que permite a mobilidade de grandes moléculas de DNA (STEWART, 2001). O estudo realizado por Dêz (2000) teve como objetivo explorar a diversidade viral estudando o tamanho de genomas de vírus em diferentes lagoas. Foi feita coleta de amostra de seis pontos, em três lagoas. A enumeração viral foi feita por MET e avaliação da diversidade viral por meio da técnica de PFGE. Os resultados mostraram diferença no padrão de bandas obtido para cada lagoa amostrada e que o número de bandas observados entre os pontos variou de um a oito, além de ter revelado que o tamanho das moléculas de DNA viral variaram entre 25 e 300kb, mostrando assim que a técnica de eletroforese em campo pulsante foi útil para estudar a composição viral de ambientes aquáticos.

Williamson e colaboradores (2005) realizaram o primeiro trabalho que avaliou a abundância e diversidade viral em amostras de solo do estado de Delaware (EUA). Foram coletadas seis amostras, sendo duas de área de cultivo de milho, e quatro de áreas de florestas.

A abundância foi analisada por microscopia de epifluorescência, enquanto a diversidade foi analisada por MET. Os resultados mostraram que os bacteriófagos foram os tipos virais mais observados na MET, apresentando capsídeos de diferentes tamanhos e morfologias, principalmente nas amostras de floresta. Além disso, os solos de floresta apresentaram maior abundância viral do que as amostras de solo de cultivo agrícola. Estes resultados mostraram que o uso da terra influencia na abundância e diversidade viral no solo.

Em 2013, Srinivasiah e colaboradores utilizaram a técnica de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) para detectarem mudanças na comunidade viral entre três solos amostrados. Após análise do padrão de bandas formado, evidenciou-se diferentes padrões entre os três pontos amostrados, mostrando que a técnica de RAPD, além de barata, foi eficaz na análise comparativa da comunidade viral das amostras de solo.

3 Referências

ARAÚJO, E. A. DE et al. Impacto da conversão floresta - pastagem nos estoques e na dinâmica do carbono e substâncias húmicas do solo no bioma Amazônico. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 1, p. 103–114, 2011.

BENDING, G. D.; TURNER, M. K.; JONES, J. E. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 1073–1082, 2002.

BODELIER, P. L. E. Toward understanding, managing, and protecting microbial ecosystems. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. APR, p. 1–8, 2011.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2647–2653, 1997.

BREITBART, M.; ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 278–284, 2005.

CAMPOS, M. C. C. et al. Caracterização física e química de terras pretas arqueológicas e de solos não antropogênicos na região de Manicoré, Amazonas. **Revista Agro@mbiente**, v. 6, n. 2, p. 102–109, 2012.

CANCHAYA, C. et al. Phage as agents of lateral gene transfer. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 417–424, 2003.

CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 907–916, 2009.

CHEN, J.-H. the Combined Use of Chemical and Organic Fertilizers and/or Biofertilizer for Crop Growth and Soil Fertility. **International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use**, n. October, p. 1–11, 2006.

CHEN, L. et al. Effect of different long-term fertilization regimes on the viral community in

an agricultural soil of Southern China. **European Journal of Soil Biology**, v. 62, p. 121–126, 2014.

COLOMBET, J.; SIME-NGANDO, T. Use of PEG, Polyethylene glycol, to characterize the diversity of environmental viruses. **Microbial Ecology**, v. 58, p. 728-736, 2012.

DÍEZ, D. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of virus assemblages present in a hypersaline environment. **International Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 159–164, 2000.

DRENOVSKY, R. E. et al. Soil water content and organic carbon availability are major determinants of soil microbial community composition. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 3, p. 424–430, 2004.

ESPINOZA VILLAR, J. C. et al. Spatio-temporal rainfall variability in the Amazon basin countries (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador). **International Journal of Climatology**, v. 29, p. 1574–1594, 2009.

FEARNSIDE, P. M. Amazonian deforestation and global warming: carbon stocks in vegetation replacing Brazil's Amazon forest. **Forest Ecology and Management**, v. 80, n. 1-3, p. 21–34, 1996.

FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia brasileira: história, índices e conseqüências. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 113-123, 2005.

FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 108, n. 1-2, p. 147–166, 1998.

FRAMPTON, R. A. et al. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2216–2228, 2014.

GABRIEL, J. Development of soil microbiology methods: From respirometry to molecular approaches. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 12, p. 1289–1297, 2010.

GALFORD, G. L. et al. Greenhouse gas emissions from alternative futures of deforestation

and agricultural management in the southern Amazon. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 46, p. 19649–19654, 2010.

GRAÇA, P. M. L. A.; FEARNSTIDE, P. M.; CERRI, C. C. Burning of Amazonian forest in Ariquemes, Rondonia, Brazil: Biomass, charcoal formation and burning efficiency. **Forest Ecology and Management**, v. 120, n. 1, p. 179–191, 1999.

GEEA: Grupo de Estudos Estratégicos Amazônicos / Organizadores: Adalberto Luis Val, Geraldo Mendes dos Santos. --- Manaus; **Editora INPA**, v.4, 2011.

HAMAOU, G. S. et al. Land-use change drives abundance and community structure alterations of thaumarchaeal ammonia oxidizers in tropical rainforest soils in Rondônia, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 48–56, 2016.

HAMZA, I. A. et al. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v. 43, n. 10, p. 2657–2668, 2009.

HATTENSCHWILER, S.; TIUNOV, A.; SCHEU, S. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. **Annual Review of Ecology and Evolution**, v. 36, n. 2005, p. 191–218, 2005.

HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 878–887, 2010.

IKNER, Luisa A.; GERBA, Charles P.; BRIGHT, Kelly R. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. **Food and environmental virology**, v. 4, n. 2, p. 41-67, 2012.

Instituto De Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA). Amazônia legal. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&id=2154:catid=28&Itemid=23> acessado em: 10/10/2015.

JAIN, R. et al. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 10, p. 1598–1602, 2003.

JANGID, K. et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2843–2853, 2008.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033-9, Mar 2002.

KAZAZ, S.; ERBA, S. BAYDAR, H. Breaking seed dormancy in oil rose (*Rosa damascena* Mill) by microbial inoculation. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6503–6508, 2010.

KIM, Y. et al. Metagenomic Investigation of Viral Communities in Ballast Water. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 14, p. 8396–8407, 2015.

DE MIRANDA, E. E.; MATTOS, C. Brazilian rain forest colonization and biodiversity. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 40, n. 1-4, p. 275–296, 1992.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: The challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497–505, 2010.

DE MORAES, J. F., VOLKOFF, B. C. C. C., CERRI, C. C., & BERNOUX, M. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondônia, Brazil. **Geoderma**, v.70, n.1, p.63-81, 1996.

MOREIRA, A.; FAGERIA, N. K. Soil Chemical Attributes of Amazonas State, Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 40, n. 17-18, p. 2912–2925, 2009.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.

NAVARRETE, A. A. et al. Land-Use Systems Affect Archaeal Community Structure and Functional Diversity in Western Amazon Soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 1, p. 1527–1540, 2011.

NEVES JUNIOR, A. F. et al. Sistemas de manejo do solo na recuperação de uma pastagem degradada em rondônia. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 37, n. 1, p. 232–241,

2013.

NZIGUHEBA, G. et al. Soil phosphorus fractions and adsorption as affected by organic and inorganic sources. **Plant and Soil**, v. 198, p. 159–168, 1998.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299–304, 2000.

OWENS, J.; HODGSON, K.R. Bacteriophages from Farm to Fork: The Varied and Potential Roles of Bacteriophages in the Production of food from animal sources. In book: Bacteriophages: biology, applications and role in health and disease/Editors, Clark Denton and Richard J. Crosby. **Denton C. and Crosby RJ, NY: NOVA Biomedical Publications**, p. 1-26, 2013.

PAULA, F. S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular ecology**, v. 23, n. 12, p. 2988-2999, 2014.

PENADÉS, J. et al. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 171–178, 2015.

PEREIRA, J. L. G. et al. Métricas da paisagem na caracterização da evolução da ocupação da Amazônia. **Geografia**, v. 26, n. 1, p. 59–90, 2016.

PII, Y. et al. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403–415, 2015.

RAISON, R. J. Modification of the soil environment by vegetation fires, with particular reference to nitrogen transformations: A review. **Plant and Soil**, v. 51, n. 1, p. 73–108, 1979.

ROHWER, F. Global phage diversity. **Nature**, v. 113, p. 2003–2003, 2003.

ROHWER, F.; PRANGISHVILI, D.; LINDELL, D. Roles of viruses in the environment. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2771–2774, 2009.

ROHWER, F.; THURBER, R. V. Viruses manipulate the marine environment. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 207–212, 2009.

ROSARIO, K. et al. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2806–2820, 2009.

ROUSK, J. et al. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **ISME journal**, v. 4, n. 10, p. 1340–1351, 2010.

SANO, E. et al. Movement of viruses between biomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5842–5846, 2004.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 98, n. 1-3, p. 255–262, 2003.

DA SILVA, J. et al. The fate of the Amazonian areas of endemism. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 689-694, 2005.

DE SOUZA BRAZ, A M.; FERNANDES, A R.; ALLEONI, L. R. F. Soil Attributes After the Conversion From Forest To Pasture in Amazon. **Land Degradation & Development**, v. 24, n. 1, p. 33–38, 2013.

SPRICIGO, D. A. et al. Use of a bacteriophage cocktail to control Salmonella in food and the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 2, p. 169–174, 2013.

SRINIVASIAH, S. et al. Direct assessment of viral diversity in soils by random PCR amplification of polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5450–5457, 2013.

STEWART, G. F. Fingerprinting Viral Assemblages by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). **Molecular Biology Problem Solver**, v. 30, p. 1–15, 2001.

TISDALL, J. M. Possible Role of Soil-Microorganisms in Aggregation in Soils. **Plant And Soil**, v. 159, n. 1, p. 115–121, 1994.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. The unseen majority: Soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, n. 3, p. 296–310, 2008.

VOS, M. et al. Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil. **Science**, v. 325, n. 5942, p. 833, 2009.

WILLIAMSON, K. E.; RADOSEVICH, M.; WOMMACK, K. E. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3119–3125, 2005.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Acessar a diversidade viral em amostras de solo de pastagem e floresta da bacia do Rio Mutumparaná – Rondônia, bem como padronização de metodologias para a obtenção de concentrados virais para estudos de diversidade em amostras de solo, e avaliar o efeito de diferentes tipos de fertilização sobre a diversidade viral em áreas de cultivo agrícola.

4.2 Objetivos específicos

- Padronizar metodologias de concentração viral de amostras de solo para o estudos de diversidade viral;
- Avaliar o efeito de diferentes tipos de fertilização sobre a diversidade viral em amostras de solo de cultivo agrícola;
- Caracterizar morfológicamente a diversidade viral presente nas amostras de solo de floresta e pastagem por meio de TEM;
- Acessar à diversidade viral presente nas amostras de solo de floresta e pastagem por meio de metodologias independente de cultivo, como RAPD e sequenciamento de próxima geração.

5 Apresentação da dissertação

Este trabalho teve como principal objetivo fazer o estudo de diversidade viral em amostras de solo por meio de técnicas independentes de cultivo de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e sequenciamento de nova geração. Este trabalho fez também a padronização de metodologia de concentração viral para o estudo da diversidade, selecionando três técnicas comumente utilizadas para concentrar vírus.

No **Capítulo 1** é realizado o estudo de diversidade viral em solo de cultivo agrícola utilizando diferentes técnicas de concentração, sendo i) membrana carregada negativamente HA, ii) polietilenoglicol, e iii) ultracentrifugação para acessar as partículas virais. A eficiência dessas três técnicas é avaliada por meio de RAPD e MET.

No **Capítulo 2** é feita a comparação da diversidade viral em amostras de cultivo agrícola de milho submetidas a diferentes tipos de fertilização, sendo i) adubo químico, ii) adubo químico e orgânico e iii) adubo orgânico. A diversidade foi analisada por meio de RAPD e MET.

No **Capítulo 3** é feito o estudo de diversidade viral em amostras de solo de pastagem e floresta da região amazônica, por meio de sequenciamento do metagenoma, e por meio de MET.

CAPÍTULO 1

DETERMINATION OF VIRAL CONCENTRATION METHODS FOR DIVERSITY STUDY IN SOIL SAMPLES

Aneli E. Abe, Roberto S. Dias, Sérgio O. de Paula, Cynthia C. da
Silva

DETERMINATION OF VIRAL CONCENTRATION METHODS FOR DIVERSITY
STUDY IN SOIL SAMPLES

Aneli Eiko Abe¹, Roberto Sousa Dias², Sérgio Oliveira de Paula³, Cynthia Canedo da
Silva⁴

¹Department of Microbiology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
abe.aneli@gmail.com

²Department of Microbiology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
roberto.dias@ufv.br

³Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
depaula@ufv.br

⁴Department of Microbiology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
ccanedo@ufv.br

*Corresponding author email: ccanedo@ufv.br

Abstract

Soil is the biggest *reservoir* of microorganisms, which are the main responsible for the biogeochemical cycles, as well as organic compounds degradation and plant nutrient supply. Among all microorganisms present in soil are the viruses, which influence activity and ecology of other populations in the environment. As bacteria is the most common host of viruses in soil, most virus like particles (VLPs) are considered as bacteriophages. As they can act in activity and ecology of bacteria, they can also take influence in bacteria evolution by transduction, a mechanism of horizontal gene transfer in which the bacteriophage transfers DNA from a bacteria to another. Although viruses are the most abundant among all microorganisms and have great importance in the environment, viral diversity is not well explored in soil. Seen that, the aim of this study was to determine the best concentration method for study of viral diversity. For that, three concentration methods commonly used for viral study were selected and adapted to viral concentration of soil samples. HA negatively charged membrane, polyethylene glycol (PEG) and ultracentrifugation were used and viral diversity was evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and transmission electron microscopy (TEM). Among all concentration methods, HA membrane showed better results recovering more VLPs morphotypes and as well as ultracentrifugation, it

recovered viral particles over 100 nm, while PEG recovered smaller particles. RAPD and TEM analysis showed to be effective methods for study of viral diversity.

1 Introduction

Soil is responsible for acting in plant productivity in terrestrial ecosystems, in biogeochemical cycle maintenance, degrading organic compounds, including xenobiotic compounds (NANNIPIERI et al., 2003). It also represents the main source of microorganisms in the planet (MOCALI & BENEDETTI, 2010). The viral group is the most abundant, and can be found not only in the soil, but also in all environments (ROHWER et al, 2009; BREITBART & ROHWER, 2005). Due to evolution, those microorganisms are able to move through a variety of chemical environments (DOUGLAS & YOUNG, 2006), adapting to different conditions.

The presence of viruses in the soil is important as they can act in the activity and ecology of populations like bacteria (SRINIVASIAH et al, 2013), since most of the virus like particles (VLPs) found in the environment are considered bacteriophages (BREITBART & ROHWER, 2005). As bacteriophages can be found naturally in the soil environment, they may act in biological control of phytopatogenic bacteria, once plant diseases caused by bacteria cause an economic and agricultural production impact (JONES et al., 2007). Besides that, by their infectious cycle, they can act in bacteria evolution by horizontal gene transfer, in which the bacteriophage inject new genetic material in the bacteria that was acquired from other bacteria, the donor (OCHMAN et al., 2000). After that, the receptor bacteria acquire new genes that can be required to adapt them to a new environment (JAIN et al., 2003). Although the study of viruses have been important for their characterization in the environment, little is known about their diversity and identity (BREITBART & ROHWER, 2005).

In order recover more virus particles from the samples, different methods are used, being the first techniques used to study viruses that infect humans, animals and plants (COLOMBET & SIME-NGANDO, 2012). Many studies have used polyethylene glycol

(PEG) (SHIEH *et al.*, 1999; COLOMBET e SIME-NGANDO, 2012; SÁNCHEZ *et al.*, 2012; KITTIGUL *et al.*, 2015), which is a polymer that in the presence of monovalent salts induce interactions that crystallize both biological molecules such as DNA, and viral particles in spaces between PEG molecules, precipitating and concentrating them (COLOMBET & SIME-NGANDO, 2012).

Other methods have been used to concentrate viral particles like the negatively charged membrane HA (SHIELDS *et al.*, 1986; KATAYAMA *et al.*, 2002; HAMZA *et al.*, 2009 CASHDOLLAR & WYMER, 2013; DE KEUCKELAERE *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014). In this case, the presence of salts like MgCl₂ or acidification of the viral suspension make the viral particles become positively charged (KATAYAMA *et al.*, 2002), which influence the adsorption of the virus in the membrane (HAMZA *et al.*, 2009), and after elution in lower volume of solution, get the viral particles concentrated.

Other method commonly used to concentrate virus is the ultracentrifugation (BARTOLOMÉ *et al.*, 2007; FUMIAN *et al.*, 2010; NORDGREN *et al.*, 2009), in which particles migrate through a viscous solution until they reach the solution's density range equivalent to the particles' density (AMMERSBACH & BIENZLE, 2011).

There is no concentration method determined for study of viruses in soil samples, the goal of this study was to evaluate three methods of viral concentration to determine which one is more effective in exploring viral diversity in soil samples.

2 Material and Methods

Three methods for concentration of VLPs were selected in order to evaluate viral diversity in a soil sample. Molecular Analysis by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), and Morphological Analysis of particles were made to evaluate diversity and efficiency of the viral concentration methods.

2.1 Sample collection

A soil sample collection was made in the Universidade Federal de Viçosa, in a pumpkin culture area (20°45'25,6"S; 42°50'47,1"W). Three subsamples were collected with depth of 0 to 20 cm in order to make a composite sample. Each subsample was stored on ice

and transported to the laboratory, where they were mixed and put in the fridge at 4 °C for future analysis.

2.2 Sample processing

Five grams of soil sample were agitated for 4 h in 50 mL of phosphate buffered saline (PBS) to disaggregate the soil particles and access to microorganisms. To separate the solid part of the soil and the suspension of microorganisms, it was centrifuged at 1.500 xg for 10 minutes. The aqueous phase was recovered for the viral concentration.

2.3 Viral concentration

2.3.1 Negatively-charged membrane HA

For the viral concentration with negatively charged membrane, Katayama et al. (2002) method was used with modifications. The HA membrane (Ideal Lab, Brazil) with 0,45 µm of pore size and 142 mm of diameter was put in the vacuum filter flask. Fifty milliliters of sample suspension were used for viral concentration, in which was added MgCl₂ 25 mM, and then it was filtered in the vacuum filter. The viral particles were adsorbed on the membrane, which was rinsed with 350 mL of H₂SO₄ (0.5 mM; pH 3,0) to rinse out the cations. The membrane was put into a plate with 10 mL of NaOH for ten minutes in rotation speed of 60 rpm. The pH was neutralized with 50 µL of H₂SO₄ 50 mM and TE (Tris-EDTA) 100 X. After agitation, the viral suspension was filtered in the Vivaspin 20 100 KDa (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) centrifuged at 1.500 g, for ten minutes at 4 °C. The final volume recovered was 1 mL, that was transferred to a microtube of 1.5 mL. In order to get higher viral concentration, it was used the *SpeedVac DNA concentrator* (miVac, England) until it got to final volume of 500 µL.

2.3.2 Polyethylene Glycol (PEG)

For the concentration with PEG (Sigma-Aldrich, Germany) (COLOMBET et al., 2007), 50 mL of the suspension was filtered in 0.22 μ M membrane (FilterPro, China). The recovered suspension was put into a 50 mL tube, and then the PEG 8000 (final concentration of 10%) and NaCl (final concentration of 0,6%) was added. It was incubated for ten hours in the dark at 4 °C. After incubation, it was centrifuged at 8.000 g for 20 minutes at 4 °C in order to precipitate the PEG and viral particles. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended with 1 mL of SM buffer (5.8g of NaCl, 2.0 g of MgSO₄.7H₂O, 50 mL of Tris-HCl 1M, pH 7.5, 5 mL of gelatin 2 % and H₂O q.s 1 L). The content was transferred into a 1.5 mL tube and KCl 1 M was added to it in order to disconnect the viruses from the PEG molecules. It was incubated on ice for 20 minutes and after centrifugation at 12,000 g for ten minutes at 4 °C the PEG molecules precipitated. The supernatant was recovered and transferred into another 1.5 mL tube. In order to get higher concentration, it was used the *SpeedVac DNA concentrator* (miVac, Inglaterra) until it got to final volume of 500 μ L.

2.3.3 Ultracentrifugation

For the ultracentrifugation method of concentration it was used the Peyret (2015) protocol with modification. Before concentration, the suspension was filtered in 0,22 μ M membrane (FilterPro, China) to get only viral particles. Sucrose gradient of 25 % and 70 % was used, 1 mL of the sucrose 70% was added into a *PA ultracrimp tube* (Thermo Fisher Scientific, USA) and then 1 mL of sucrose 25% was added. Five mL of the suspension was added and after sealing the tube, it was centrifuged at 274.000 g for 3 h at 4 °C. The phase between the sucrose 25 % and sucrose 70% was recovered and then the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 mL of SM buffer. The content was transferred into a 1,5 mL tube and concentrated in *SpeedVac DNA concentrator* (miVac, England) to have 500 μ L of final volume.

2.4 Viral DNA extraction

After viral concentration using the three methods, 10 μL was separated for Transmission Electron Microscopy (TEM) and the other 490 μL was used for DNA extraction.

Viral DNA extraction used the Sambrook and Russel (2001) protocol. It was added Proteinase K (final concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and dodecyl sulfate sodium (SDS) (final concentration of 0.5%). The tube was gently poured to mix the solution and then incubated at 56 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h. For DNA purification it was added equal volume of equilibrated phenol (Sigma-Aldrich, Inc., USA) and the tube was poured to form an emulsion. After centrifugation at 3000 $\times g$ for 5 minutes, the aqueous phase was recovered and transferred to a new 1.5 mL tube. It was added equilibrated phenol and chloroform (1:1). The tube was poured to mix the content and after centrifugation at 3000 $\times g$ for 5 minutes, the aqueous phase was recovered and transferred into a new tube for another centrifugation at 3000 $\times g$ for 5 minutes with equal volume of chloroform. The aqueous phase was recovered and put into a new tube and it was added to it two volumes of 100 % cold ethanol. The tube was incubated for 30 minutes in the freezer for DNA precipitation and centrifuged at 14.000 $\times g$ for 20 minutes, the supernatant was discarded and the DNA was resuspended with 50 μL of water ultrapure. The DNA was quantified using NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA).

2.5 Molecular characterization

2.5.1 RAPD

The oligonucleotide **RAPD5** 5' AACGCGCAAC 3', **OPL5** 5' ACGCAGGCAC 3' and **P2** 5' AACGGGCAGA 3' (GUTIERREZ et al., 2011) were used in the reaction. The final volume of each reaction was 20 μL , in which was added 30 ng of DNA, buffer 1X; 0.2 mM dNTP; 8.0 μM of each primer; 1.25 u Taq polymerase; 3 mM MgCl_2 . The program performed under the following conditions: four cycles at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 45 s, 30 $^{\circ}\text{C}$ for 120 s and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 60 s; 26 cycles at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 5 s, 36 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s (the extension step was increased by 1 s for every new cycle); and a final step of 10 min at 75 $^{\circ}\text{C}$. The PCR

productions were observed in 1 % agarose gel stained with 1 % GelRed. The molecular weight marker used was LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp, Canada) and 100 bp DNA ladder RTU (Ready-to-Use) (KASVI, Brazil). It was observed in the QUANTUM ST4-3000 (Biotech, Canadá) under UV light.

2.6 Morphological characterization

2.6.1 TEM

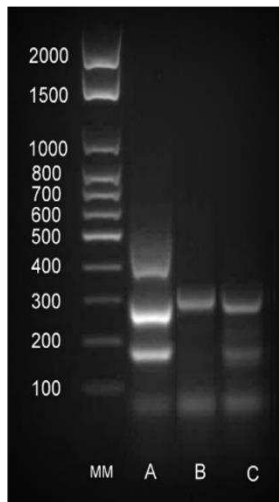
Viral morphological diversity and the sample quality after concentration were analyzed by transmission electron microscopy using the microscope Zeiss EM 109 TEM performing at 80 kV. Grids with 200 mesh (Electron Microscopy Science, Hatfield, Pensilvania, USA) were used covered with FormVar[®]. Ten microliters of the viral concentrated were put in the grid for 5 minutes. The excess of liquid was absorbed using filter paper. The viral particles were stained with 2 % uranyl acetate for 20 seconds and then it was observed in microscopy.

3 Results

3.1 RAPD

The DNA band pattern obtained after gel electrophoresis showed that the range of the fragments size were between 100 bp to 1500 bp (Figure 1, 2 and 3). Fingerprints generated after reaction with each viral concentration method showed different band pattern with all primers used (Figure 1, 2 and 3). The amplicon number varied from 1 to 10 and fingerprints formed using RAPD5 primer had less bands (Figure 1, 2 and 3).

(a)



(b)

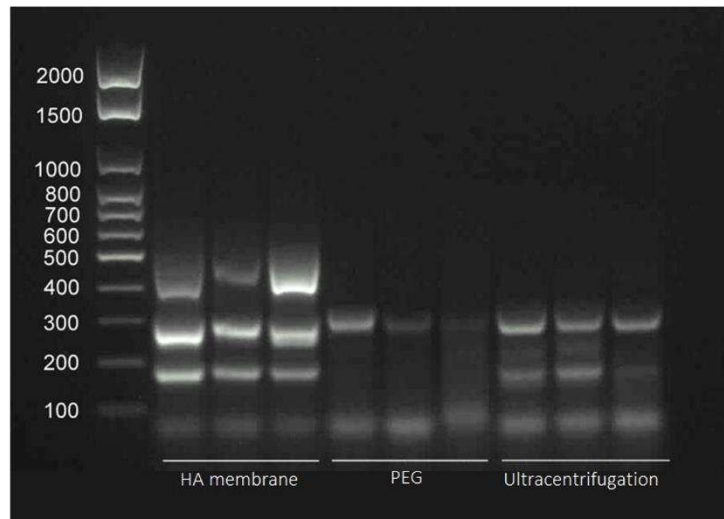


Figure 1. Band patterns obtained from RAPD reaction using RAPD5 primer. (a) Fingerprints formed after concentration with (A) negatively charged membrane HA; (B) PEG and (C) ultracentrifugation, using the same soil sample. (b) Reproducibility of RAPD fingerprints. LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp, Canada).

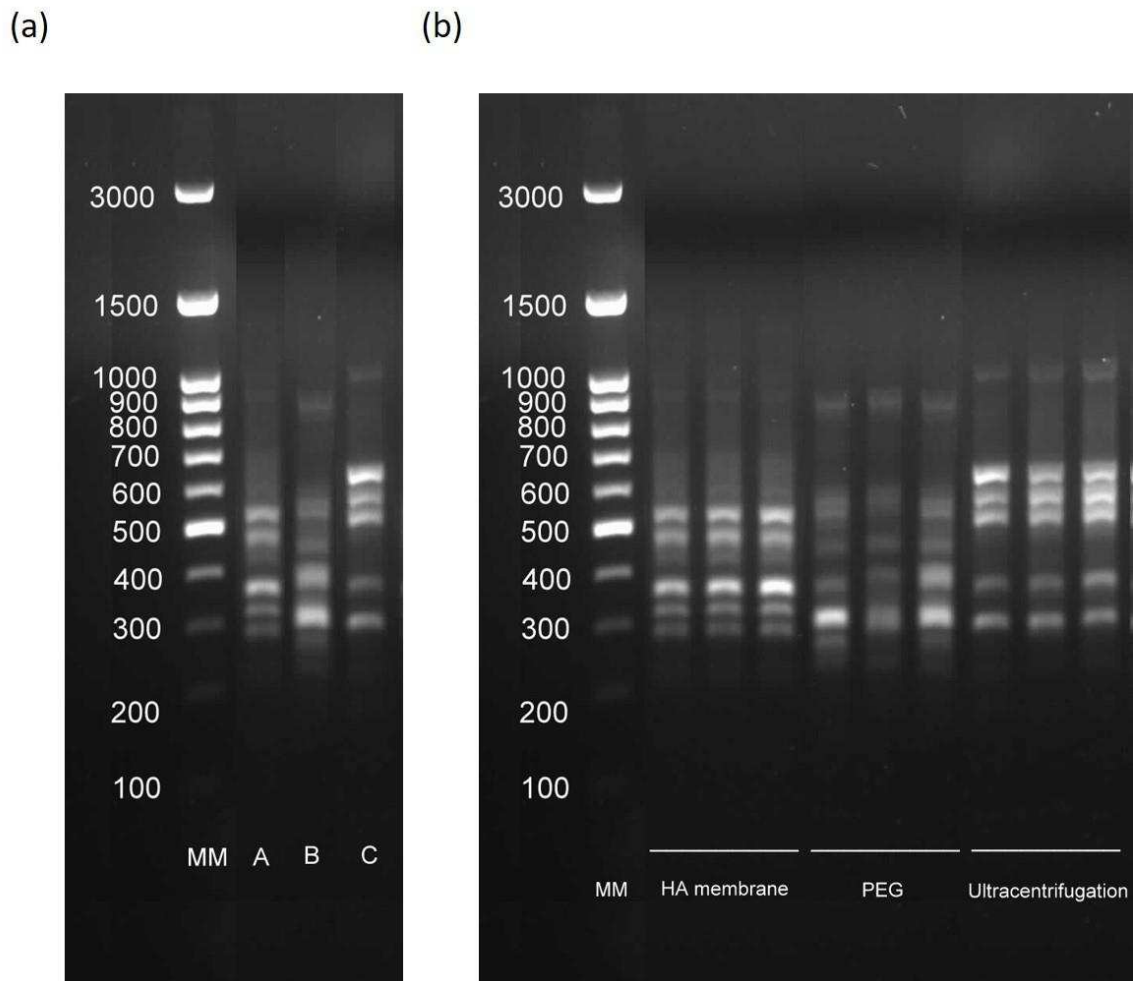


Figure 2. Band patterns obtained from RAPD reaction using OPL5 primer. (a) Fingerprints formed after concentration with (A) negatively charged membrane HA; (B) PEG and (C) ultracentrifugation, using the same soil sample. (b) Reproducibility of RAPD fingerprints. 100 bp DNA ladder RTU (Ready-to-Use) (KASVI, Brazil).

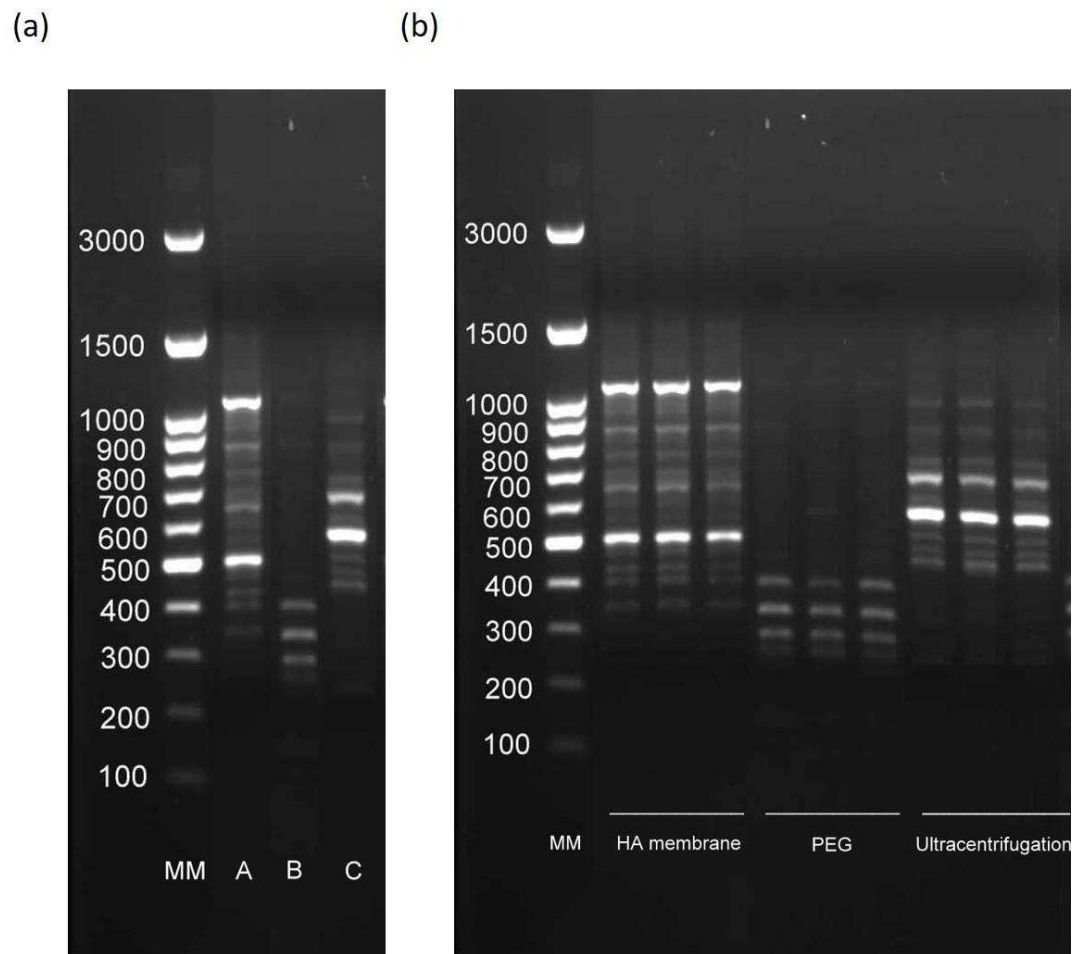


Figure 3. Band patterns obtained from RAPD reaction using P2 primer. (a) Fingerprints formed after concentration with (A) negatively charged membrane HA; (B) PEG and (C) ultracentrifugation, using the same soil sample. (b) Reproducibility of RAPD fingerprints. 100 bp DNA ladder RTU (Ready-to-Use) (KASVI, Brazil).

3.2 Morphological diversity

The morphological analysis was performed after viral concentration using the three methods, HA membrane; PEG and ultracentrifugation, following negative staining with 2 % uranyl acetate (Figure 4, 5 and 6). Despite all steps for observation under the microscope were done equally with all samples, different viral morphotypes was verified, such as filamentous, spherical, icosahedral and pleomorphic particles. Viruses size varied from 50 nm to 516 nm. The viral diversity using HA membrane had the most different morphologies among three methods analyzed (Figure 4). Filamentous and giant viruses could only be seen in sample concentrated with HA membrane and by ultracentrifugation. In PEG concentration were observed the same type of morphological viruses (Figure 5a).

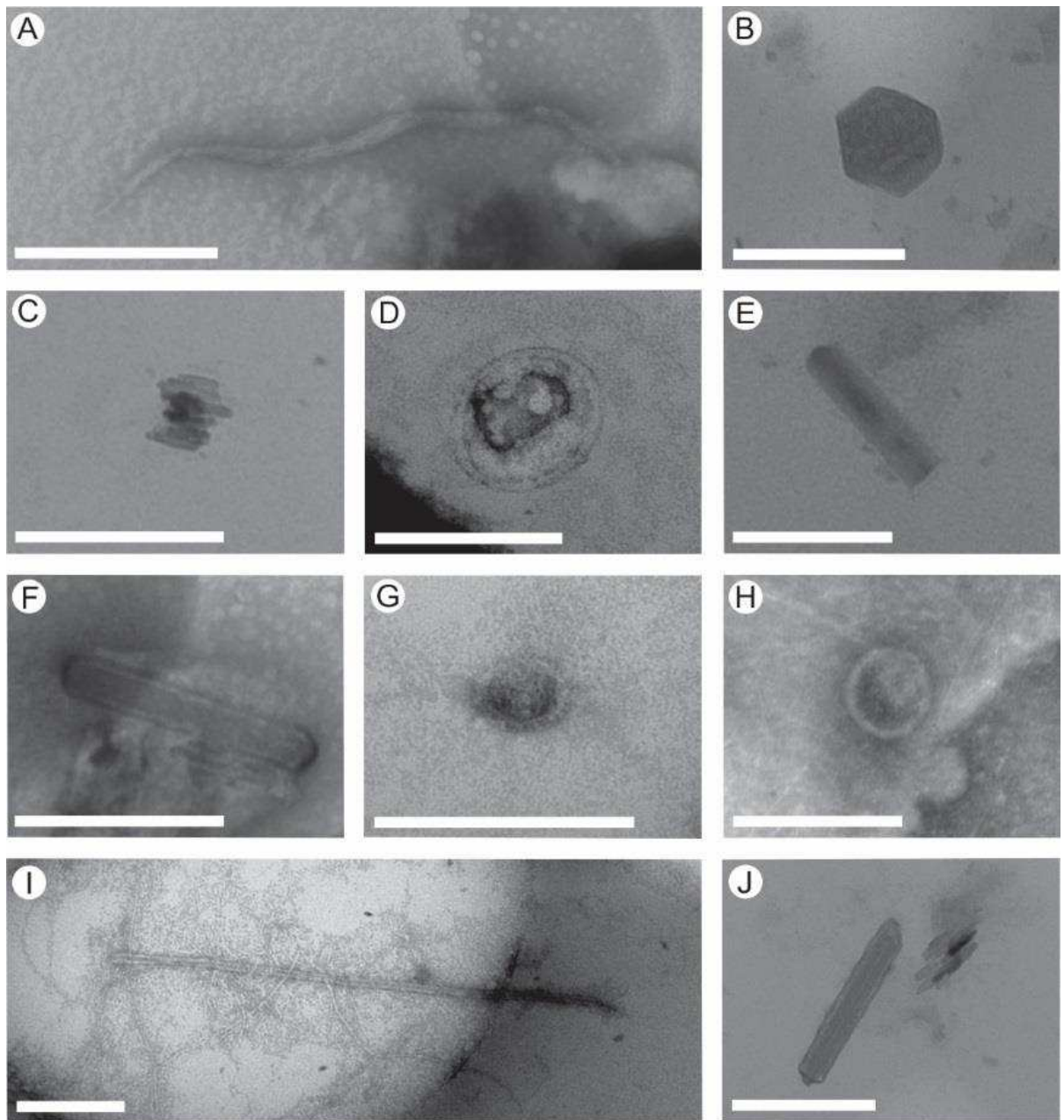


Figure 4. Transmission electron micrographs of viruses after concentration with HA membrane. Morphology: (A) filamentous virus; (B) icosahedral virus; (C) undefined; (D) spherical virus; (E) filamentous virus; (F) rod-shaped virus; (G) spherical virus; (H) spherical virus; (I) filamentous virus; (J) filamentous virus. Scale bar: (A) 200 nm; (B) 200 nm; (C) 200 nm; (D) 200 nm; (E) 100 nm; (F) 200 nm; (G) 200 nm; (H) 100 nm; (I) 200 nm; (J) 200 nm.

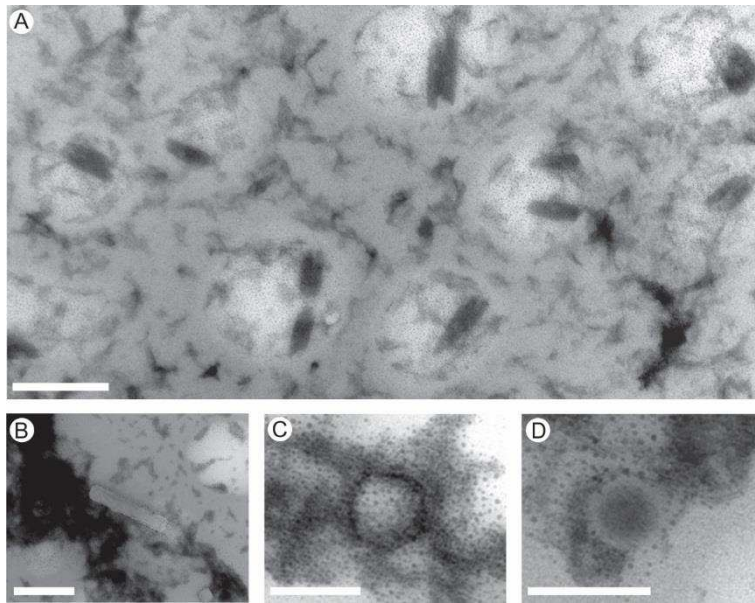


Figure 5. Transmission electron micrographs of viruses after concentration with PEG. Morphology: (A) undefined; (B) rod-shaped virus; (C) spherical virus; (D) spherical virus. Scale bar: (A) 200 nm; (B) 100 nm; (C) 100 nm; (D) 100 nm.

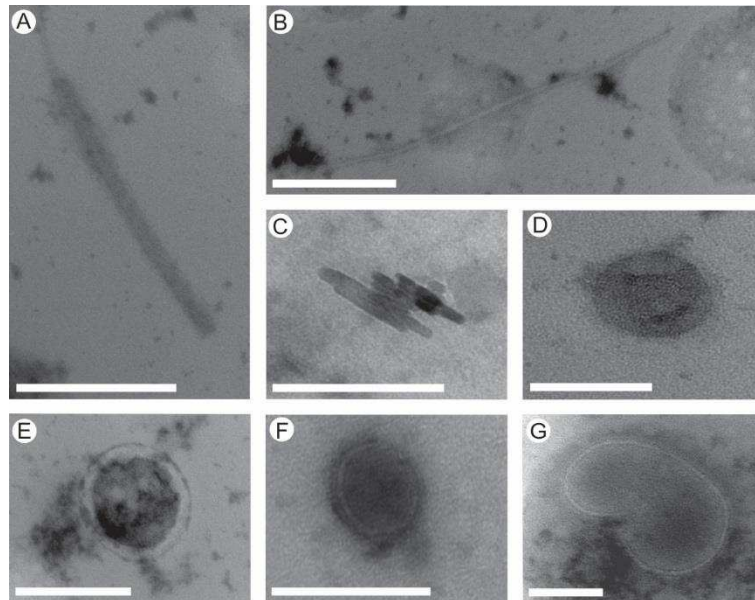


Figure 6. Transmission electron micrographs of viruses after concentration by ultracentrifugation. Morphology: (A) filamentous virus; (B) filamentous virus; (C) undefined; (D) spherical virus; (E) spherical virus; (F) spherical virus; (G) pleomorphic virus. Scale bar: (A) 200 nm; (B) 200 nm; (C) 100 nm; (D) 100 nm; (E) 200 nm; (F) 100 nm; (G) 100 nm.

3.3 Quality

The sample quality after viral concentration was observed by transmission electron microscopy and it showed that the sample concentrated with HA membrane had less background than the others (Figure 7). The one concentrated with PEG had the most background (Figure 7).

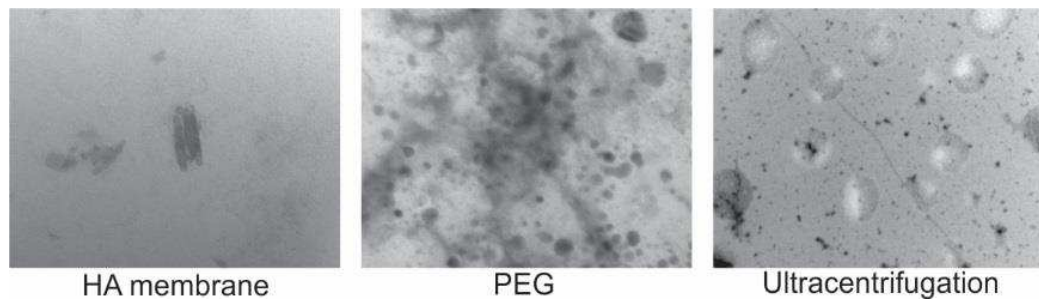


Figure 7. Transmission electron micrographs of samples after concentration showing the difference in the sample backgrounds.

4 Discussion

Once there is no concentration method determined for access of viral diversity in soil samples, the aim of this study was to evaluate three different methods of viral concentration for diversity study, that was accessed by RAPD and TEM.

Morphological analysis showed that among the three methods used, HA membrane verified more different morphotypes and this viral concentration method also showed to be able to recover more viral particles over 100 nm size. PEG concentration privileged the recovery of certain types of viruses by showing an abundance of a specific morphotype of virus and the presence of smaller VLPs (Virus-like Particle). In ultracentrifugation, the morphology by the electron micrographs results showed different viral morphotypes,

showing that it was possible to recover larger viral particles as concentration with HA membrane.

In relation to sample quality after concentration, HA membrane had the morphological observation easier because it had less background than the others. As it was seen by TEM, before ultracentrifugation some soil particles were able to pass through the 0.22 μM filter and ultracentrifugation precipitated soil particles as well, once precipitation depends on density and size of the molecules (IKNER et al., 2012). PEG concentration showed most background among all methods used, probably because PEG molecules remained in the sample after concentration and made it difficult to observe in the microscope.

Although the same soil was used to concentrate viral particles by the three techniques, molecular characterization by RAPD was able to capture changes in the viral recovery of the different methods of concentration, which was also observed in morphological characterization.

Lower concentration of DNA from sample concentrated with PEG was observed after extraction and it can be explained for some hypothesis. Maybe PEG molecules remained in the concentrated viral sample and this can have impaired the DNA extraction once it cristallize these molecules (COLOMBET & SIME-NGANDO, 2012). Besides that, presence of PEG may impair the RAPD reaction by contact with the DNA molecules, changing its shape (ZINCHENKO & YOSHIKAWA, 2005).

The cost and facility to concentrate using those methods considering the beginning of the process until the end, including equipments is also evaluated. Counting on the price of the equipments needed to perform each concentration method, the membrane has the lowest final price from the beginning to the end of the process, and it is also a faster method among the three methods, as it does not need time of incubation and a refrigerator as PEG does. Ultracentrifugation has not only the highest price, but it is also important to highlight that the ultracentrifugation tubes may not be reusable depending on which one is used, and ultracentrifugation also needs a ultracentrifuge to perform. Besides that, ultracentrifugation has the number and volume of samples limited by the ultracentrifuge and the tubes.

5 Conclusion

- TEM analysis showed that HA membrane concentration is the best concentration method among all selected methods, with less background in the electron micrographs, and also for recovering more different morphotypes and larger viruses. It is possible to see PEG molecules in the electron micrographs and soil particles in the sample concentrated by ultracentrifugation.
- RAPD was an efficient technique to evaluate molecular differences in viral recovery in soil samples after concentration.
- Even though PEG is widely used to concentrate viruses from different samples in studies of viral diversity, this method is not the best option, because the presence of PEG in the sample after concentration may impair both DNA extraction and molecular analysis.
- In relation costs and facility, HA membrane showed to be the simplest and cheapest way to concentrate virus from soil samples, which can concentrate lots of samples in less time and is able recover more different viral particles than the other methods tested.

6 Acknowledgments

The authors are grateful CNPq, CAPES and FAPEMIG for the financial support.

7 References

AMMERSBACH, M.; BIENZLE, D. Methods for assessing feline immunodeficiency virus infection, infectivity and purification. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 143, n. 3, p. 202-214, 2011.

BARTOLOMÉ, J. et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. **Journal of virology**, v. 81, n. 14, p. 7710–7715, 2007.

BREITBART, M.; ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 278–284, 2005.

CASHDOLLAR, J. L.; WYMER, L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: A review and meta-analysis of recent studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 1–11, 2013.

COLOMBET, J. et al. Virioplankton “pegylation”: Use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 3, p. 212–219, 2007.

COLOMBET, J.; SIME-NGANDO, T. Use of PEG , Polyethylene glycol , to characterize the diversity of environmental viruses. **Current Microscopy Contributions To Advances in Science and Technology**, p. 316–322, 2012.

DOUGLAS, T.; YOUNG, M. Viruses: Making Friends with Old Foes. **Science**, v. 312, n. 5775, p. 873–876, 2006.

FUMIAN, T. M. et al. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. **Journal of Virological Methods**, v. 170, n. 1-2, p. 42–46, 2010.

GUTIERREZ, D. et al. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. **Federation of European Microbiological Societies Microbiol Lett**, v. 322, n. 1, p. 90-7, Sep 2011.

HAMZA, I. A. et al. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, v. 43, n. 10, p. 2657–2668, 2009.

IKNER, L. A.; GERBA, C. P.; BRIGHT, K. R. Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review. **Food and Environmental Virology**, v. 4, n. 2, p. 41–67, 2012.

JAIN, R. et al. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 10, p. 1598–1602, 2003.

JONES, J. B. et al. Bacteriophages for Plant Disease Control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, n. 1, p. 245–262, 2007.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033-9, Mar 2002.

KITTIGUL, L. et al. A comparison of virus concentration methods for molecular detection and characterization of rotavirus in bivalve shellfish species. **Food Microbiology**, v. 46, p. 161–167, 2015.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: The challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497–505, 2010.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.

NORDGREN, J. et al. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1117–1125, 2009.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299–304, 2000.

PEYRET, H. A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants. **Journal of Virological Methods**, v. 225, p. 59–63, 2015.

ROHWER, F.; PRANGISHVILI, D.; LINDELL, D. Roles of viruses in the environment. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2771–2774, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. New York, NY:, 2001.

SÁNCHEZ, G.; ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R. A single method for recovery and concentration of enteric viruses and bacteria from fresh-cut vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 1-2, p. 9–13, 2012.

SHIEH, Y. C.; CALCI, K. R.; BARIC, R. S. A Method To Detect Low Levels of Enteric Viruses in Contaminated Oysters A Method To Detect Low Levels of Enteric Viruses in Contaminated Oysters. v. 65, n. 11, p. 4709–4714, 1999.

SHIELDS, P. A. I. et al. Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating bacteriophages in water. **Water Research**, v. 20, n. 2, p. 145–151, 1986.

SRINIVASIAH, S. et al. Direct assessment of viral diversity in soils by random PCR amplification of polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5450–5457, 2013.

ZINCHENKO, A. A; YOSHIKAWA, K. Na⁺ shows a markedly higher potential than K⁺ in DNA compaction in a crowded environment. **Biophysical journal**, v. 88, n. 6, p. 4118–4123, 2005.

CAPÍTULO 2

VIRAL DIVERSITY IN SOIL OF AGRICULTURAL AREAS WITH DIFFERENT FERTILIZATION SYSTEMS

Aneli E. Abe, Roberto S. Dias, Sérgio O. de Paula, Cynthia C. da
Silva

VIRAL DIVERSITY IN SOIL OF AGRICULTURAL AREAS WITH DIFFERENT FERTILIZATION SYSTEMS

Aneli Eiko Abe¹, Roberto Sousa Dias², Sérgio Oliveira de Paula³, Cynthia Canedo da Silva⁴

¹Department of Microbiology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. abe.aneli@gmail.com

²Department of Microbiology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. roberto.dias@ufv.br

³Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. depaula@ufv.br

⁴Department of Microbiology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. ccanedo@ufv.br

*Corresponding author email: ccanedo@ufv.br

Abstract

Soil is known to be the main hotspot of microorganisms on the planet. The microorganisms are responsible to act in plant growth promotion, biogeochemical cycles, decomposition of organic matter, even xenobiotic compounds and maintenance of the soil's function. Conversion of land to agricultural areas changes microbial communities, once microorganisms are sensible to environmental disturbances. Different types of fertilization are used in agricultural areas, aiming to have great yields in crop production, but, these also influence in soil microbial. This work aimed to analyze viral diversity under three different regimes of fertilization, being i) inorganic fertilization, ii) organic and inorganic fertilization and iii) organic fertilization, in corn agricultural areas. Organic and inorganic fertilization systems showed more different viral morphotypes among all three types of fertilization. Different tailed viruses were observed only in soil with organic and inorganic fertilization, and soil with organic fertilizer.

1 INTRODUCTION

Soil ecosystems are responsible for acting in plant's productivity, as well as in biogeochemical cycles maintenance (NANNIPIERI et al., 2003). This complex environment holds a lot of microorganisms species, and although just a little part of those microorganisms have been isolated, cultivated and identified, it is known that they have different functions in the soil (ZHANG et al., 2012) to keep the balance in the environment. Besides that, microorganisms have important role in the soil structure, once their presence is important for stability of macro and microaggregates (TISDALL, 1994), which are important for soil's function, once it can take influence in plants and animals (BRONICK & LAL, 2005).

Viruses are among all microorganisms present in soil, which can be found and all environments (ROHWER et al., 2009). They are widely distributed, and their presence is important for maintenance of soil's functions in different ecosystems (CHEN et al., 2014a). Bacteriophages are among those viral groups that can be found in soil, and their presence can take influence directly in activity and ecology of bacteria populations (SRINIVASIAH et al., 2013). They also can act in bacteria evolution through transduction, that occurs when the bacteriophage inserts genetic material in a bacteria, that was obtained from another bacteria (OCHMAN et al., 2000). Thus, the recipient bacteria can acquire new genes that may be needed for living in the new environment (JAIN et al., 2003).

Studies have shown that anthropogenic actions change the local microbial community (CENCIANI et al., 2009; PAULA et al., 2014; PENG et al., 2015) as well as soil properties (MORAES et al., 1996; FEARNSIDE e BARBOSA, 1998; CENCIANI et al., 2009; MOREIRA & FAGERIA, 2009), and it may affect soil resistance and resilience (CHEN et al., 2014a). The soil microorganisms are able to indicate environmental disturbances, once they are sensitive indicators that rapidly respond to changes in its use (SCHLOTER et al., 2003; GARCÍA-ORENES et al., 2013; PAULA et al., 2014).

Soil conversion for agricultural use is a common practice that is considered an activity that alters soil characteristics, biological properties and processes that occur in the soil

(JANGID et al., 2008). Use of fertilizers in those areas help keeping cultures and increases its yield with nutrient applications in right proportions (BARABASZ et al., 2002). Organic fertilizers used in agriculture come mainly from culture residues and animal subproducts (LEE, 2010), that affect root growth, pests incidence, soil physical properties and consequently take influence in nutrient acquisition and plant growth with its different proportions of N, P and K (BURESH et al., 1997). This type of fertilization increases the amount of nutrient available for microorganisms, which increase their activity and consequently soil productivity (LIN et al., 2012). On the other hand, chemical or inorganic fertilizers provide plant nutrients in different forms, in which each element has specific function in plant growth promotion. Studies have shown that both organic and inorganic fertilizers can influence in microorganism activity in soil (BARABASZ et al., 2002; CHEN et al., 2014a, 2014b; GEISSELER; SCOW, 2014; JANNOURA et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

Thus, the goal of this work was to evaluate the viral diversity in three different areas submitted to different types of fertilization: i – inorganic fertilization, ii – inorganic and organic fertilization, iii – organic fertilization. Transmission electron microscopy (TEM) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) were used to analyze viral diversity.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Samples collection

Three different agricultural soil samples were collected from areas located at Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil, **i** – Corn crop (20°46'03,7"S; 42°51'23,2"W), **ii** – Crop rotation of corn and pumpkin in which corn was planted when sample was collected (20°45'25,6"S; 42°50'47,1"W), and **iii** – Corn crop (20°46'09,8"; 42°52'20,6"W). Three subsamples were collected from 0 to 20 cm depth in each site. Each subsample was conditioned in ice and were subsequently mixed and kept in the fridge under refrigeration at 4 ° C for future analysis.

2.2 Sample processing

Five grams of soil sample was put into agitation in Erlenmeyer flask with phosphate buffered saline (PBS) for soil particles disaggregation and get access to the microorganisms present. The separation of the solid part of the soil was made with centrifugation at 1500 g for ten minutes. The aqueous phase was recovered and used for viral concentration.

2.3 Viral concentration

For viral concentration, it was used the negatively charged membrane method (HA membrane) with modifications (Katayama et al., 2002). The HA membrane (45 µm e 142 mm de diameter) (Unifil, Ideal Lab, Brazil) was put in the filtration system and after MgCl₂ 25 mM addition to the sample, the sample was filtered and the viral particles adsorbed to the membrane. The membrane was rinsed with 350 ml of H₂SO₄ (0.5 mM; pH 3.0) in order to elute cations. In a plate was added 10 mL of NaOH (1.0 mM) and then the membrane was put into it, and after agitation for 10 minutes at 60 rpm, pH was neutralized with 50 µL of H₂SO₄ (50 mM) and TE (Tris-EDTA) 100 X. After agitation, viral suspension was put into the Vivaspin 20 (100 Kda) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) and centrifuged at 1500 g for 10 minutes at 4 °C. There was recovered 1 mL, which was transferred to microtubes. In order to have even more concentrated viral particles, it was used SpeedVac DNA concentrator (miVac, Inglaterra) until it gets to 500 µL.

2.4 Viral DNA extraction and molecular characterization

The DNA extraction of viral concentration was done using Sambrook and Russel (2001) method. After extraction, the DNA was quantified using NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA). For the RAPD reaction, the **RAPD5** 5' AACGCGCAAC 3', **OPL5** 5' ACGCAGGCAC 3' and **P2** 5' AACGGGCAGA 3' (GUTIERREZ et al., 2011) oligonucleotide were used. For each reaction with final volume of 20 µL, 30 ng of the extracted DNA was used, buffer at 1 X concentration; dNTP 0.2 mM; primer 8 µM; Taq polymerase 1.25 u; MgCl₂ 3 mM and the reaction was completed with nuclease free water until it get to 20 µL. The tubes were put into the Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf, Germany) termocycler and the program performed under the following thermal

cycling conditions: four cycles at 94 °C for 45 s, 30 °C for 120 s and 72 °C for 60 s; 26 cycles at 94 °C for 5 s, 36 °C for 30 s and 72 °C for 30 s (the extension step was increased by 1 s for every new cycle); and a final step of 10 min at 75 °C. The products from reaction were observed after gel electrophoresis (1 % agarose gel) stained with GelRed 1 %. The molecular weight marker used was LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp, Canada). It was observed in the QUANTUM ST4-3000 (Biotech, Canada) under UV light.

2.5 Morphological characterization

Morphological diversity analysis from each soil sample was done using microscope Zeiss EM 109 TEM performing at 80 kV. Grids with 200 mesh (Electron Microscopy Science, Hatfield, USA) covered with FormVar were used. After concentration, 10 µL of sample was pipetted in the grid and after 5 minutes. Viral particles were then contrasted with uranyl acetate 2 %. A drop of uranyl acetate was put in the grid for 15 seconds. After excess absorption, the material was ready to be analyzed.

2.6 pH

Five grams of soil sample was put into agitation with distilled water in Erlenmeyer flask for soil disaggregation. After centrifugation at 1.500 g for 10 minutes for soil precipitation, pH was analyzed.

	Site		
	1	2	3
pH	8.7	7.5	7.4

3 RESULTS

3.1 RAPD

The fingerprints generated showed different band size for each site and the number of fragments varied from two to ten (Figure 1, 2 and 3). The DNA band pattern showed fragments with size between 100 and 1500 bp. Less fragments were generated using RAPD5 primer (Figure 1).

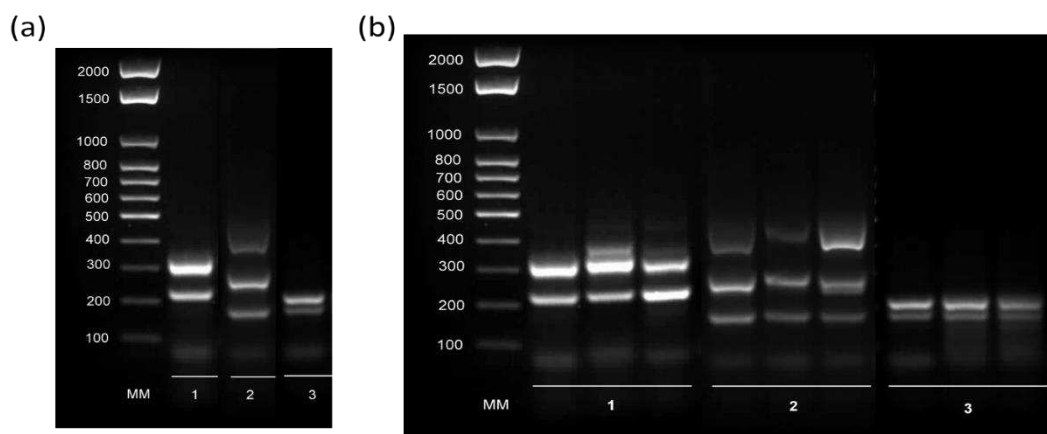


Figure 1. Band patterns obtained after RAPD reaction for each site. (a) 1- soil sample with inorganic fertilizer, 2- soil sample with organic and inorganic fertilizer and 3- soil sample with organic fertilizer. (b) Reproducibility of RAPD fingerprints using RAPD5 primer. LowRanger 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp, Canada).

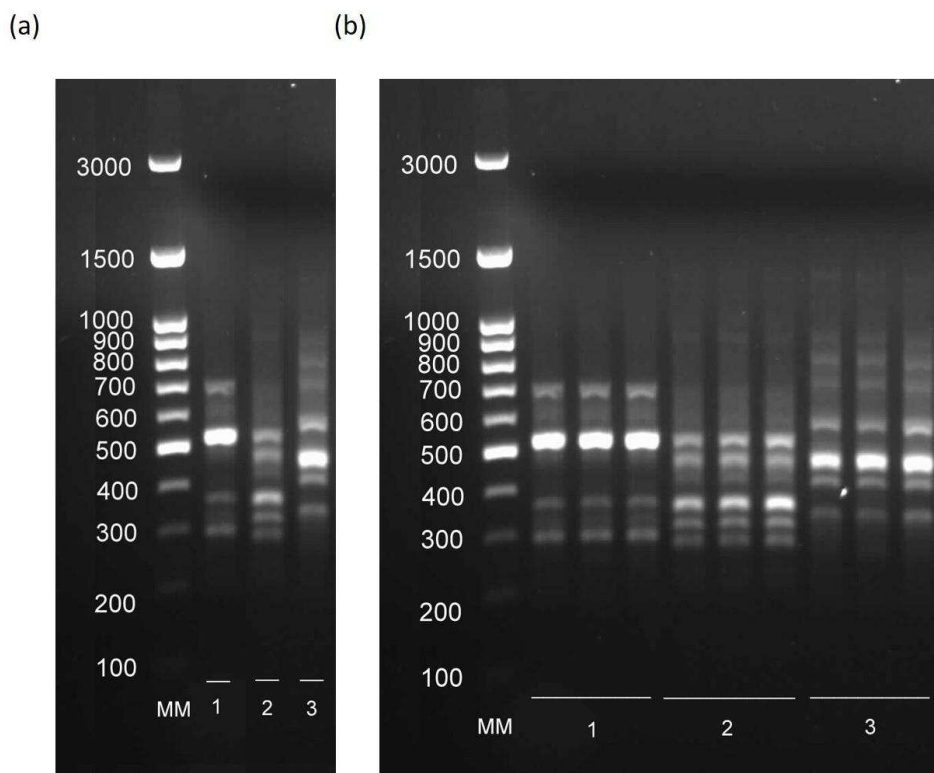


Figure 2. Band patterns obtained after RAPD reaction for each site. (a) 1- soil sample with inorganic fertilizer, 2- soil sample with organic and inorganic fertilizer and 3- soil sample with organic fertilizer. (b) Reproducibility of RAPD fingerprints using OPL5 primer. 100 bp DNA ladder RTU (Ready-to-Use) (KASVI, Brazil).

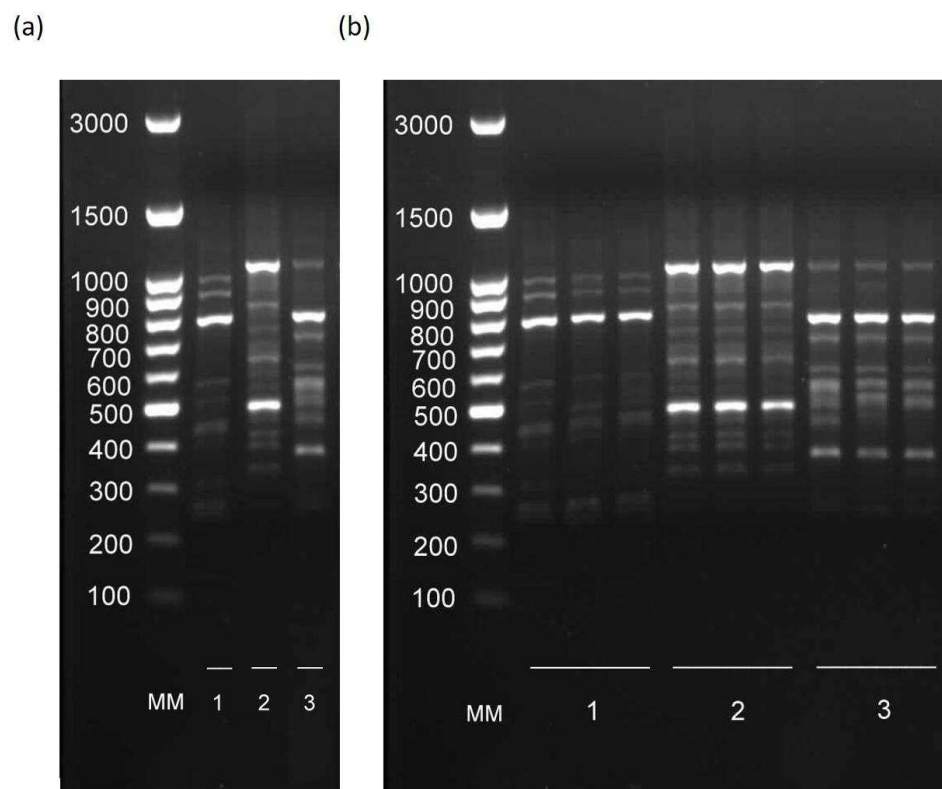


Figure 3. Band patterns obtained after RAPD reaction for each site. (a) 1- soil sample with inorganic fertilizer, 2- soil sample with organic and inorganic fertilizer and 3- soil sample with organic fertilizer. (b) Reproducibility of RAPD fingerprints using P2 primer. 100 bp DNA ladder RTU (Ready-to-Use) (KASVI, Brazil).

3.2 Morphological characterization

After observation under the microscope, it is possible to notice different morphotypes, such as tailed viruses, icosahedral, filamentous, spherical particles, spindle-shaped particles, and rod-shaped virus. Different morphotypes among all three sites was possible to notice and the site 2 showed more different viral morphologies than the others (Figure 4, 5 and 6).

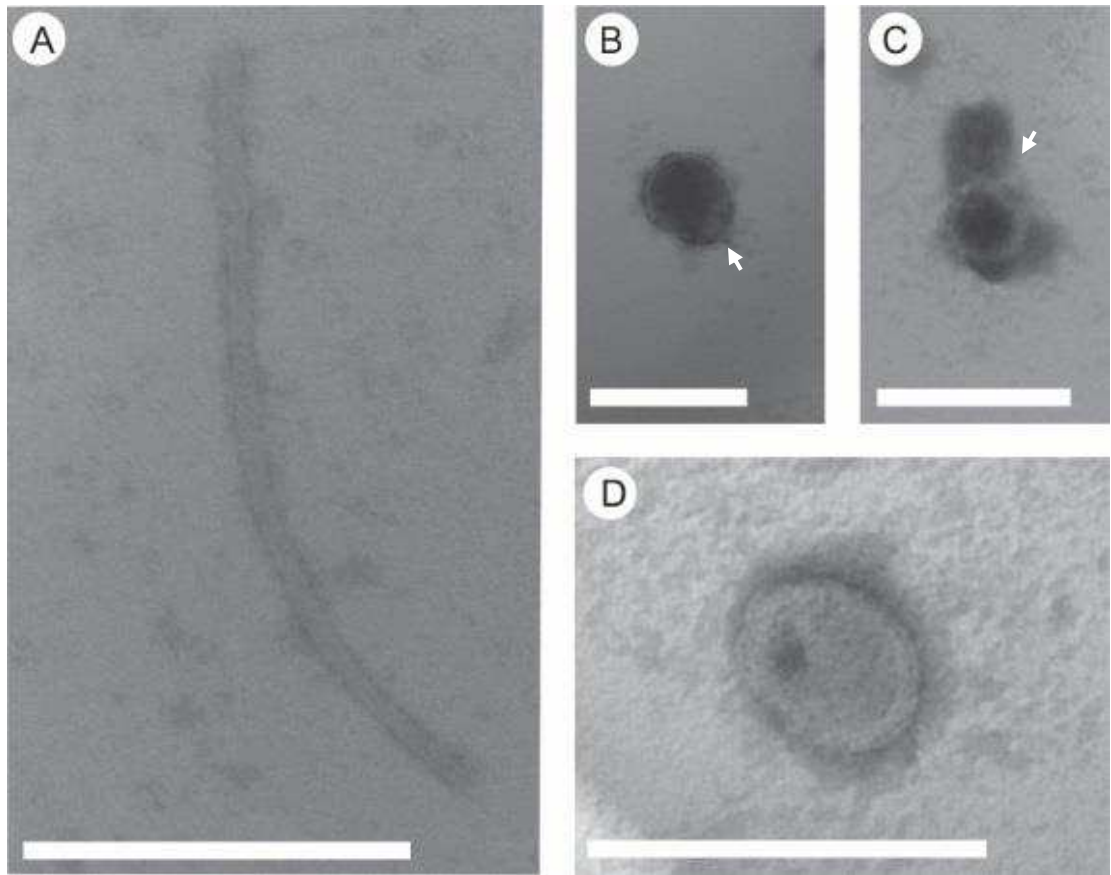


Figure 4. Morphological analysis of viral diversity from site 1. Morphology: (A) filamentous virus; (B) podovirus; (C) podovirus; (D) spherical virus. Scale bar: (A) 200 nm; (B) 100 nm; (C) 100 nm; (D) 100 nm. Arrows indicating the phage tail.

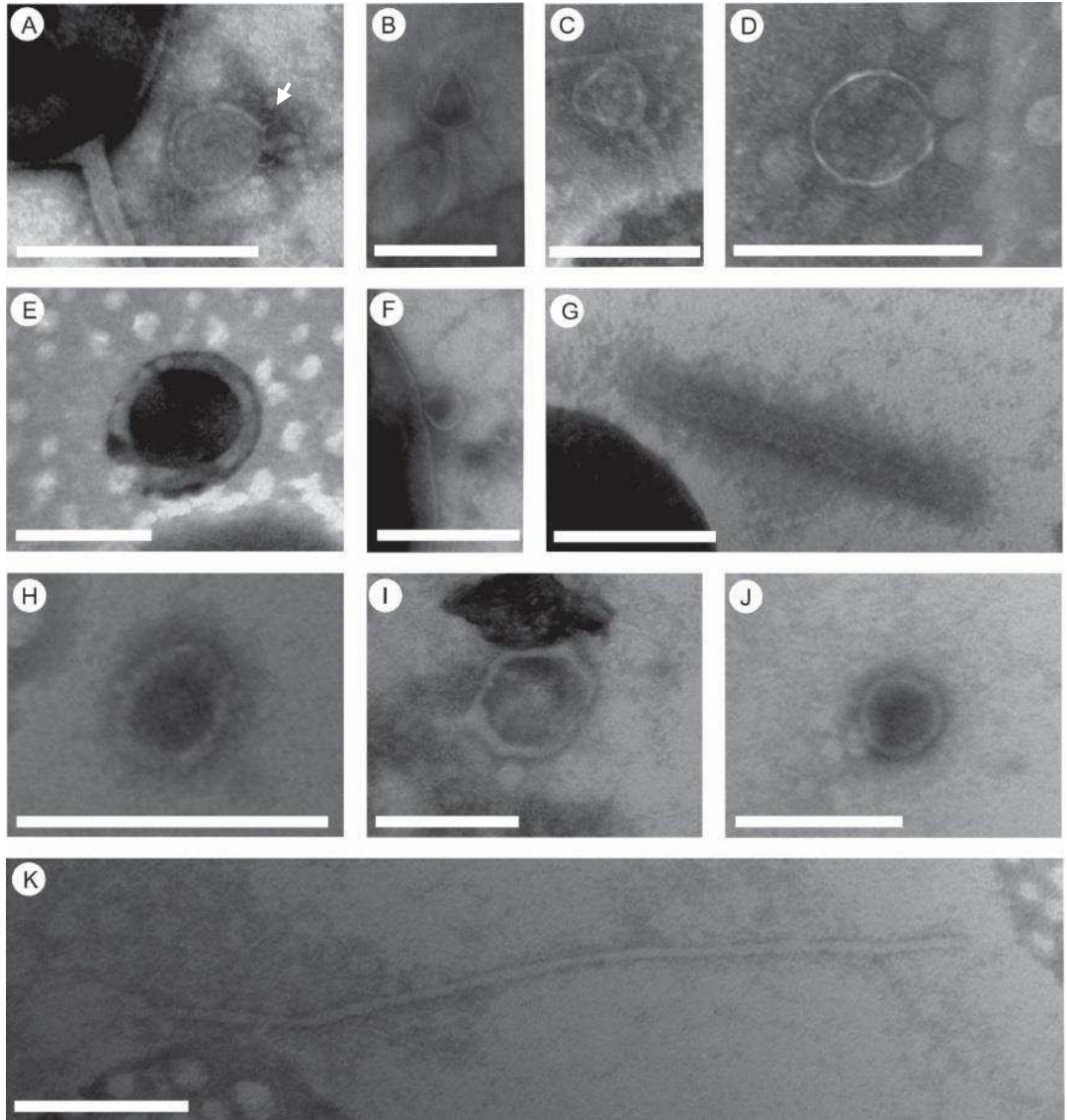


Figure 5. Morphological analysis of viral diversity from site 2. Morphology: (A) podovirus; (B) siphovirus; (C) siphovirus; (D) spherical virus; (E) spherical virus; (F) spherical virus; (G) rod-shaped virus; (H) spherical virus; (I) icosahedral virus; (J) spherical virus; (K) filamentous virus. Scale bar: (A) 200 nm; (B) 100 nm; (C) 100 nm; (D) 100 nm; (E) 100 nm; (F) 200 nm; (G) 100 nm; (H) 100 nm; (I) 100 nm; (J) 100 nm; (K) 100 nm. Arrow indicating the phage tail.

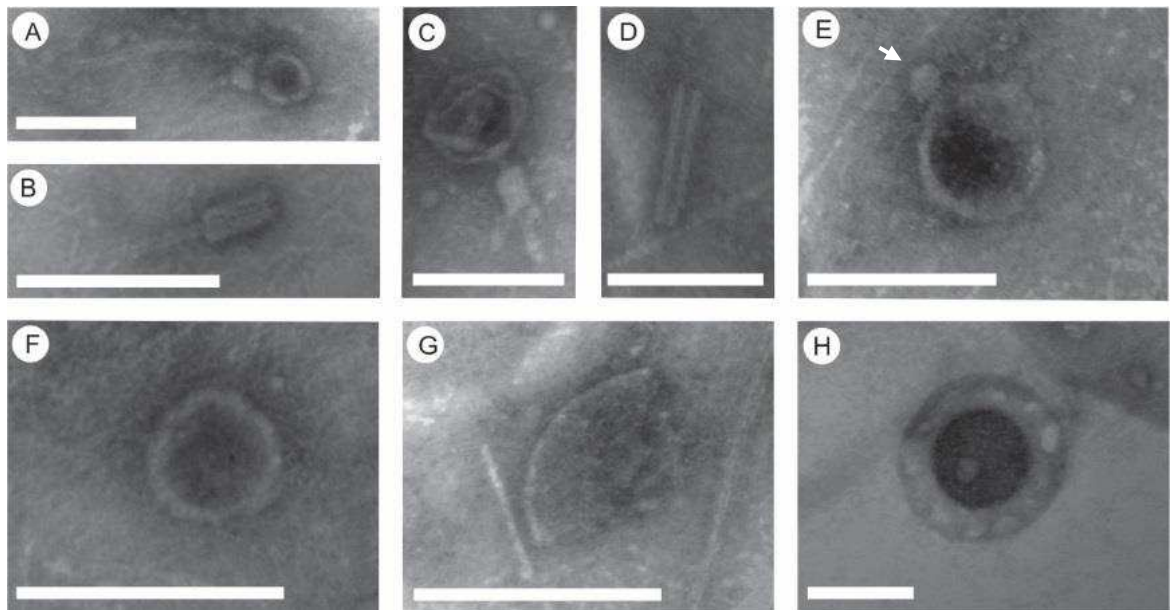


Figure 6. Morphological analysis of viral diversity from site 3. Morphology: (A) siphovirus; (B) siphovirus; (C) myovirus; (D) rod-shaped virus; (E) podovirus; (F) spherical virus; (G) lemon-shaped virus; (H) spherical virus. Scale bar: (A) 200 nm; (B) 100 nm; (C) 100 nm; (D) 100 nm; (E) 100 nm; (F) 100 nm; (G) 100 nm; (H) 100 nm. Arrow indicating the phage tail.

4 Discussion

The aim of this study was to evaluate viral diversity in soil samples from agricultural areas, which uses i) inorganic fertilizer, ii) organic and inorganic fertilizer and iii) organic fertilizer. All soils sampled had corn culture, but one of them has a crop rotation of pumpkin and corn.

This different viral diversity was observed by RAPD, which is known to be an molecular biology technique used to analyze viral diversity (SRINIVASIAH et al., 2013). Profiles that showed different band pattern for each site, indicates that although all sites have the same culture, the viral diversity in each site was different. The type of fertilization used in each site may influence the viral diversity. Site 2, which received rotation crop and organic /

inorganic fertilization showed in morphological analysis that more different morphotypes were recovered.

Morphological analysis showed that most of the different viral morphotypes found in all sites were bacteriophages, as bacterial cells are the most common host of viruses in soil (SANO et al., 2004). Bacteriophages can act not only in bacterial ecology, but also participate in bacterial evolution through transduction, a mechanism of horizontal gene transfer, in which viral capsids pack part of the host genome, and release the packed genome in other bacterial cell (MILLER, 2001).

Among all sites analyzed, site 1 had less different morphotypes than the others, which may be due to soil pH, that can change due to inorganic fertilization (CHEN, 2006), and by that affects viral adsorption to soil (which has negative charge). When soil pH is greater than the viral isoelectric point (IEP), it makes adsorption decrease and make viral dissociation easier (CHEN et al., 2014a). Michen and Graule (2010) reviewed viral IEP measurements of 104 viruses that replicate in hosts of kingdom plantae, bacteria and animalia and showed that the values found lie between pH 2.1 and 8.3 with most viruses IEP reported in $\text{pH } 5.0 \pm 1.3$.

Site 2 showed more different morphotypes among all sites. The input of organic and inorganic fertilization, like in this site's application have shown by literature that increase microbial biomass (NZIGUHEBA et al., 1998). Besides that, population growth is stimulated by application of organic manure and inorganic fertilizers increases the content of critical nutrients (ZHONG et al., 2010).

Also, the fact that site 2 is an area with crop rotation may influence in microbial community, as reported before by Alvey et al. (2003), which used denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to access 16S rDNA profiles of eubacterial and ammonia-oxidizing communities from rhizosphere of four crops sown in continuous cereal or cereal / legume rotation soils. Their results showed that cropping system had significant effect on bacterial communities, showing that plants grown in cereal soil had similar rhizosphere communities, whereas plants grown in crop rotation soil had greater variability according to the plant

species. These results showed that crop rotation can cause significant shifts in bacterial communities in rhizosphere.

Site 3, which was treated with organic fertilizer, was also found a variety of bacteriophages, but not as much morphotypes as site 2. That may be in response to the low content of nutrient being provided by the organic fertilizer, limiting microorganism's growth.

In this study, both microscopy analysis and RAPD reaction showed that viral diversity was different in all three sites sampled even though they had the same crop culture with different fertilization systems.

5 Conclusion

- Viral diversity observed in soil samples is influenced by type of fertilization used in agricultural areas;
- The site 2, which received crop rotation and organic / inorganic fertilization, is the most diversity, while the site 1, which received inorganic fertilization, was the lowest;
- Both methodologies, RAPD and morphological analysis, are efficient to verify the viral diversity in soil samples;

6 Acknowledgments

The authors are grateful CNPq, CAPES and FAPEMIG for the financial support.

7 References

- ALVEY, S. et al. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west african soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 37, n. 2, p. 73–82, 2003.
- BARABASZ, W. et al. Biological effects of mineral nitrogen fertilization on soil microorganisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 11, n. 3, p. 193–198, 2002.
- BRONICK, C. J.; LAL, R. Soil structure and management: A review. **Geoderma**, v. 124, n. 1-2, p. 3–22, 2005.
- BURESH, R. J. et al. Combined Use of Organic and Inorganic Nutrient Sources for Soil Fertility Maintenance and Replenishment. **Replenishing soil fertility in Africa**, n. replenishingsoi, p. 193-217, 1997.
- CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 907–916, 2009.
- CHEN, J.-H. the Combined Use of Chemical and Organic Fertilizers and/or Biofertilizer for Crop Growth and Soil Fertility. **International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use**, n. October, p. 1–11, 2006.
- CHEN, L. et al. Effect of different long-term fertilization regimes on the viral community in an agricultural soil of Southern China. **European Journal of Soil Biology**, v. 62, p. 121–126, 2014a.
- CHEN, Y. L. et al. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in response to fertilization and mowing in a temperate steppe in Inner Mongolia. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, n. 1, p. 67–79, 2014b.
- FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 108, n. 1-2, p. 147–166, 1998.

GARCÍA-ORENES, F. et al. Changes in soil microbial community structure influenced by agricultural management practices in a mediterranean agro-ecosystem. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80522, 2013.

GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 54–63, 2014.

GUTIERREZ, D. et al. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. **Federation of European Microbiological Societies Microbiol Lett**, v. 322, n. 1, p. 90-7, Sep 2011.

JAIN, R. et al. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 10, p. 1598–1602, 2003.

JANGID, K. et al. Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2843–2853, 2008.

JANNOURA, R.; JOERGENSEN, R. G.; BRUNS, C. Organic fertilizer effects on growth, crop yield, and soil microbial biomass indices in sole and intercropped peas and oats under organic farming conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 52, p. 259–270, 2014.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033-9, Mar 2002.

LEE, J. Effect of application methods of organic fertilizer on growth, soil chemical properties and microbial densities in organic bulb onion production. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 3, p. 299–305, 2010.

LIN, X. et al. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north China revealed by 454 pyrosequencing. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 11, p. 5764–5771, 2012.

MICHEN, B.; GRAULE, T. Isoelectric points of viruses. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 2, p. 388-397, 2010.

MILLER, R. V. Environmental bacteriophage-host interactions: Factors contribution to natural transduction. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 141–147, 2001.

DE MORAES, J. F., VOLKOFF, B. C. C. C., CERRI, C. C., & BERNOUX, M. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondônia, Brazil. **Geoderma**, v.70, n.1, p.63-81, 1996.

MOREIRA, A.; FAGERIA, N. K. Soil Chemical Attributes of Amazonas State, Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 40, n. 17-18, p. 2912–2925, 2009.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.

NZIGUHEBA, G. et al. Soil phosphorus fractions and adsorption as affected by organic and inorganic sources. **Plant and Soil**, v. 198, p. 159–168, 1998.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 299–304, 2000.

PAULA, F. S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular ecology**, v.23, n.12, p.2988-2999, 2014.

PENG, M.; ZI, X.; WANG, Q. Bacterial Community Diversity of Oil-Contaminated Soils Assessed by High Throughput Sequencing of 16S rRNA Genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 10, p. 12002–12015, 2015.

ROHWER, F.; PRANGISHVILI, D.; LINDELL, D. Roles of viruses in the environment. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2771–2774, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. New York, NY:, 2001.

SANO, E. et al. Movement of viruses between biomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5842–5846, 2004.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 98, n. 1-3, p. 255–262, 2003.

SRINIVASIAH, S. et al. Direct assessment of viral diversity in soils by random PCR amplification of polymorphic DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5450–5457, 2013.

TISDALL, J. M. Possible Role of Soil-Microorganisms in Aggregation in Soils. **Plant And Soil**, v. 159, n. 1, p. 115–121, 1994.

ZHANG, Q. C. et al. Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure. **Applied Soil Ecology**, v. 57, p. 1–8, 2012.

ZHONG, W. et al. The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. **Plant and Soil**, v. 326, n. 1, p. 511–522, 2010.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE VIRAL EM AMOSTRAS DE SOLO DE FLORESTA E PASTAGEM DA REGIÃO AMAZÔNICA

Aneli E. Abe, Roberto S. Dias, Adriana Cristina da Silva Nunes, Dorisvalder dos Dias Nunes, Luiz C. H. Lobato, Pedro M. P. Vidigal, Sérgio O. de Paula, Cynthia C. da Silva

Resumo

ABE, Aneli Eiko. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Diversidade viral em amostras de solo de floresta e pastagem da região amazônica.** Orientadora: Cynthia Canêdo da Silva. Coorientadores: Sérgio Oliveira de Paula e Roberto Sousa Dias.

A floresta amazônica é a maior floresta tropical do mundo, tendo grande importância por abrigar uma grande diversidade de animais, plantas e micro-organismos, que participam dos ciclos biogeoquímicos e desenvolvimento de plantas. Essa floresta está presente em nove países da América do Sul, sendo a maior parte pertencente ao território brasileiro, em estados das regiões norte e centro-oeste. O estado de Rondônia foi um dos estados que participou do projeto de desenvolvimento criado para ocupação da Amazônia, a partir da década de 1970. Com isso, as florestas foram convertidas principalmente para áreas de cultivo agrícola e áreas de pastagem. Em consequência da mudança de uso do solo, os micro-organismos, importantes indicadores de qualidade do solo, passam a sofrer modificações em suas comunidades. Os vírus, que são micro-organismos ubíquos e abundantes no solo, são considerados em sua maioria como bacteriófagos, já que o hospedeiro mais comum dos vírus no solo são as bactérias. Diferentes metodologias foram desenvolvidas para o estudo de vírus, desde a microscopia eletrônica de transmissão à técnicas de sequenciamento de nova geração. O presente trabalho teve como objetivo fazer o estudo de diversidade viral em amostras de solo de floresta e pastagem da região amazônica por diferentes métodos independentes de cultivo. Pela metagenômica foi possível observar que a amostra de pastagem representou mais famílias virais do que a amostra de floresta, e que maioria dos vírus presentes nos dois tipos de solo eram da ordem *Caudovirales*. Além disso, diversas famílias da ordem *Megavirales* foi identificada, como pode ser visto também nas análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras de floresta apresentaram mais tipos morfológicos que as amostras de pastagem, e além de vírus gigantes, puderam ser observados vírus esféricos, icosaédricos, caudados, pleomórficos, filamentosos e vírus em forma de bastonete.

Abstract

ABE, Aneli Eiko. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, August, 2016. **Viral diversity in soil samples of forest and pasture from Amazon region.** Adviser: Cynthia Canêdo da Silva. Co-advisers: Sérgio Oliveira de Paula and Roberto Sousa Dias.

The Amazon forest is the largest tropical rainforest in the world, being great importance for holding a variety of animals, plants and microorganisms, which act in biogeochemical cycles and plants development. This forest is placed in nine countries of South America and most in Brazilian territory, in North and Midwest regions. Rondônia state participated of the development project created for Amazon occupation after the 1970's. Thus, the forest was converted to agricultural areas and pasture. Microorganisms, as good indicators of soil quality, goes through changes in their community, in consequence of land use. Viruses, which are ubiquitous microorganisms and abundant in soil environment are considered mainly bacteriophages, once the their most common hosts in soil are bacterial cells. Different methodologies were developed, like transmission electron microscopy and new generation sequencing. This work aimed to analyze viral diversity in soil samples from forest and pasture using culture independent methods. Metagenome analysis showed that pasture have more viral families than the forest and most of viruses sequences present in both pasture and forest were from Caudovirales order. Besides that, different families from Megavirales order were identified in both metagenome analyze and transmission electron microscopy (TEM). Forest samples had more morphotypes than pasture samples, and besides giant viruses, spheric, icosahedral, tailed, pleomorphic, filamentous and rod-shaped viruses were also observed by TEM.

1 Introdução

As florestas tropicais são consideradas locais que abrigam as maiores riquezas de espécies no planeta (PEAY et al., 2013). A Bacia Amazônica é conhecida por ser a maior floresta tropical do mundo e por ser um importante sistema ecológico, onde residem diversas espécies de plantas, animais, e micro-organismos (FOLEY et al., 2007). Cerca de 63% da área total desta bacia está presente no território brasileiro (ESPINOZA VILLAR et al., 2009), e está presente em nove estados, sendo estes localizados nas regiões norte e centro-oeste.

O estado de Rondônia, localizado na região ocidental da Amazônia brasileira foi um dos estados que participou do programa criado pelo governo que aumentou o número de imigrantes para a região amazônica a partir da década de 1960 (PEDLOWSKI et al., 1997), devido à grande expansão econômica que acontecia no local (DE MIRANDA & MATTOS, 1992). A maioria dos projetos de colonização no estado foi feita para acomodar imigrantes sem-terra (BATISTELLA et al., 2003), e a partir de então, estas áreas passaram a ser constantemente afetadas por altas taxas de desmatamento, principalmente para fins de conversão do solo para áreas de cultivo agrícola ou áreas de pastagem (NAVARRETE et al., 2011), que representam 70% da taxa de conversão da floresta amazônica (MIRZA et al., 2014).

A conversão do solo afeta diretamente a microbiota presente naquele ambiente, uma vez que o solo possui a maior fonte de micro-organismos em todo planeta (MOCALI e BENEDETTI, 2010) e o impacto causado pelo seu uso são sentidas pelas comunidades microbianas (GEISSELER & SCOW, 2014), tendo como consequência alterações de funções importantes, como de ciclagem de nutrientes, preservação no ambiente em que se encontram (CENCIANI et al., 2009) e promoção de crescimentos das plantas (PII et al., 2015).

Os vírus são micro-organismos abundantes em todos os ambientes (SANO et al., 2004) e no solo são importantes para o equilíbrio e evolução das populações presentes, principalmente as bacterianas (CHEN et al., 2014). Existem diversos fatores ambientais que podem inativar ou afetar a infectividade dos vírus no solo, como temperatura, pH, tipo de solo, conteúdo de matéria orgânica, poluentes, anaerobiose, salinidade e umidade, sendo a

temperatura o fator mais importante para a permanência do virion no solo (KIMURA et al., 2008).

Pelo fato das bactérias serem as hospedeiras mais comuns nos ambientes, as partículas tipo vírus (VLPs) encontradas são consideradas bacteriófagos (SANO et al., 2004). Estes micro-organismos representam um reservatório de diversidade genética e possuem potencial de manipular o metabolismo da célula hospedeira (SWANSON et al., 2009). Após a lise celular, o bacteriófago lítico infecta e replica em outras células (GÓMEZ & BUCKLING, 2013), completando seu ciclo infeccioso. Já os bacteriófagos temperados têm seus genomas integrados no genoma do hospedeiro, tendo seu material genético replicado com o material genético da bactéria, podendo em algum momento entrar em seu ciclo lítico e lisar a célula hospedeira para liberar novas partículas virais, ou podem se manter latente dentro do hospedeiro, podendo expressar genes que alteram o fenótipo bacteriano (ROHWER et al., 2009). Os bacteriófagos podem ainda participar diretamente da evolução de bactérias por meio da transdução, quando os capsídeos virais empacotam uma parte do genoma bacteriano, com tamanho semelhante ao tamanho do genoma viral, e, liberam esse material genético em outra célula bacteriana (MILLER, 2001). Nestes casos, a partícula não carrega material genético viral, apenas genoma bacteriano (JIANG & PAUL, 1998).

Assim como outros micro-organismos, os vírus podem ser estudados utilizando técnicas dependentes ou independente de cultivo (BREITBART & ROHWER, 2005). Entretanto, há uma dificuldade no estudo de diversidade viral, já que diferente de outros organismos que podem ser estudados por meio de genes conservados, como o rRNA, os vírus não possuem um gene conservado, e além disso, existem hospedeiros virais difíceis de serem cultivados (ROHWER & THURBER, 2009).

Os estudos de diversidade viral são feitos principalmente por meio de técnicas independentes de cultivo. Diversos trabalhos de diversidade viral em amostras ambientais utilizam diferentes métodos independentes de cultivo, como a metagenômica (ROSARIO et al., 2009; KIM et al., 2015), eletroforese em campo pulsado (DÍEZ et al., 2000) e microscopia eletrônica de transmissão (WILLIAMSON et al., 2005; ROSARIO et al., 2009).

Assim, pelo fato de os vírus serem membros ativos dos ecossistemas microbianos e por contribuírem para a diversidade genética e composição da comunidade microbiana (JIANG & PAUL, 1998), o presente estudo tem como objetivo analisar a diversidade viral em amostras de solo de floresta e pastagem localizadas na bacia do rio Mutum Paraná, em Rondônia.

2 Material e métodos

2.1 Amostragem

A amostragem do solo foi feita ao longo da bacia do rio Mutum Paraná, localizada na região Noroeste do Estado de Rondônia, com o auxílio de pesquisadores do Laboratório de Geografia e Planejamento Ambiental – LABOGEOPA, da Universidade Federal de Rondônia (UNIR). Foram selecionados um total de 20 pontos, sendo dez de regiões de pastagem e dez de floresta. A coleta foi realizada numa área de 1x1 m² onde foram retiradas cinco subamostras de solo na profundidade de 0 a 20 cm com trado holandês. Após a coleta das cinco subamostras, estas foram misturadas, formando uma amostra composta.

2.2 Avaliação da diversidade viral em amostras de solo de floresta e pastagem

A análise da diversidade viral das amostras de solo de floresta e de pastagem foi realizada por meio de duas metodologias: i) sequenciamento massivo (NGS) das amostras de solo, ii) microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

2.2.1 Extração de DNA total e sequenciamento das amostras de solo

Foi realizada a extração de DNA total dos pontos amostrados, a partir de 0,5 g de amostra compostas de solo, utilizando o *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado no Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA), e posteriormente foi feito um gel de agarose 0,8% corado com 1% GelRed (Uniscience) a fim de avaliar a eficiência do método de extração e qualidade do DNA extraído.

As amostras de DNA metagenômico extraídos do solo de floresta e pastagem foram agrupadas, em iguais concentrações, formando dois pools um com amostras de floresta e outro com amostras de pastagem, que posteriormente foram submetidos ao sequenciamento massivo pela plataforma Illumina HiSeq2000 (2x150 pares de base) (Illumina Inc.).

Para análise dos dados de sequência proveniente do metagenoma, foi utilizado o MetaVir, um servidor voltado para análise de sequências de metagenomas virais (ROUX et al., 2011).

2.2.2 Concentração viral e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Cinco gramas de solo foram colocados em agitação em frasco *Erlenmeyer* contendo 50 mL de tampão fosfato (PBS) 1X para desagregar as partículas de solo e acessar os microrganismos presentes. Para separar o solo da suspensão de microrganismos foi feita uma centrifugação 1.500 g por 10 minutos. A fase aquosa foi recuperada, e a partir dela foi feita a concentração viral.

Para a concentração de vírus foi utilizado o método da membrana com carga negativa (HA), com algumas modificações (KATAYAMA et al., 2002). A membrana HA, 45 µm e 142 mm de diâmetro, foi colocada no sistema de filtração *Kitasato*. Os vírus adsorveram na membrana na presença de MgCl₂ 25 mM. Para desligar os vírus da membrana, a mesma foi retirada do aparato e lavada com 350 mL de H₂SO₄ (0,5mM; pH 3,0) para eluição dos cátions e, posteriormente, foi colocada em uma placa de *Petri* com 10 mL de NaOH, por 10 minutos sob agitação de 60 rpm. O pH foi neutralizado com 50 µL de H₂SO₄ 50 mM e TE (Tris-EDTA) 100 X. Após o período de agitação, a suspensão viral foi colocada no *Vivaspin 20* (GE Healthcare Bio-Sciences, Suécia) e centrifugada a 1.500 g, por 10 minutos à 4 °C. Foi recuperado o volume de 1 mL, transferido para um microtubo de 1,5 mL. Para aumentar a concentração viral, foi utilizado o *SpeedVac DNA concentrator* (miVac, Inglaterra) até ser atingido o volume final de 500 µL.

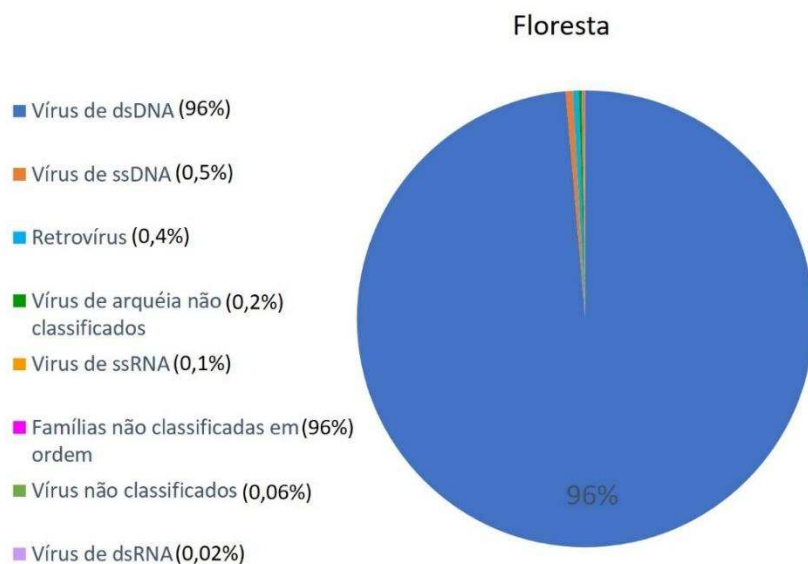
Para fazer a avaliação da diversidade morfológica viral as amostras de solo de floresta e pastagem foram agrupadas por tipo de solo e submetidas à observação no microscópio eletrônico Zeiss EM 109 TEM operando a 80 kv. Para isso foram utilizadas *grids* com 200 mesh (Electron Microscopy Science, EUA), cobertas com *FormVar*. Em cada *grid* foi pipetado 10 µL de concentrado viral, e após 5 minutos foi retirado o excesso com papel filtro. As partículas virais aderidas na *grid* foram contrastadas com acetato de uranila 2%. Após 15 segundos, foi retirado o excesso de acetato de uranila da *grid*, e o material seco foi submetido à observação ao microscópio.

3 Resultados

3.1 Análise metagenômica

As sequências obtidas a partir do sequenciamento *shotgun* do DNA metagenômico referentes às amostras de floresta e pastagem apresentaram 125 pb, e foram utilizadas para a montagem de *contigs* utilizando o *software* CLC genomics. Os *contigs* montados tiveram tamanho mínimo de 250 pares de base (pb) e um total de 278.380 *contigs* foram obtidos para floresta e 300.817 *contigs* para pastagem. Estes foram submetidos à análise no servidor MetaVir. Dos 278.380 *contigs* de floresta, foram anotados como vírus 17.953 *hits* (6,44 % do total), enquanto que dos 300.817 *contigs* de pastagem submetidas, 19.753 *hits* (6,56 % do total). Em ambas as amostras, cerca de 96 % dos *contigs* anotados foram classificados como sendo de vírus de DNA de fita dupla (Figura 1a e b). Destes vírus de DNA, os *contigs* de amostra de floresta foram classificadas em 22 famílias virais, enquanto a amostra de pastagem obteve 24 famílias (Figura 2 a e b). Dentre as famílias virais classificadas, 22 apareceram em ambas as amostras, e duas, *Guttaviridae* e *Papillomaviridae*, apareceram apenas na amostra de pastagem (Figura 2b). As famílias pertencentes a ordem *Caudovirales* foram as mais abundantes em ambas as amostras, sendo a família *Myoviridae* a mais abundante, apresentando 49% em ambas (Figura 3 a e b). Além dos bacteriófagos caudados, foram anotados bacteriófagos das famílias *Tectiviridae* e *Plasmaviridae*. Famílias virais que infectam células de arqueia foram identificadas, sendo *Ampullaviridae*, *Salterprovirus*, *Bicaudaviridae*, *Lipothrixviridae* e *Rudiviridae*. Diferentes famílias pertencentes à ordem *Megavirales* (*Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* e *Marseilleviridae*) estão presentes nas amostras de pastagem e floresta.

(a)



(b)

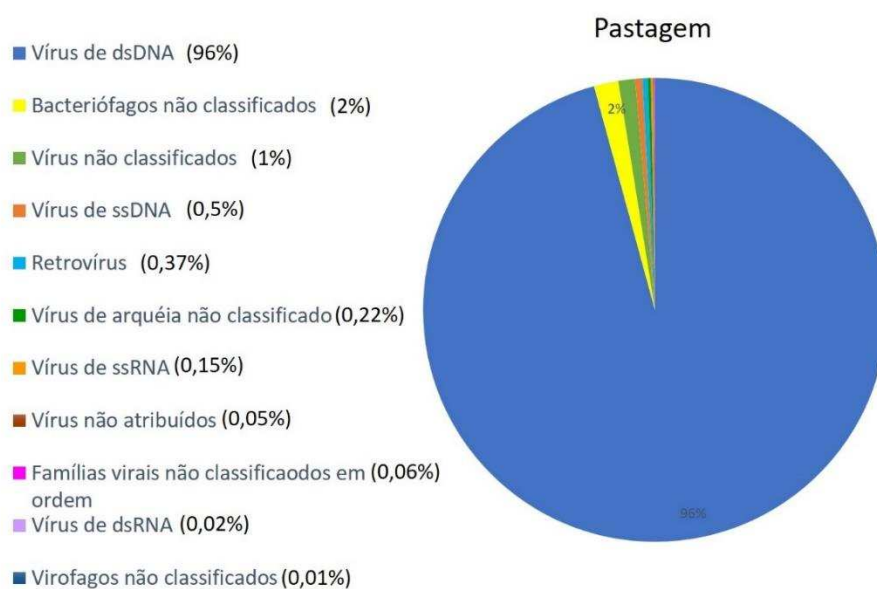


Figura 1. Classificação das sequências virais presentes no metagenoma de amostras de floresta e amostras de pastagem. **(a)** *pool* de amostras de floresta; **(b)** *pool* de amostras de pastagem.

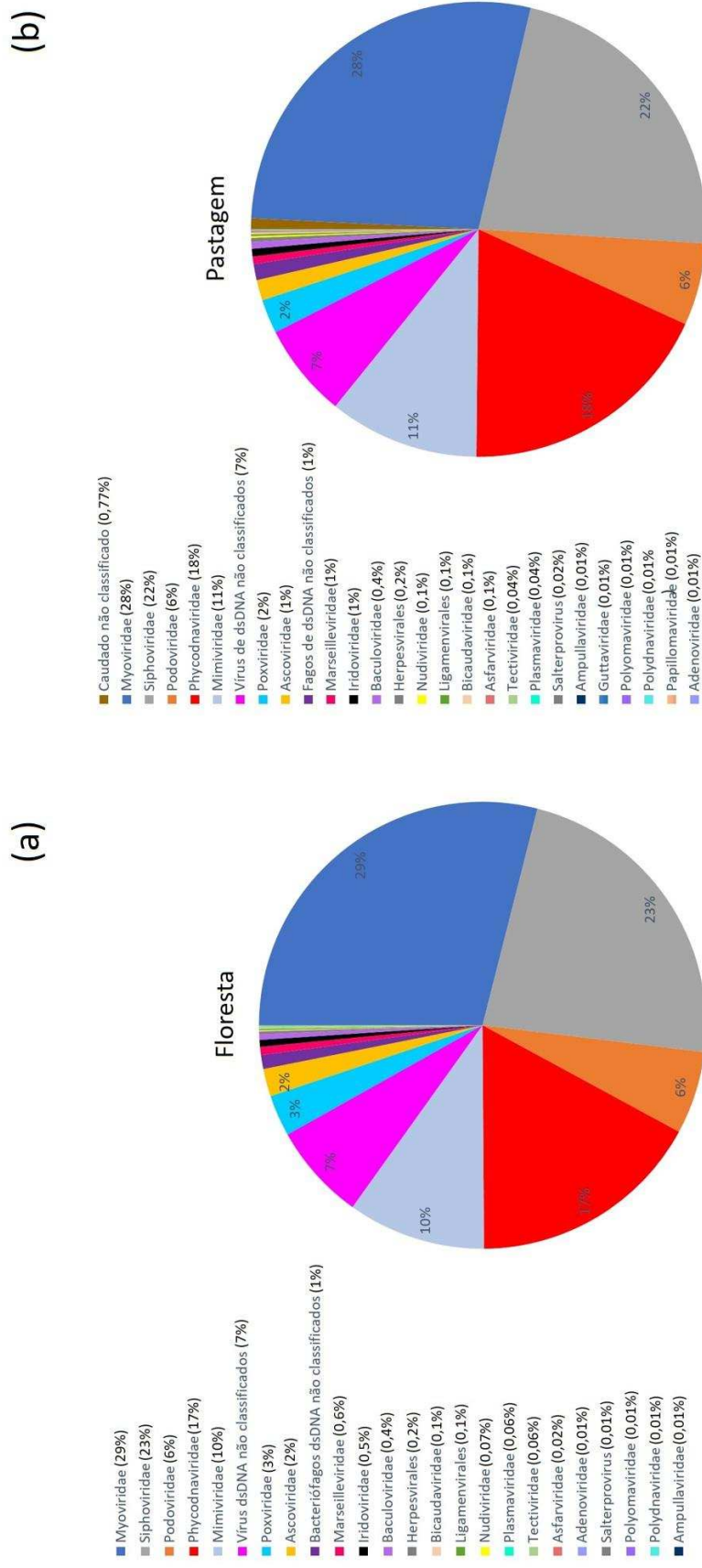


Figura 2. Proporção das seqüências pertencentes a diferentes famílias virais. (a) *pool* de amostras de floresta e (b) *pool* de amostras de pastagem.

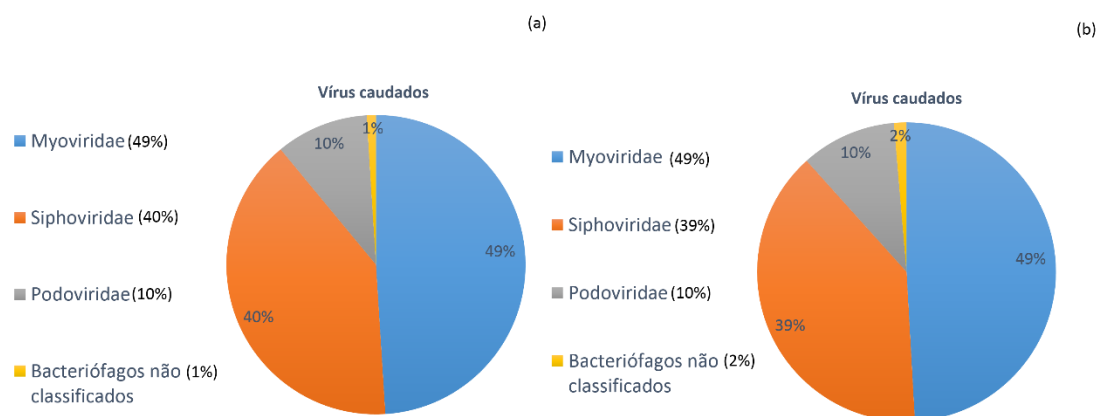


Figura 3. Proporção das sequências pertencentes às famílias da ordem *Caudovirales*. **(a)** *pool* de amostras de floresta e **(b)** *pool* de amostras de pastagem.

3.2 Análise morfológica por MET

Para as análises morfológicas, após o processo de concentração viral dos vinte pontos, os solos pastagem e floresta foram agrupados de acordo com a classificação do solo (Tabela 1).

Tabela 1. Agrupamentos dos vinte pontos de acordo com a classificação do solo.

Classificação do Solo	Pastagem	Floresta
Fta^a	6	1
Ftd^b	7	2, 16
LVAd^c	3, 10, 12, 17	4, 11, 18
PVAd^d	5, 13, 15, 19	8, 9, 14, 20

Nota: ^a**Fta**: Plintossolo Argilúvico Alumínico; ^b**Ftd**: Plintossolo Argilúvico Distrófico; ^c**LVAd**: Latossolo Vermelho-amarelo Distrófico; ^d**PVAd**: Argissolo Vermelho-amarelo Distrófico.

Foi possível partículas virais com morfologias filamentosas, esféricas, icosaédricas e pleomórficas (Figura 4-7). Todos os tipos de solo apresentaram vírus filamentosos tanto nas amostras de solo de pastagem, quanto das amostras de floresta (Figura 4-7). O diâmetro dos

vírus esféricos variou de 168 nm à 468 nm e foram observados em todos os tipos de solo, exceto nos solos PVAd e LVAd da amostra de pastagem. Agregados virais puderam ser vistos em todos os tipos de solo, exceto na Ftd de floresta (Figura 4a (A), 4b (F), 5a (J), 5b (D), 6b (A), 7a (K), 7b (G)).

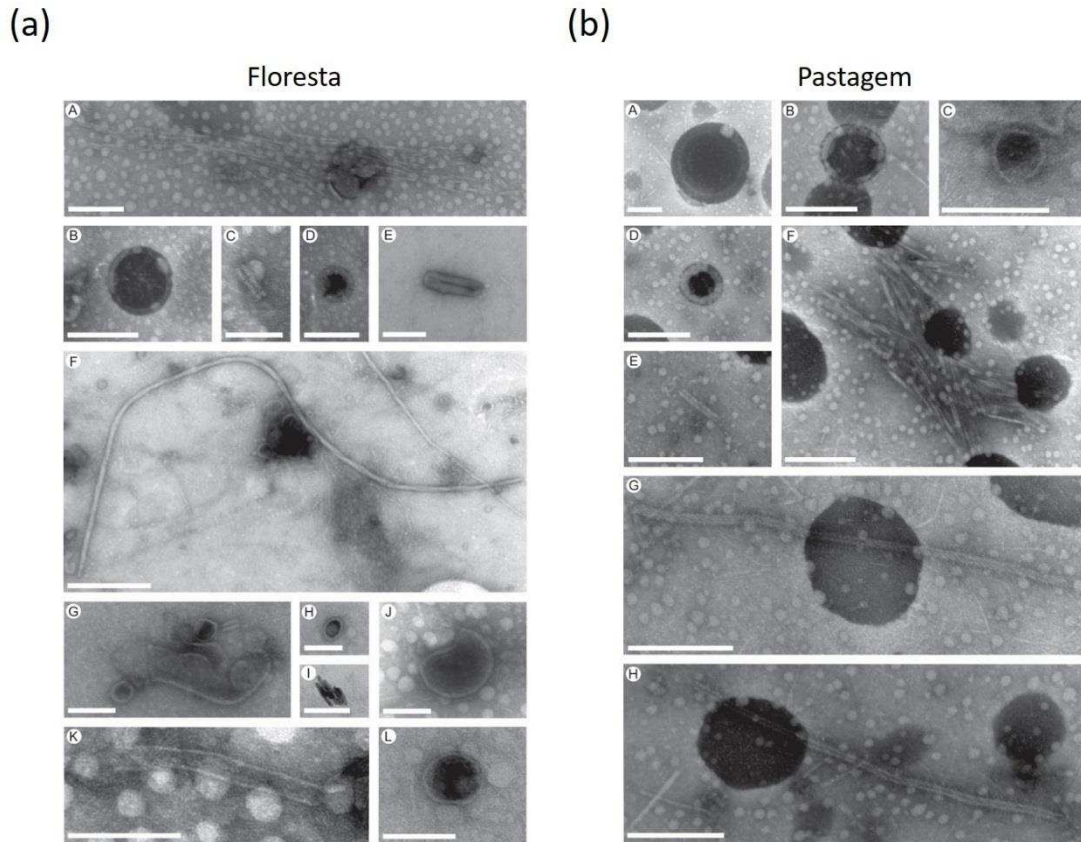


Figura 4. Diversidade viral em amostras de Fta (plintossolo argilúvico alumínico) de **(a) Floresta.** Morfologias: (A) agregado viral; (B) vírus esférico; (C) vírus em forma de haste; (D) vírus esférico; (E) vírus em forma de haste; (F) vírus filamentosos; (G) siphovírus; (H) vírus esférico; (I) não definido; (J) vírus pleomórfico; (K) vírus filamentosos; (L) vírus esférico. As barras representam (A) 200 nm; (B) 200 nm; (C) 100 nm; (D) 200 nm; (E) 200 nm; (F) 500 nm; (G) 100 nm; (H) 100 nm; (I) 100 nm; (J) 100 nm; (K) 100 nm; (L) 100 nm. **(b) Pastagem.** Morfologias: (A) vírus esféricos; (B) vírus esférico; (C) vírus esféricos; (D) vírus esférico; (E) vírus em forma de haste; (F) agregado viral; (G) vírus filamentosos; (H) vírus filamentosos. As barras representam (A) 200 nm; (B) 200 nm; (C) 100 nm; (D) 200 nm; (E) 200 nm; (F) 200 nm; (G) 200 nm; (H) 200 nm.

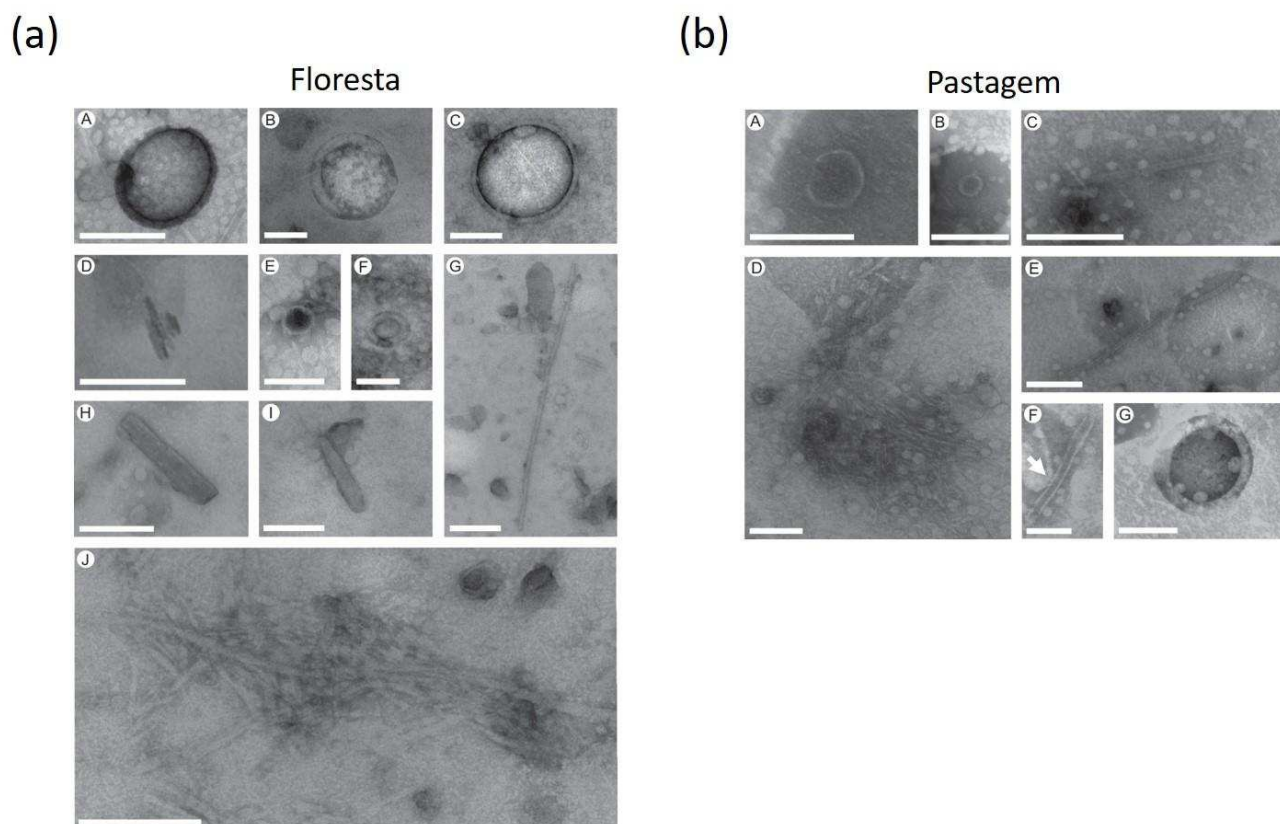


Figura 5. Diversidade viral em amostras de **Ftd** (plintossolo argilúvico distrófico) de **(a) floresta**. Morfologias: (A) vírus esférico; (B) vírus esférico; (C) vírus esférico; (D) não definido; (E) vírus esférico; (F) vírus esférico; (G) vírus filamentoso; (H) vírus baciliforme; (I) vírus baciliforme; (J) agregado viral. As barras representam (A) 200 nm; (B) 100 nm; (C) 200 nm; (D) 100 nm; (E) 100 nm; (F) 100 nm; (G) 200 nm; (H) 200 nm; (I) 100 nm; (J) 200 nm. **(b) pastagem**. Morfologias: (A) vírus esférico; (B) vírus esférico; (C) vírus filamentoso; (D) agregado viral; (E) vírus filamentoso; (F) vírus em forma de haste; (G) vírus esférico. As barras representam (A) 100 nm; (B) 200 nm; (C) 200 nm; (D) 100 nm; (E) 200 nm; (F) 100 nm; (G) 200 nm.

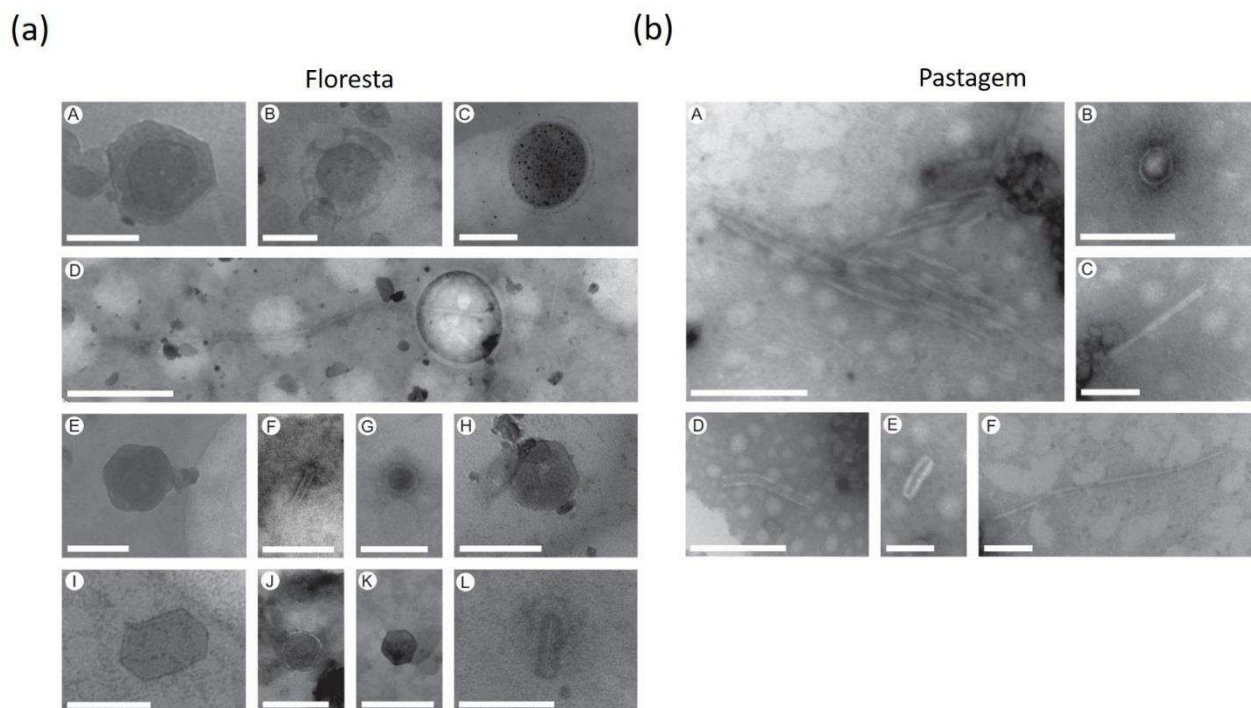


Figura 6. Diversidade viral em amostras de LVAd (latossolo vermelho-amarelo distrófico) de **(a) Floresta**. Morfologias: (A) não definido; (B) vírus esférico; (C) vírus esférico; (D) vírus filamentosos; (E) podovírus; (F) vírus em forma de haste; (G) vírus esférico; (H) podovírus; (I) não definido; (J) vírus esférico; (K) vírus icosaédrico; (L) vírus em forma de haste. As barras representam (A) 100 nm; (B) 100 nm; (C) 200 nm; (D) 500 nm; (E) 100 nm; (F) 200 nm; (G) 100 nm; (H) 100 nm; (I) 100 nm; (J) 200 nm; (K) 200 nm; (L) 100 nm. **(b) Pastagem**. Morfologias: (A) agregado viral; (B) vírus esférico; (C) vírus em forma de haste; (D) vírus filamentosos; (E) vírus em forma de haste; (F) vírus filamentosos. As barras representam (A) 200 nm; (B) 100 nm; (C) 100 nm; (D) 200 nm; (E) 100 nm; (F) 100 nm.

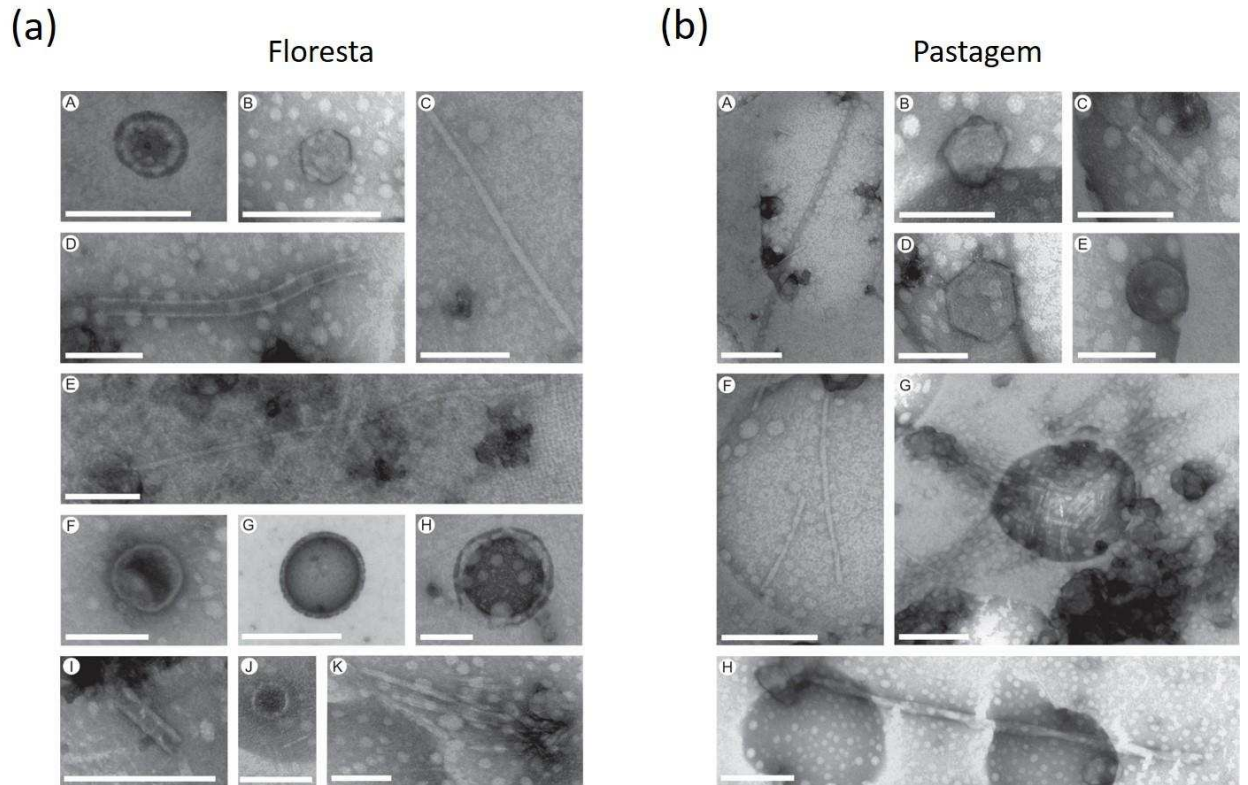


Figura 7. Diversidade viral em amostras de **PVAd** (argissolo vermelho-amarelo distrófico) de **(a) Floresta**. Morfologias: (A) vírus esférico; (B) vírus icosaédrico; (C) vírus em forma de haste; (D) vírus filamentosos; (E) vírus filamentosos; (F) podovírus; (G) vírus esférico; (H) vírus esférico; (I) vírus em forma de haste; (J) vírus esférico; (K) agregado viral. As barras representam (A) 200 nm; (B) 200 nm; (C) 100 nm; (D) 100 nm; (E) 100 nm; (F) 100 nm; (G) 500 nm; (H) 100 nm; (I) 200 nm; (J) 100 nm; (K) 100 nm. **(b) Pastagem**. Morfologias: (A) vírus filamentosos; (B) podovírus; (C) vírus em forma de haste; (D) vírus icosaédrico; (E) vírus esférico; (F) vírus filamentosos; (G) agregado viral; (H) vírus filamentosos. As barras representam (A) 200 nm; (B) 100 nm; (C) 100 nm; (D) 100 nm; (E) 100 nm; (F) 100 nm; (G) 200 nm; (H) 200 nm.

4 Discussão

Poucos trabalhos de diversidade viral em amostras de solo são encontrados na literatura, sendo este o primeiro a abordar a diversidade viral de amostras de solo de floresta e pastagem da região Amazônica utilizando sequenciamento *shotgun* do metagenoma.

A anotação das sequências evidenciou que a maioria dos vírus observados nas duas amostras foram da ordem *Caudovirales* (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*), ordem a qual pertence os bacteriófagos, vírus que infectam bactéria (MUNIESA et al., 2013) e arqueias (PRANGISHVILI, 2015). Tal predominância pode ser explicada pela abundância de bactérias no solo (BREITBART & ROHWER, 2005; SANO et al., 2004). Além disso, os *contigs* anotados como sendo de bacteriófagos podem representar os profagos encontrados no genoma bacteriano, após infecção e entrada no ciclo lisogênico (ROHWER et al., 2009; CASJENS, 2003).

Além dos bacteriófagos caudados, foram anotados outros bacteriófagos como sendo pertencentes às famílias *Tectiviridae* e *Plasmaviridae* (ELBREKI et al., 2014), e também diferentes famílias virais que possuem como principais hospedeiros as células de arqueia (*Ampullaviridae*, *Salterprovirus*, *Bicaudaviridae*, *Lipothrixviridae*, *Guttaviridae* e *Rudiviridae*), sendo pertencentes à um grupo de vírus que são diferenciados entre si principalmente pela morfologia, que é mais diversa para micro-organismos dentro deste domínio do que nos outros dois existentes (PRANGISHVILI et al., 2015).

À ordem *Megavirales* (*Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* e *Marseilleviridae*) pertencem os vírus capazes de infectar células eucarióticas, tendo diferentes genes que podem interferir na imunidade e morte celular programada em vertebrados (poxvírus e asfarvírus, que infectam vertebrados), genes que modulam a função do núcleo e sinalização celular (mimivírus, phycodnavírus e marseillevírus, que infectam eucariotos unicelulares), além de a maioria ser capaz de replicar seu genoma no citoplasma da célula hospedeira (COLSON et al., 2013).

Os vírus da família viral *Polydnaviridae* foram observados nas duas amostras analisadas e estes infectam vespas, insetos que se alimentam de outros insetos durante as

fases de larva, e de néctar durante sua fase adulta, permanecem nas células somáticas destas como provírus até que as vespas atinjam a fase de pupa/ adulta, em que ocorre a replicação viral em células presentes no ovário das vespas fêmea (STRAND & BURKE, 2012). Os nudivírus fazem parte de um grupo diverso de vírus que infectam invertebrados, sendo reportados em uma ampla gama de insetos e outros artrópodes (CHENG et al., 2014). Os baculovírus, também observados nas duas amostras, são vírus que infectam principalmente mosquitos (MOSER et al., 2001).

Os vírus da família *Polyomaviridae*, também observados nas duas amostras analisadas, são capazes de infectar animais mamíferos e aves, tendo sido encontrado em roedores, morcegos, humanos, primatas não-humanos, carnívoros, elefantes, golfinhos, cavalos e animais da ordem *Artyodactyla* (HILL et al., 2015). Esses vírus são conhecidos por serem capazes de causar doenças nos animais que infectam, e estes apresentarem diferentes sintomas (HILL et al., 2015). Assim como poliomavírus, os vírus pertencentes à família *Adenoviridae* são capazes de infectar células humanas e outras populações animais, podendo causar doenças e sobreviver fora do hospedeiro por longos períodos (JUNG et al., 2014). Os diversos vírus da família *Herpesviridae* podem infectar diferentes seres vivos, desde vertebrados (CLEATOR & KLAPPER, 2002) a invertebrados (MINEUR et al., 2015). Em bovinos esses vírus patógenos de grande importância, pelo fato de poderem estabelecer infecções latentes nos gânglios neuronais seguido de outras complicações (PUENTES et al., 2016).

O *pool* de pastagem apresentou duas famílias exclusivas, *Guttaviridae* e *Papillomaviridae*. A família *Guttaviridae* possui diferentes espécies virais que infectam células de arqueias (PIETILÄ et al., 2014). Já a família *Papillomaviridae* é capaz de infectar células de vertebrados, sendo de grande importância por infectar células animais e causar doenças como câncer em humanos (MENGUAL-CHULIÁ et al., 2012). Além disso, é causadora de papilomatose, que afeta vacas e causa perdas econômicas (LUNARDI et al., 2015). Tal incidência pode ter ocorrido pelo fato de os principais hospedeiros destes vírus ocorrerem em área de pastagem e, não infectando os animais presentes nas florestas.

Foram identificadas sequências de genomas virais de RNA tanto na amostra de pastagem, quanto na amostra de floresta. Essas sequências podem ter sido obtidas por meio de contaminação durante o processo de extração de DNA.

Os poucos trabalhos de diversidade viral em amostras de solo, observaram que a maioria dos vírus encontrados são pertencentes à ordem *Caudovirales*, como também verificado neste estudo (ADRIAENSSENS et al., 2015; ZABLOCKI et al., 2014). Entretanto nos trabalhos descritos pela literatura, para amostra de solos da Antártica e de deserto, a família *Siphoviridae* foi a mais abundante, ao passo que nos solos amazônicos, tanto de floresta como pastagem, foi *Myoviridae*.

O estudo da diversidade viral em ambientes aquáticos também revelaram maior abundância de vírus da ordem *Caudovirales*, entretanto as famílias mais abundantes, *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*, variou entre as diferentes amostras analisadas nos diferentes trabalhos (BENCH et al., 2007; BRUM et al., 2013; FANCELLO et al., 2013; ROSARIO et al., 2009).

A diversidade viral das amostras de solos amazônicos também foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão. Os vírus esféricos com diâmetro maior que 168 nm observados nos diferentes tipos de solo (exceto LVAd e PVAd de pastagem) são possivelmente pertencentes às diferentes famílias virais da ordem *Megavirales*, que possuem diâmetros que variam entre 150 nm e 500 nm (COLSON et al., 2012). Os vírus filamentosos observados com tamanho maior que 250 nm possuem morfologia semelhante à vírus da família *Inoviridae*, que infectam bactérias e à família *Lipothrixviridae*, que infectam arqueias (PIETILÄ et al., 2014).

Os agregados virais que puderam ser observados em todos os tipos de solo, exceto no solo Ftd de floresta, apresentam diversas partículas virais filamentosas (Figura 4-7). Esses agregados podem ter se formado em decorrência do pH baixo das amostras (FLOYD & SHARP, 1978), que variaram de 4,0 à 5,9 nos diferentes pontos amostrados (Tabela 1, material suplementar). A incidência de luz UV nos locais amostrados pode também ser um agente indutor da agregação das partículas virais, de modo que a formação destes agregados

dificulta a inativação dos vírus (MATTLE & KOHN, 2012), e confere a estes, resistência às ações de agentes químicos e físicos (FLOYD & SHARP, 1978).

Diferente do que foi observado no metagenoma, os bacteriófagos caudados não foram os tipos virais mais observados na análise morfológica. Provavelmente durante o processamento das amostras, esses vírus tiveram suas caudas separadas do capsídeo (WILLIAMSON et al., 2012; WILLIAMSON et al., 2005), ou estes estavam presentes no metagenoma na forma de profagos (ROHWER et al., 2009; CASJENS, 2003).

Poucos trabalhos de diversidade morfológica viral em amostras de solo foram realizados. SWANSON et al. (2009) ao estudar a diversidade e a abundância viral por microscopia eletrônica de transmissão em amostra de solo rizosférico, observaram que os bacteriófagos filamentosos e esféricos foram mais abundantes do que os bacteriófagos caudados, resultado também observado no presente trabalho. Entretanto, em um estudo realizado com diferentes tipos de solo, cultivo agrícola e de floresta, (WILLIAMSON et al., 2005), mostrou que os vírus da ordem *Caudovirales* foram os mais abundantes em todos os pontos amostrados, e que a família *Siphoviridae* foi a mais observada tanto nas amostras de floresta, quanto nas amostras de área de cultivo agrícola. Em tal estudo também foi possível verificar que a diversidade morfológica nas áreas de floresta foi maior que a diversidade nas áreas de cultivo agrícola.

Provavelmente esta diferença na diversidade viral observada nos ambientes, se deve ao fato de haver diferentes hospedeiros para os vírus. Com o avanço das tecnologias, a metagenômica tem ajudado nos estudos de diversidade viral, identificando vírus ainda não cultiváveis, que complementam resultados de estudo de diversidade viral obtidos por outras técnicas. É evidente nos diferentes trabalhos com metagenômica viral que os vírus da ordem *Caudovirales* são os mais abundantes nos ambientes de solo, mostrando-se presentes também vírus filamentosos. Este trabalho fez a análise de diversidade viral por microscopia eletrônica de transmissão e por meio do sequenciamento do metagenoma, em que foram identificados diferentes famílias virais, sendo estes principalmente de parasitas de células de bactérias e arqueias.

5 Conclusão

- A metagenômica mostrou que a amostra de solo de pastagem apresentou maior diversidade de famílias virais com relação à amostra de floresta;
- A maior parte das famílias virais identificada tem como principais hospedeiros, bactérias e arqueias.
- A metagenômica mostrou que os vírus da ordem *Caudovirales* foram os mais abundantes tanto na amostra de floresta, quanto na amostra de pastagem, entretanto pela análise morfológica os vírus caudados não foram os mais abundantes;
- Diferentes famílias de megavírus puderam ser identificadas nas análises do sequenciamento do metagenoma;
- Diversas partículas virais esféricas com diâmetro variando entre 170 nm e 480 nm puderam ser observadas na análise morfológica, possivelmente pertencentes às famílias virais dos megavírus, que também foram verificados pela metagenômica;
- As amostras de floresta apresentaram mais tipos morfológicos do que as amostras de pastagem.

6 Referências

- ADRIAENSSENS, E. M. et al. Metagenomic analysis of the viral community in Namib Desert hypoliths. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 480–495, 2015.
- BATISTELLA, M.; ROBESON, S.; MORAN, E. F. Settlement Design, Forest Fragmentation, and Landscape Change in Rondonia, Amazonia. **Photogrammetric engineering and remote sensing**, v. 69, n. 7, p. 805, 2003.
- BENCH, S. R. et al. Metagenomic characterization of Chesapeake Bay virioplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7629–7641, 2007.
- BREITBART, M.; ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 278–284, 2005.
- BRUM, J. R.; CULLEY, A. I.; STEWARD, G. F. Assembly of a Marine Viral Metagenome after Physical Fractionation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- CASJENS, S. Prophages and bacterial genomics: What have we learned so far? **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 277–300, 2003.
- CENCIANI, K. et al. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 907–916, 2009.
- CHEN, L. et al. Effect of different long-term fertilization regimes on the viral community in an agricultural soil of Southern China. **European Journal of Soil Biology**, v. 62, p. 121–126, 2014.
- CHENG, R.-L. et al. Brown planthopper nudivirus DNA integrated in its host genome. **Journal of virology**, v. 88, n. 10, p. 5310–8, 2014.
- CLEATOR, G. M.; KLAPPER, P. E. The Herpesviridae. **Principles and Practice of Clinical Virology. Fourth Edition**, v. 8, p. 19–21, 2002.
- COLSON, P. et al. Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order Megavirales. **Intervirology**, v. 55, n. 5, p. 321–332, 2012.

COLSON, P. et al. “Megavirales”, a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. **Archives of virology**, v. 158, n. 12, p. 2517–2521, 2013.

DE MIRANDA, E. E.; MATTOS, C. Brazilian rain forest colonization and biodiversity. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 40, n. 1-4, p. 275–296, 1992.

DÍEZ, D. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of virus assemblages present in a hypersaline environment. **International Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 159–164, 2000.

ELBREKI, M. et al. Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. **Journal of Viruses**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

ESPINOZA VILLAR, J. C., et al. Spatio-temporal rainfall variability in the Amazon basin countries (Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador). **International Journal of Climatology**, v. 29, p. 1574–1594, 2009.

FANCELLO, L. et al. Viruses in the desert: a metagenomic survey of viral communities in four perennial ponds of the Mauritanian Sahara. **The ISME journal**, v. 7, n. 2, p. 359–69, 2013.

FLOYD, R.; SHARP, D. G. Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH. **Applied and environmental microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1084-1094, 1978.

FOLEY, J. A et al. Amazonia revealed: forest degradation and loss of ecosystem goods and services in the Amazon Basin. **Front Ecol Environ**, v. 5, n. 1, p. 25–32, 2007.

GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms - A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 54–63, 2014.

GÓMEZ, P.; BUCKLING, A. Coevolution with phages does not influence the evolution of bacterial mutation rates in soil. **The ISME Journal**, v. 7, n. 11, p. 2242–2244, 2013.

HILL, S. C. et al. Discovery of a polyomavirus in European badgers (*Meles meles*) and the evolution of host range in the family Polyomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 2015, p. 1411–1422, 2015.

JIANG, S. C.; PAUL, J. H. Gene Transfer by Transduction in the Marine Environment Gene Transfer by Transduction in the Marine Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2780–2787, 1998.

JUNG, C.; JEONG, C.; YOON, T. Analyzing the DNA Sequences Differences of Family Adenoviridae to Track out the Inner Amine Protein Features by Using Apriori Algorithm. **Journal of Life Sciences and Technologies**, v. 2, n. 1, p. 32–37, 2014.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1033-9, Mar 2002.

KIM, Y. et al. Metagenomic Investigation of Viral Communities in Ballast Water. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 14, p. 8396–8407, 2015.

KIMURA, M. et al. Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 1–32, 2008.

LUNARDI, M. et al. Genetic diversity of bovine papillomavirus types, including two putative new types, in teat warts from dairy cattle herds. **Archives of Virology**, v. 161, n. 6, p. 1569-1577, 2016.

MATTLE, M. J.; KOHN, T. Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: Contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 18, p. 10022–10030, 2012.

MENGUAL-CHULIÁ, B. et al. Novel animal papillomavirus sequences and accurate phylogenetic placement. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 3, p. 883–891, 2012.

- MILLER, R. V. Environmental bacteriophage-host interactions: Factors contribution to natural transduction. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 141–147, 2001.
- MINEUR, F.; PROVAN, J.; ARNOTT, G. Phylogeographical analyses of shellfish viruses: inferring a geographical origin for ostreid herpesviruses OsHV-1 (Malacoherpesviridae). **Marine Biology**, v. 162, n. 1, p. 181–192, 2015.
- MIRZA, B. S. et al. Response of free-living nitrogen-fixing microorganisms to land use change in the amazon rainforest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 281–288, 2014.
- MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: The challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 497–505, 2010.
- MOSER, B. A. et al. Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 2, p. 283–297, 2001.
- MUNIESA, M.; COLOMER-LLUCH, M.; JOFRE, J. Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. **Future microbiology**, v. 8, n. 6, p. 739-751, 2013.
- NAVARRETE, A. A. et al. Land-Use Systems Affect Archaeal Community Structure and Functional Diversity in Western Amazon Soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 1, p. 1527–1540, 2011.
- PEAY, K. G.; BARALOTO, C.; FINE, P. V. A. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. **The ISME journal**, v. 7, n. 9, p. 1852–61, 2013.
- PEDLOWSKI, M. A. et al. Patterns and impacts of deforestation in Rondonia, Brazil. **Landscape and Urban Planning**, v. 38, n. 3-4, p. 149–157, 1997.

- PIETILÄ, M. K. et al. Archaeal viruses and bacteriophages: Comparisons and contrasts. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 334–344, 2014.
- PII, Y. et al. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403–415, 2015.
- PRANGISHVILI, D. Archaeal viruses: living fossils of the ancient virosphere? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1341, p. 35–40, 2015.
- PUNTES, R. et al. Comparison between DNA Detection in Trigeminal Nerve Ganglia and Serology to Detect Cattle Infected with Bovine Herpesviruses Types 1 and 5. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. e0155941, 2016.
- ROHWER, F.; PRANGISHVILI, D.; LINDELL, D. Roles of viruses in the environment. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2771–2774, 2009.
- ROHWER, F.; THURBER, R. V. Viruses manipulate the marine environment. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 207–212, 2009.
- ROSARIO, K. et al. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 2806–2820, 2009.
- ROUX, S. et al. Metavir: a web server dedicated to virome analysis. **Bioinformatics**, v. 27, n. 21, p. 3074-5, 2011.
- SANO, E. et al. Movement of viruses between biomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5842–5846, 2004.
- STRAND, M. R.; BURKE, G. R. Polydnviruses as symbionts and gene delivery systems. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. 5, 2012.
- SWANSON, M. M. et al. Viruses in soils: Morphological diversity and abundance in the rhizosphere. **Annals of Applied Biology**, v. 155, n. 1, p. 51–60, 2009.

WILLIAMSON, K. E.; HELTON, R. R.; WOMMACK, K. E. Bias in bacteriophage morphological classification by transmission electron microscopy due to breakage or loss of tail structures. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 4, p. 452–457, 2012.

WILLIAMSON, K. E.; RADOSEVICH, M.; WOMMACK, K. E. Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3119–3125, 2005.

ZABLOCKI, O. et al. High-level diversity of tailed phages, eukaryote-associated viruses, and virophage-like elements in the metaviromes of antarctic soils. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 22, p. 6888–6897, 2014.

7 Material Suplementar

AMOSTRA	pH
1	5,0
2	5,5
3	5,3
4	5,4
5	5,8
6	4,7
7	5,4
8	4,3
9	4,4
10	4,0
11	5,5
12	4,2
13	5,0
14	4,0
15	5,5
16	4,5
17	5,9
18	5,1
19	5,4
20	5,1

Tabela 1. Análise do pH dos vinte pontos amostrados de pastagem e floresta na bacia do rio Mutum Paraná - RO.

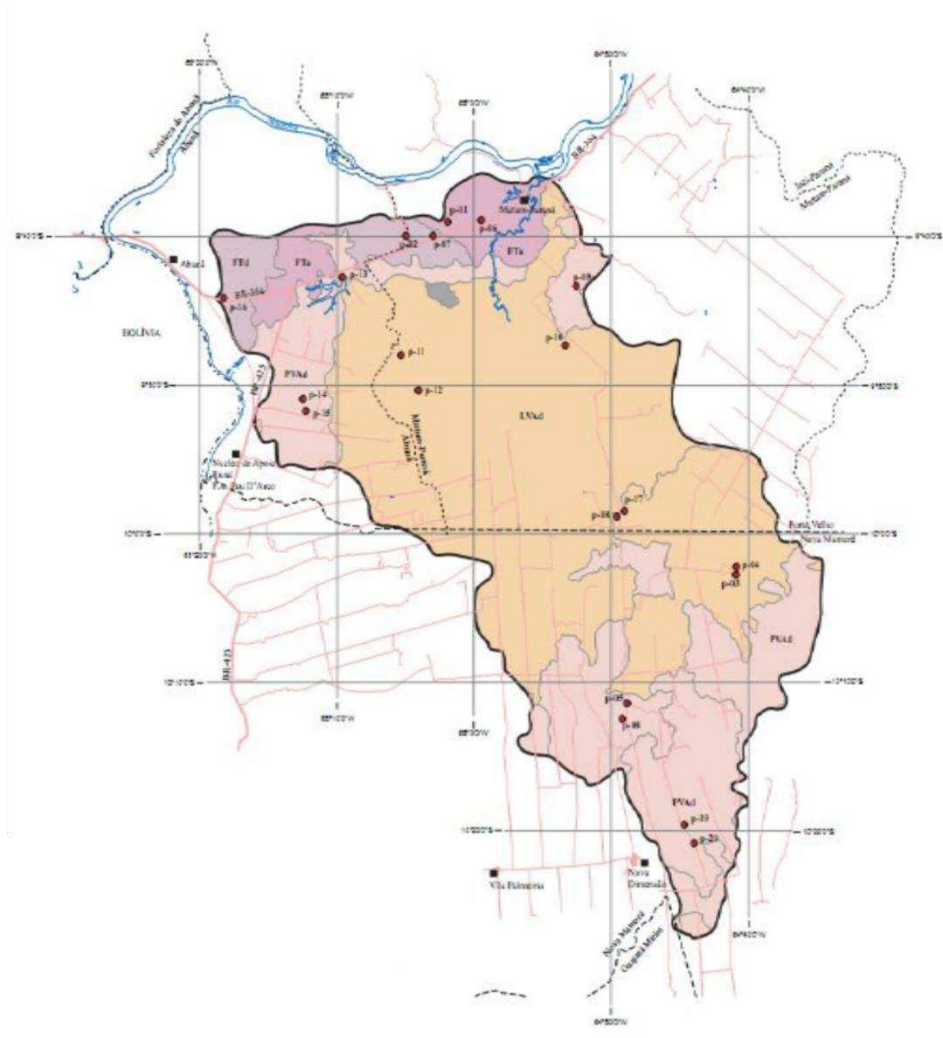


Figura 1. Mapa da bacia Hidrográfica do rio Mutum-Paraná com localização dos 20 pontos de coleta.

6. Conclusões gerais

- I. Apesar de o uso de PEG ser amplamente utilizado para fazer concentração viral, este estudo mostrou que dentre os três métodos selecionados, o PEG foi o que se mostrou mais inadequado para acessar a diversidade viral em amostras de solo;
- II. Entre a ultracentrifugação e a membrana HA, os melhores resultados tanto para a análise morfológica, quanto para a análise molecular, foram obtidos a partir da concentração com a membrana, que também é um método simples e acessível para estudos de diversidade viral;
- III. A diversidade viral no solo é influenciada pelo tipo de fertilizante utilizado nas áreas de cultivo agrícola;
- IV. A aplicação da adubação química e orgânica aumenta a diversidade viral em solos de cultivo agrícola;
- V. O uso somente do fertilizante orgânico pode não fornecer a quantidade de nutrientes necessários para o crescimento de micro-organismos;
- VI. As análises de sequenciamento do metagenoma mostram que vírus da ordem *Caudovirales* são os vírus mais abundantes nos solos de pastagem e floresta da Bacia Mutum Paraná, RO;
- VII. Diferentes famílias de megavírus são observados por MET e também nas análises do metagenoma de solos da Bacia Mutum Paraná, RO;
- VIII. As amostras de floresta da Bacia Mutum Paraná, RO, apresentam mais tipos morfológicos do que as amostras de pastagem.