

FLÁVIA DE OLIVEIRA SOUZA

**METAGENÔMICA DE VÍRUS PRESENTES EM RÚMEN DE BOVINOS
LEITEIROS**

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
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729m Souza, Flávia Oliveira, 1986-
2015 Metagenômica de vírus presentes em rúmen de bovinos
leiteiros / Flávia Oliveira Souza. – Viçosa, MG, 2015.
vi, 32f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Poliane Alfenas Zerbini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.28-32.

1. Rúmen - Microbiologia. 2. Bacteriófagos - Genética.
I. Universidade Federal de Viçosa. Microbiologia Agrícola.
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola.
II. Título.

CDD 22. ed. 579.26

FLÁVIA DE OLIVEIRA SOUZA

**METAGENÔMICA DE VÍRUS PRESENTES EM RÚMEN DE BOVINOS
LEITEIROS**

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: 28 de julho de 2015.

Francisco Murilo Zerbini Junior

Hilário Cuquetto Mantovani
(Coorientador)

Poliane Alfenas Zerbini
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por tornar esse sonho real e sempre iluminar meu camimnho;

Agradeço a minha mãe Ester e a minha irmã Hilda pela compreensão, incentivo, dedicação e amor incondicional em todas as etapas da minha vida; Vocês serão sempre o alicerce onde me apoiarei;

A minha família pelo carinho e apoio mesmo distantes;

Aos meus afilhados Clarinha, Luqinha e Walter Junio por fazerem os meus dias mais alegres! Saudade sempre;

A minha orientadora Poliane Alfnas Zerbini pela orientação, confiança, dedicação e por todos os ensinamentos;

As amigas de Sete Lagoas meesmo distantes nunca se fizreternosAos velhos amigos de Sete Lagoas que mesmo distante se fazem presente, pela confiança, paciência, conselhos, e por estarem dispostos a dividir todos os anseios vitórias;

Ao Robertinho pela disposição e disponibilidade durantes as microscopias;

Aos professores e funcionários do departamento de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos disponibilidade e amizade;

Aos profissionais do BIOAGRO;

Aos amigos do MIND Ana Paula, André, Fernanda, Fernandinha, Laiane, Lina e Rafael pelos momentos de companheirismo, ensinamentos, apoio e preocupação. Não sou obrigada!

Ao Professor Hilário Cuquetto Mantovani pelo apoio;

Aos amigos da Micro pelo companheirismo, estudos, risadas, choros, paciência. O mestrado não seria bom sem vocês!

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realizar esse curso;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade e à Capes pelo apoio financeiro;

Á todos aqueles que contribuíram para minha evolução profissional e pessoal nesses dois anos de curso.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
Metagenômica viral.....	8
Microbioma do rúmen.....	13
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Coleta de Líquido Ruminal.....	21
Purificação e Concentração Viral de Partículas Presentes na Fração Líquida..	21
Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	22
Extração de DNA Viral	22
Sequenciamento do Material Genético e Montagem	22
Análise Bioinformática.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
Purificação e Extração de DNA Viral Total.....	24
Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	25
Sequenciamento e Estimativa da Diversidade Viral do Rúmen	26
CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

RESUMO

Souza, Flávia de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Metagenômica de vírus presentes em rúmen de bovinos leiteiros.** Orientadora: Poliane Alfenas Zerbini. Co-orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

A microbiota do rúmen bovino é complexa, incluindo organismos dos três domínios da vida, potencial hospedeiros de vários vírus. A população viral do rúmen desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio da população bacteriana e na transferência horizontal de genes. Além disso, bacteriófagos pode ser usada como uma possível estratégia para a mitigação de metano. Isso requer a identificação de espécies de bacteriófagos que infectam a principal Archaea produtora de metano no rúmen. O objetivo deste estudo foi caracterizar o viroma do rúmen de bovinos leiteiros da Universidade Federal de Viçosa usando uma abordagem metagenômica. Para acessar a diversidade viral, nós sequenciamos (Illumina HiSeq2000) partículas vírus-like do líquido de rúmen de dois bovinos leiteiros (amostras 08 e 11). Cada biblioteca continha cerca de 49 milhões de sequências em pares. *De novo assembly* gerou 294.757 contigs para a amostra 08 e 193.262 para a amostra 11. Apenas 2% das sequências a partir de cada uma das duas amostras pode ser identificado através da comparação dos contigs com o banco de dados viral RefSeq, do NCBI. As famílias virais mais abundantes foram *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*. Para determinar se o alto número de contigs sem identificação eram possíveis sequências virais, alguns contigs das duas amostras que não mostraram nenhuma identidade com sequências depositadas no banco de dados foram escolhidos aleatoriamente e as ORF's presentes nesses contigs foram identificadas usando a ferramenta ORFinder. Similaridade com proteínas virais conhecidas, foram detectadas em todas os contigs, sugerindo que a diversidade viral no rúmen é em grande parte desconhecida. Mesmo com o recente avanço nas tecnologias modernas de sequenciamento pouco se avançou no sentido de elucidar a verdadeira importância dos bacteriófagos no funcionamento do ecossistema ruminal, com muitas sequências permanecendo desconhecidas.

Palavras-chaves: Metagenômica, rúmen, bacteriófagos

ABSTRACT

Souza, Flávia de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2015. **Metagenomics of Viruses Resident IN Dairy Cattle Rumen.** Adviser: Poliane Alfenas Zerbini. Co-adviser: Hilário Cuquetto Mantovani.

The microbiota of bovine rumen is complex, including organisms of the three domains of life, potential hosts of numerous viruses. The viral population of the rumen plays an important role in maintaining the balance of the bacterial population and in horizontal gene transfer. In addition, bacteriophages can be used as a possible strategy for methane mitigation. This requires the identification of bacteriophage species that infect the dominant methane-producing Archaea in the rumen. The purpose of this study was to characterize the rumen virome in dairy cattle from the University Federal of Viçosa using a metagenomic approach. To access the viral diversity we sequenced (Illumina HiSeq2000) virus-like particles from the rumen fluid of two dairy cattle (samples 08 and 11). Each library contained about 49 million pair-ended sequences. *De novo* assembly generated 294.757 contigs for sample 08 and 193.262 for sample 11. Only 2% of the sequences from each of the two samples could be identified by comparing the contigs with the viral RefSeq database of the NCBI. The most abundant viral families were *Siphoviridae*, *Myoviridae* and *Podoviridae*. To determine if the high number of contigs without a positive identification were possible viral sequences, some contigs that showed no identity from each of the two samples were randomly selected and the ORFs present in these contigs were identified using the ORFinder tool. Similarity to known viral proteins were detected in all contigs, suggesting that viral diversity in the rumen is largely unknown. Even with the recent advances in modern sequencing technology, little progress has been achieved towards elucidating the true importance of bacteriophages in the functioning of the rumen ecosystem, with many sequences remaining unknown.

Key words: Metagenomics, rumen, dairy cattle, phage.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Metagenômica viral

Metagenômica pode ser simplificada definida como o sequenciamento do material genético de micro-organismos presentes em amostras de um determinado ambiente, e a utilização de ferramentas de bioinformática para análise dos dados gerados pelo sequenciamento (Thurber *et al.* 2009). O uso da metagenômica ampliou o conhecimento sobre as comunidades microbianas, uma vez que permite a detecção e identificação de micro-organismos não cultiváveis. Para os micro-organismos celulares a caracterização metagenômica baseada no sequenciamento dos genes ribossomais (Goebel e Stackebrandt 1994, Seifert 2009) tem se mostrado eficiente. Entretanto, os vírus não possuem sequências universais conservadas, de forma que a metagenômica viral tem sido realizada a partir de amostras enriquecidas para partículas virais.

A metagenômica viral têm sido importante para a descoberta de novos vírus, bem, como para melhor caracterização de vírus que já foram relatados previamente. (Breitbart *et al.* 2002) foram os pioneiros na utilização dessa abordagem, utilizando-a na análise de comunidades virais marinhas. Os resultados desse estudo mostraram que mais de 65% das sequências virais geradas não foram significativamente semelhantes a sequências anteriormente relatadas, mostrando que a maior parte da diversidade viral nos ambientes estudados ainda não é totalmente caracterizada. Estima-se que cerca de 63 a 93% das sequências virais geradas através da abordagem metagenômica são desconhecidas (Sullivan 2015). Essa alta porcentagem de sequências desconhecidas obtidas a partir de viomas ambientais é consistente com dados obtidos de genomas virais bem caracterizados. Aproximadamente 30% das ORF (*Open Reading Frames*) presentes nos genomas virais sequenciados são “ORFans”, sem nenhuma identidade com sequências já conhecidas, comparado com apenas 9% de “ORFans” encontradas em genomas bacterianos (Yin e Fischer 2008).

As informações obtidas a partir dos estudos de metagenômica viral, tem sido aplicadas nas diferentes áreas de conhecimento. Informações sobre diversidade viral, estrutura das comunidades, biogeografia e transferência

horizontal de genes, tem ampliado o entendimento sobre a ecologia e evolução dos vírus (Liu *et al.* 2010).

A metagenômica também tem contribuído para estudos de interação e têm contribuído para um melhor entendimento da co-evolução entre vírus-hospedeiro. Como por exemplo estudo do sistema CRISPR em procariotos. O sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) em bactérias é um sistema de defesa antiviral encontrado em procariotos, onde sequencias virias são integradas no genoma do hospedeiro fazendo com que o hospedeiro se torne resistente à infecção viral (Horvath e Barrangou 2010). Estudos comparativos de sequencias ambientais virais com sequencias de procariotos tem permitido a identificação de possíveis hospedeiros para os vírus encontrados (Anderson *et al.* 2011, Sanguino *et al.* 2015) e se uma determinada população bacteriana já foi previamente infectada por fagos específicos (Kunin *et al.* 2008). Além disso, a análise comparativa de sequencias metagenômicas tem sugerido que mutações silenciosas e recombinação nos genomas virais são os principais mecanismos envolvidos para que os fagos consigam escapar da resistência do hospedeiro medida por CRISPR (Heidelberg *et al.* 2009).

Outra interação vírus-hospedeiro que tem sido bastante explorada por metagenômica é o estudo da lisogenia. Tem sido proposto que esta associação pode ser benéfica a ambos, vírus e hospedeiro e tem sido encontrada com maior frequência em ambientes extremos e oligotróficos (De Paepe *et al.* 2014, Paul 2008, Sime-Ngando 2014).

Uma das abordagens atuais da utilização da informação obtida a partir da metagenômica viral é o seu uso em pesquisas na área clínica, principalmente em casos difíceis de identificar o agente causador da enfermidade, sendo potencial método de diagnóstico, pois essa abordagem pode detectar todos os organismos presentes em uma amostra em uma única análise, além de também ser capaz de detectar características importantes como genes de resistência a antimicrobianos (Hall *et al.* 2015). Dados metagenômicos podem ajudar na identificação de novos vírus nos casos em que doenças possuem mais de uma agente etiológico, doenças e as variantes dominantes das espécies virais, além de indicar a frequência dos vírus encontrados na amostra. Por conseguinte, os dados podem ser usados para

desenvolver ensaios de diagnóstico mais precisos (Baldwin *et al.* 2014, Coetzee *et al.* 2010, Santiago-Rodriguez *et al.* 2015)

A metagenômica baseada no vetor (VEM) investiga a diversidade de vírus de que são transmitidos por insetos vetores, como a mosca branca. A utilização de VEM envolveu a amostragem de moscas brancas de diferentes culturas e lugares, seguida de purificação de partículas virais. Essa abordagem pode ser útil para descrever comunidades virais circulantes em uma dada região, aumentando a compreensão da diversidade dos vírus que infectam plantas (Ng *et al.* 2011).

Análises utilizando abordagem metagenômica envolvem três principais etapas: preparo da amostra, sequenciamento do material genético e análise por meio de ferramentas de bioinformática. Teoricamente, qualquer tipo de amostra pode ser estudada utilizando-se uma abordagem metagenômica. O processamento da amostra é a etapa crucial, uma vez que o isolamento de DNA ou RNA viral representativo de uma comunidade torna-se complicado devido ao pequeno tamanho dos genomas virais e pela presença de ácidos nucleicos “contaminantes” de bactérias e eucariotos. Dessa forma, a remoção do material genético de outros micro-organismos é essencial (Edwards e Rohwer 2005).

Vale ressaltar que na metagenômica viral essa primeira etapa se torna desafiadora, pois revela a necessidade de protocolos otimizados para a purificação e isolamento de partículas virais presentes nas amostras. A purificação é realizada através da combinação de filtração e centrifugação dependente de densidade, geralmente em gradiente de cloreto de cério ou sacarose, que tem como objetivo a amostra para partículas *virus-like* (Kristensen *et al.* 2010).

No entanto, algumas características virais influenciam diretamente na purificação. Os aspectos da biologia viral, tais como a ampla gama de tamanho, formas, densidades e sensibilidade das partículas à diferentes condições e a variação no tipo de genoma, dificultam a utilização de protocolos únicos. Dessa forma, as características dos vírus presentes na viral da amostra irá exigir modificações nos protocolos utilizados para concentração e extração virais, ou seja, a composição viral da amostra é que irá ditar qual protocolo deverá ser utilizado. Essa adaptação do protocolo se torna mais complicada quando há nenhum ou pouco conhecimento prévio a respeito das características virais amostrados (Thurber 2011).

A maioria dos vírus são menores que bactérias, porém pesquisas já mostraram a existência de vírus gigantes em vários ambientes. Esses vírus são perdidos na maioria dos protocolos, assim como vírus filamentosos. Além disso, vírus podem possuir envelopes e várias outras modificações em suas estruturas que podem ser sensíveis a algumas etapas dos protocolos usualmente utilizados. É importante que todas essas características sejam levadas em consideração durante um trabalho de metagenômica viral (Thurber *et al.* 2009).

O desenvolvimento das técnicas modernas de sequenciamento tem proporcionado a geração de dados de forma rápida e com alto rendimento. Uma das vantagens destes métodos em relação ao método tradicional (método de Sanger) é a determinação da sequência sem a necessidade de clonagem dos fragmentos de DNA. As plataformas de sequenciamento modernas utilizadas com mais frequência nos trabalhos de metagenômica viral são a Roche 454 e Illumina/Solexa, que permite o sequenciamento tanto do DNA quanto do RNA viral (Mokili *et al.* 2012).

Estas modernas tecnologias são capazes de sequenciar vírus de amostras ambientais sem a necessidade de técnicas trabalhosas para purificação, clonagem e *screening*. Essas novas tecnologias podem resultar na geração de sequências para todo o viroma de maneira não tendenciosa.

A análise dos dados gerados pelo sequenciamento muitas vezes é considerada o aspecto mais desafiador da metagenômica. Uma dificuldade encontrada na análise dos dados na metagenômica viral é o fato de que não há um elemento genético compartilhado por todos os vírus que possa ser usado como um marcador molecular, como é o caso do gene da subunidade menor do ribossomo, 16S e 18S utilizado nos estudos de procariotos e eucariotos, respectivamente. Análises de genomas completos indicam que há genes conservados entre os membros de um mesmo grupo taxonômico. Assim, esses genes são utilizados para analisar a diversidade entre os organismos que integram esse grupo (Breitbart e Rohwer 2005).

As tecnologias modernas de sequenciamento geram sequências conhecidas como *reads* que possuem tamanho bem curto quando comparadas com o tamanho das sequências geradas pela tecnologia de Sanger. A análise dessas sequências geradas requer métodos computacionais para dizer quais sequências constituem

genes. Essa etapa é complicada em estudos de metagenômica, que geram várias sequências fragmentadas. Assim, essa característica das novas tecnologias, juntamente com o fato de que em qualquer estudo as sequências analisadas podem ser derivadas de mais de um organismo diferente torna a montagem de sequências de genomas a partir dos dados de sequenciamento primário difícil e trabalhosa (Metzker 2010).

Apesar dos avanços para a obtenção e análise de meta-dados, as análises de viromas ainda é uma tarefa árdua e desafiadora para os virologistas, baseado principalmente na falta de ferramentas “amigáveis” e da baixa quantidade de bancos de dados específicos para a análise de sequências metagenômicas virais comparados com os bancos disponíveis para outros micro-organismos (Sullivan 2015). Algumas ferramentas como o MetaVir (Roux *et al.* 2014) e VIROME (Wommack *et al.* 2011) foram desenvolvidas para a análise de viromas, entretanto, devido ao número crescente de dados sendo analisados nestes bancos de dados eles já se encontram saturados.

Atualmente, para a análise das sequências geradas utiliza-se principalmente as variações do algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), que leva em consideração que os novos vírus apresentam alguma similaridade com os vírus já descobertos, já que essa ferramenta detecta similaridades entre a sequência estudada com sequências de genomas previamente disponíveis no banco de dados. Por exemplo, para determinar a presença de genes ou de regiões codificadoras, pode-se utilizar BLASTx ou BLASTp. Dessa forma, a detecção de vírus que pertencem a diferentes grupos taxonômicos ou completamente novos pode se tornar bem dificultoso (Bexfield e Kellam 2010). Para garantir que não haverá superestimação do número de sequências virais desconhecidas, é fundamental utilizar um banco de dados universal, que contenha genomas de procariotos, eucariotos e vírus, já que a amostra viral pode potencialmente estar contaminada com genomas dos seus hospedeiros (Mokili *et al.* 2012).

Enfim, a abordagem metagenômica têm conseguido superar as limitações dos métodos tradicionais utilizados para identificação de vírus de modo eficaz em amostras de vários ambientes, tais como, fezes, plantas, água do mar, amostras de tecidos humanos doentes, entre outros. Além disso, a metagenômica têm mostrado que diversidade viral que ainda não foi estudada e caracterizada é

gigantesca (Shi *et al.* 2015) e tem contribuído de maneira significativa para estudos que visam aumentar a compreensão a respeito de certas características dos vírus, tais como: ecologia, taxonomia, diversidade, distribuição geográfica, interação com hospedeiro. Os avanços neste campo irão beneficiar diversas áreas de pesquisa, além de que o desenvolvimento da metagenômica viral funcional torna possível a descoberta de novas enzimas virais, as quais podem ser utilizadas para fins de diagnóstico e biotecnológico.

Microbioma do rúmen

O rúmen é constituído pelo líquido ruminal, pela fase sólida que corresponde a fibra ingerida pelo animal e pelo gás gerado durante a fermentação da fibra pelos micro-organismos ruminais. As características do conteúdo ruminal é influenciado diretamente pela composição da dieta. A temperatura do rúmen é regulada pelo metabolismo do animal, variando entre 30° a 42° C e o pH tende a permanecer pH entre 5 a 7. O rúmen possui uma alta densidade de micro-organismos residentes que consiste de bactérias, protozoários, arqueas, fungos e vírus (Jami e Mizrahi 2012).

A comunidade de micro-organismos celulares do rúmen consiste de bactérias, arqueas e de eucariotos, protozoários e fungos. Bactérias e protozoários compõem aproximadamente 90% da biomassa microbiana

Os organismos ruminais são responsáveis por fermentar e degradar as fibras vegetais produzindo compostos como os ácidos graxos voláteis que são diretamente utilizados pelo animal ou por outros micro-organismos. Adicionalmente algumas bactérias servem como fontes de proteínas para o animal, enquanto alguns metabólitos são usados. Além disso, bactérias servem como fonte de proteínas para o animal (Weimer 2015).

Bactérias representam a maior parte da população total dos micro-organismos presentes no rúmen e abrange cerca de 200 espécies. As três principais espécies de bactérias que fermentam a celulose proveniente da alimentação no rúmen são *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*. Hemicelulose é outro componente comum derivado da alimentação dos animais e no rúmen sua degradação ocorre principalmente pela

ação de quatro bactérias: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*. Pectina é um terceiro tipo de carboidrato presente na alimentação de ruminantes, sendo *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multiparus*, *Succinivibrio dextrinosolvens* e *Fibrobacter succinogenes* as principais bactérias envolvidas na degradação desse composto (Zhou *et al.* 2015).

Em adição a população bacteriana o rúmen também possui leveduras e fungos anaeróbios fibrolíticos como habitantes do rúmen que também desempenham um importante papel na degradação da fibra dentro do rúmen. Os fungos foram descobertos existir no rúmen bem depois das bactérias e protozoários, principalmente pelo fato de se acreditar que os fungos eram microorganismos eucariotos e por isso, não podiam existir em uma ambiente anaeróbio como o rúmen. Além disso, geralmente os pesquisadores descartam a parte sólida do material ruminal que é o local onde se encontra os fungos que se associam com as fibras das plantas (Krause *et al.* 2014). Sabe-se da existência dos seguintes seis gêneros de fungos anaeróbicos no rúmen: *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces* e *Cyllamyces* (Fliegerova *et al.* 2015).

A população de protozoários no rúmen é composta pelos flagelados e ciliados, sendo os últimos os mais abundantes. O tamanho dos ciliados do rúmen varia de 18 a 500µm. Acredita-se que esse protozoários sejam classificados em pelo menos 5 famílias e contém 24 diferentes gêneros. Os gêneros mais comuns de protozoários ciliados ruminais são *Entodinium*, *Isotricha* e *Dasytricha* (Wright 2015). Sabe-se que esses protozoários presentes no rúmen apresentam diferentes especificidades no comportamento alimentar e nas atividades metabólicas, desempenhando assim diferentes papéis na manutenção da fisiologia ruminal. Os protozoários estão ativamente envolvidos também na ingestão e degradação das bactérias, utilizando-as como fonte de proteínas e aminoácidos. Dessa forma, os protozoários então envolvidos diretamente no metabolismo do nitrogênio do hospedeiro (Jouany 1996).

Outro aspecto importante a respeito da microbiota ruminal se trata do metano derivado dos ruminantes e seu impacto ambiental. Arqueas metanogênicas são os principais organismos produtores de metano no rúmen e atualmente, há 120 espécies de organismo produtores de metano no rúmen. Metanogênicos

necessitam de diferentes substratos para a produção de metano e da presença de bactérias e protozoários ciliados. A arquea produtora de metano mais abundante no rúmen é a *Methanobrevibacter*. Os metanogênicos não são capazes de degradar moléculas complexas como a glicose e por isso dependem que outros organismos ruminais forneçam substratos para a metanogênese, relação conhecida como transferência de hidrogênio interespecies. A produção de metano no rúmen é uma via comum da fermentação ruminal e faz com que o hidrogênio produzido pelas bactérias e protozoários seja utilizado pelas arqueas na redução do dióxido de carbono na produção de metano, mantendo assim um baixo nível de hidrogênio no rúmen. A produção de metano leva a perda de 2 a 12% de energia em ruminantes, que gera prejuízos econômicos. Dessa forma estratégia para mitigação de metano em ruminantes tem sido bastante estudada (Cersosimo e Wright 2015).

Dessa forma torna-se claro que a capacidade dos ruminantes de utilizar uma grande variedade de alimentos é devida ao diversificado ecossistema microbiano do rúmen. Essas relações são tão diversas e complicadas que se torna praticamente impossível quantificar o papel desempenhado por qualquer grupo em particular de micro-organismos presentes no rúmen (Kamra 2005).

Dessa forma os conhecimentos sobre a diversidade do microbioma ruminal tem fornecido informações importantes sobre ecologia microbiana. Além disso, alterações nos tipos e quantidades alimentos e água fornecidos permite o estudo da variação das comunidades virais durante o ciclo de alimentação. Animais alimentados com a mesma dieta podem apresentar diferenças nas composições de comunidades microbianas. As diferenças encontradas nas composições das comunidades microbianas têm impulsionados novos estudos metagenômicos na tentativa de elucidar quais fatores tem maior influência nessas comunidades (Jami e Mizrahi 2012).

Os trabalhos que têm utilizado as técnicas modernas de sequenciamento juntamente com outras técnicas têm se preocupado em mostrar novas características do microbioma ruminal. O pirosequenciamento do gene 16S, da subunidade menor do ribossomo bacteriano forneceu a identidade taxonômica de bactérias e arqueas ao nível de gênero. Além disso, o pirosequenciamento gerou sequências metagenômicas que ajudarão a prever as características funcionais do microbioma ruminal, além de também ser utilizado para a montagem de genomas

de organismos individualmente, diferentemente do que acontece nos estudos de caracterização viral (McCann *et al.* 2014).

A metagenômica se mostrou útil ao fornecer os genomas seis organismos metanogênicos pertencentes a família *Methanobacteriaceae*, incluindo genomas de organismos que estão presentes em baixas quantidades no rúmen. *Methanobrevibacter ruminantium* foi o primeiro organismo metanogênico do rúmen a ter o genoma completamente sequenciado e aparenta possuir uma diversidade maior de genes relacionados a proteínas de adesão que outros micro-organismos. A descoberta dessas proteínas forneceu possíveis alvos na superfície da célula que possam ser usados no desenvolvimento de vacinas que podem inibir organismos metanogênicos no rúmen, e como consequência diminuir as emissões de metano (Chaucheyras-Durand e Ossa 2014).

O North American Consortium for Genomics of Fibrolytic Ruminant Bacteria (<http://jcv.org/rumenomics/>), foi criado em 2000 com o intuito de facilitar o sequenciamento e anotação de genomas de bactérias ruminais degradantes de fibras, levando ao sequenciamento de genomas completos de bactérias ruminais como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Prevotella ruminicola*. Atualmente há aproximadamente 38 genomas de bactérias e arqueas disponíveis para consultas. Além disso, o projeto Hungate1000, tem como objetivo sequenciar mil genomas de micro-organismos ruminais, incluindo bactérias, arqueas metanogênicas, fungos anaeróbicos e protozoários ciliados (Denman e McSweeney 2015). Existem 234 genomas disponíveis como parte do projeto Hungate1000 (<http://www.hungate1000.org.nz/>), sendo 221 genomas bacterianos, 5 de arqueas, 1 genoma de fungo e 7 genomas virais.

Os estudos pioneiros sobre vírus presentes no rúmen mostraram com o auxílio de microscopia de transmissão grande diversidade de bacteriófagos do rúmen de ovinos e caprinos, identificando vinte e seis tipos de morfologias diferentes, com vários bacteriófagos possuindo características morfológicas incomuns. Devido à presença de grande número de bacteriófagos no rúmen seria indicativo de que esse vírus poderiam contribuir de maneira significativa na taxa de lise das bactérias ruminais, mantendo o equilíbrio nas comunidades microbianas ruminais (Klieve e Bauchop 1988). Alguns anos depois houve

evidências da presença de três famílias virais no rúmen: Myoviridae, Siphoviridae e Podoviridae (Klieve *et al.* 1996)

Mesmo com o aumento do uso da metagenômica para investigação de vírus em diferentes ambientes, estudos sobre vírus de rúmen são escassos. Atualmente, as pesquisas têm se dedicado a elucidar as características de bactérias e arqueas ruminais, devido a sua ligação com características econômicas e ambientais importantes, tais como eficiência da conversão alimentar, produção de metano e recentemente descoberta de micro-organismos e enzimas que permitem a fermentação da biomassa para a produção de biocombustíveis (Ross *et al.* 2012).

Miller *et al.* (2012) observaram, utilizando técnicas modernas de sequenciamento, elevada diversidade viral em líquido ruminal. Aproximadamente, 78% das sequências não obtiveram homologia com nenhum vírus descrito anteriormente. Houve grande número de sequências, possivelmente, relacionadas ao metabolismo de DNA e proteínas e, diferentemente do esperado, baixa proporção de sequências atribuídas ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Além disso, os autores acreditam que a maioria dos elementos genéticos, preditos serem profagos, são originados de hospedeiros classificados dentro dos filos *Fimicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. As famílias virais de bacteriófagos mais encontradas foram: *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*. Consistentemente, acredita-se que os hospedeiros para essas três famílias virais são principalmente os *Fimicutes* e *Proteobacteria*.

Ross *et al.* (2013), através de abordagem metagenômica, realizou anotação de quatorze possíveis fragmentos de sequências virais em contigs com um tamanho maior que 30 kpb. Muitos desses possíveis genes, presentes nos *contigs* montados, não mostraram homologia com genes previamente anotados, indicando a necessidade de trabalhos para anotar totalmente as funções codificadas nos genomas virais. A abundância das sequências nos *contigs* variaram significativamente entre os animais da mesma idade, estágio de lactação e condições nutricionais. Além disso, estes autores realizaram a análise funcional dos genomas virais, presentes no líquido ruminal, que mostrou expressivas semelhanças entre todas as amostras virais e que eram, funcionalmente, distintas das amostras do microbioma desse mesmo rúmen.

Dessa forma, a importância real das interações entre os fagos e seus hospedeiros e sua relação com a nutrição e com o funcionamento do ecossistema ruminal permanece indefinida, mas acredita-se que esses vírus estejam envolvidos na manutenção do número de bactérias e na transferência de genes entre os microorganismos do ecossistema ruminal (Gilbert e Klieve 2015). A expectativa gira em torno de que os recentes avanços nas técnicas de sequenciamento e de montagem de genomas possam permitir o sequenciamento dos viromas de um número maior de animais, resultando na obtenção de maiores conhecimentos a respeito da variação viral natural entre os animais, contornando a atual falta de dados a respeito do viroma ruminal (Ross *et al.* 2013).

INTRODUÇÃO

O rúmen é o primeiro compartimento do estômago de animais ruminantes, como bovinos, ovinos e caprinos e se trata de um órgão muscular grande e oco. O rúmen se desenvolve anatomicamente em tamanho, estrutura e atividade microbiana quando a dieta do bezerro é alterada de leite para alimentos secos, como a silagem. Este ambiente apresenta características próprias, tais como temperatura variando entre 30° a 42° C, pH entre 5 a 7 e ausência de oxigênio (Chaucheyras-Durand e Ossa 2014).

Estas características tornam o rúmen um ambiente propício para o desenvolvimento de populações microbianas anaeróbias, que irão auxiliar na degradação dos alimentos ingeridos por meio da fermentação, contribuindo para a geração de energia que será utilizada pelo animal. As populações microbianas do rúmen são diversificadas, complexas e se relacionam umas às outras para garantir o equilíbrio populacional das espécies envolvidas e, conseqüentemente, a sobrevivência destas (Ishler *et al.* 1996).

Além disso, estes organismos se relacionam com o animal (simbiose) o que é essencial para a manutenção do equilíbrio corporal deste. Os ruminantes são capazes de aproveitar os nutrientes da digestão microbiana e utilizá-la para a produção de carne, leite, lã, entre outros. A diversidade destas populações está relacionada à complexidade do alimento (substrato) ingerido pelo animal e são encontrados micro-organismos de diferentes grupos como bactérias, arqueas, protozoários, fungos, e vírus. (Deng *et al.* 2008). Adicionalmente, os micro-organismos ruminais estão propensos a sofrer digestão peptídica, servindo assim como fonte de proteínas para o animal hospedeiro (Dewhurst *et al.* 2000).

Estudos sobre a população viral do rúmen são limitados a bacteriófagos, estima-se que a população viral esteja entre 3×10^9 a $1,6 \times 10^{10}$ partículas virais (Klieve e Swain 1993). Entretanto esses trabalhos não representam a real diversidade dos vírus presentes nesse ambiente, uma vez que se limitam a bacteriófagos. A carência de trabalhos nesta área, destacando os vírus que infectam protozoários, fungos e arqueas presentes no rúmen indica a necessidade de trabalhos que têm como objetivos aumentar o nível de conhecimento sobre a caracterização deste viroma.

Delwart (2007) ao revisar as principais características da metagenômica viral, destacou a importância da utilização dessa abordagem em animais selvagens e domesticados, que estão sujeitos às mudanças ambientais ou condições de superlotação, situações que podem estar ligadas a aceleração da transmissão e evolução virais.

Vírus são determinantes para a evolução de comunidades microbianas nos mais variados ambientes. Eles desempenham um papel importante no controle do número de micro-organismos em um sistema, naturalmente selecionando aqueles que são resistentes ao vírus e facilitando a transferência horizontal de genes. (Rohwer *et al.* 2009).

Análise metagenômica de vírus sugere novos padrões de evolução, alterações nos padrões existentes na composição do ecossistema viral e revela novos grupos de vírus, além de agentes semelhantes a vírus. A principal finalidade da metagenômica viral é o estudo da totalidade de partículas *virus-like* isoladas, a partir de uma amostra ambiental, seguindo, principalmente, os protocolos desenvolvidos para a purificação de partículas de fagos de DNA (Kristensen *et al.* 2010). Isso pode explicar, em parte, o fato das análises dos vírus do líquido ruminal serem limitadas a bacteriófagos, não havendo relato da presença de outros tipos virais nesse ambiente.

Neste sentido, a presença de significativa variedade de vírus no rúmen é indicativo de que esses organismos são importantes nas interações do ecossistema ruminal e que desempenham importante papel na regulação e dinâmica da população hospedeira. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo caracterizar vírus presentes no líquido ruminal de bovinos leiteiros utilizando a abordagem metagenômica.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Líquido Ruminal

Foi coletado o líquido ruminal (LR) de dois bovinos leiteiros fistulados na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite da Universidade Federal de Viçosa (UEPE-GL/UFV). Um dos animais, identificado como 11, estava no período pré-parto e sua alimentação consistia de 3 quilos de ração e silagem de milho. O outro animal (08) estava no período de baixa produção de leite (período seco) e sua alimentação consistia de um quilo de ração adicionado de silagem de milho. Os dois animais foram amostrados no mesmo dia.

Purificação e Concentração Viral de Partículas Presentes na Fração Líquida

Foram coletados a fração líquida e sólida do rúmen. Imediatamente após a coleta, as frações sólidas foram armazenadas a -20° e as frações líquidas aquecidas a 75°C , por 20 minutos, para eliminar a atividade de nucleases possivelmente presentes no líquido ruminal.

O protocolo para purificação e a concentração de partículas virais presentes na fração líquida foi adaptado a partir do método descrito por Klieve e Swain (1993). Após o aquecimento amostras foram centrifugadas duas vezes a $20.000\times g$, por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em membranas estéreis com tamanho de poro igual a $0,45\mu\text{m}$.

Após filtração as partículas virais foram concentradas por ultracentrifugação a $51.000\times g$ por 2 horas a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1ml de tampão SM (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO_4 e 0,01% de gelatina) e incubado *overnight* a 4°C . Após incubação, cada tubo teve seu volume completado para 25ml com TE e a amostra foi mais uma vez ultracentrifugada utilizando os mesmos parâmetros descritos acima. O precipitado viral foi ressuspenso em 500 μl de tampão PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2 mM, Na_2HPO_4 9 mM e KH_2PO_4 1mM). No final do procedimento de purificação a amostra foi filtrada em membranas estéreis com

tamanho de poro igual a 0,22 μm . As amostras foram armazenadas em tubos estéreis a 4°C.

Análise Morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliar se a preparação estava enriquecida para partículas virais, 5 μl das amostras purificadas foram utilizadas para preparação das grids, como descrito em Souza *et al.* (2007) e visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão (Zeiss Libra 109). O preparo e a visualização das amostras foram realizados no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) da Universidade Federal de Viçosa.

Extração de DNA Viral

Para minimizar a contaminação das amostras com ácido nucléico não viral, antes da extração de ácido nucléico, 1000 μl das amostras foram tratadas com 2 μl RQ1 RNase-Free Dnase (Promega) e incubadas a 37°C por 30 minutos. A inativação da DNase se deu na presença de 2 μl de Stop Solution, por 30 minutos a 65°C. Em seguida a amostra foi tratada com RNase (Sigma-Aldrich), concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora, seguida da incubação por 30 minutos a 65°C. As amostras foram armazenadas a 4°C.

A extração do DNA viral (DNA ou RNA) foi realizada pelo do método da Proteinase K, como descrito em Sambrook e Russell (2001).

A análise da presença de material genético no estoque de purificado viral, na amostra após tratamento com DNase e RNase e do material genético extraído das partículas virais foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (0,8%).

Sequenciamento do Material Genético e Montagem

O sequenciamento dos ácidos nucléicos virais extraídos do líquido ruminal foi realizado utilizando-se o sistema HiSeq 2000 da plataforma Illumina

(Macrogen Inc.). Os dados gerados pelo sequenciamento foram computacionalmente analisados para a montagem dos contigs utilizando o algoritmo *de novo assembly* do programa CLC Genomics Workbench 6.5.1 assembler (CLC bio, Aarhus, Denmark). As sequências de reads foram montadas considerando parâmetros rigorosos, no qual 90% de cada “read” possuiu uma cobertura e identidade de 90% com outra read.

Análise Bioinformática

A anotação dos contigs foi realizada utilizando o algoritmo BLASTn e BLASTx do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a determinação da presença de motivos conservados nos contigs gerados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação e Extração de DNA Viral Total

Com o objetivo de analisar a comunidade de vírus presentes no líquido ruminal de bovinos leiteiros, foram coletadas amostras de duas vacas fistuladas em diferentes estados fisiológicos, uma no período seco (amostra 08) e outra no período pré-parto (amostra 11). Partículas virais foram concentradas e tratadas com DNase e RNase. A eletroforese em gel de agarose dos purificados virais tratados e não tratados mostrou uma diminuição significativa na quantidade de material genético contaminante, ainda que não tenha sido possível sua total eliminação (Figura 1). Esse fato pode ser explicado devido a grande presença de ácidos nucleicos não viral associados a proteínas, que podem estar presentes na amostra. Mesmo com a adição de quantidades crescentes das enzimas não foi possível observar um aumento na eliminação destes ácidos nucleicos, provavelmente devido ao aumento na proporção de glicerol presente na amostra o que dificulta a ação das enzimas. De fato, tem sido relatado que uma das etapas mais desafiadoras no preparo da amostra para análise de metagenomas virais é a eliminação de material genético não viral (Hall *et al.* 2014).

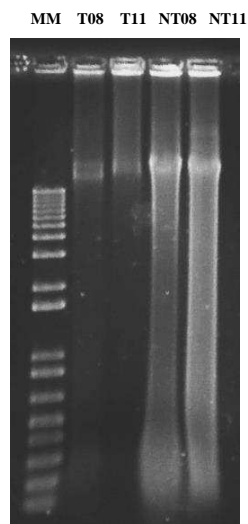


Figura 1- Análise da presença de DNA não viral nas amostras. MM- Marcador Molecular; T- Amostras tratadas com DNA/RNase; NT- amostras purificadas não tratadas.

Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de ambas amostras por microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de partículas *virus-like* com diferentes morfologias, indicando que a preparação estava enriquecida para partículas virais. Foi observada uma predominância de partículas icosaédricas em relação às partículas filamentosas. Apesar da detecção das partículas virais a visualização de estruturas virais que podem ser utilizadas como critérios para classificação não foi possível, provavelmente devido à natureza da preparação viral, que é apenas uma preparação rápida para concentração de partículas *virus-like*, como mostrado na figura 2.

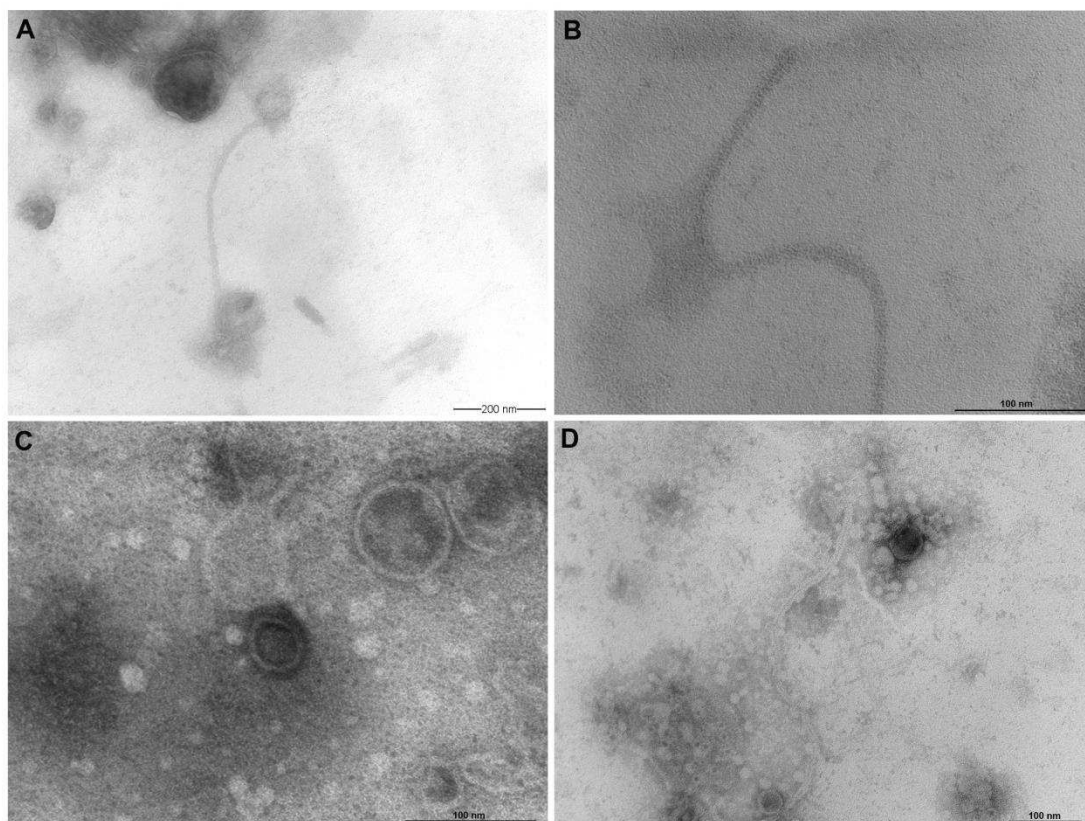


Figura 2- Microscopia eletrônica de transmissão mostrando diversidade morfológica de partículas *virus-like* nas amostras ruminais. A e B, Purificado obtido a partir da amostra 08; C e D, Purificado obtido a partir da amostra 11.

Sequenciamento e Estimativa da Diversidade Viral do Rúmen

Uma vez confirmada a presença de partículas *virus-like*, o DNA das amostras foi extraído e sequenciado. Foram geradas 49.783.046 e 49.587.176 reads em pares para amostra 08 e 11, respectivamente. As reads foram montadas por *de novo assembly* e analisadas utilizando CLC Genomics Workbench version 5.1 (CLCBio). Para a amostra 08 foram obtidos 294.757 contigs e para a amostra 11.

Para determinar o perfil geral dos contigs presentes nas duas amostras ruminais, os contigs obtidos foram comparados com sequências genômicas de arqueas, bactérias, fungos, protozoários e vírus depositadas no banco de dados não redundante Reference Sequence (RefSeq) do NCBI. As comparações foram realizadas utilizando-se os algoritmos BLASTn e BLASTx.

Somente 4.230 contigs da amostra 08 e 4.644 contigs da amostra 11 apresentaram identidade com sequências genômicas já depositadas no banco de dados quando utilizou-se o algoritmo BLASTn (Tabela 1). Esses valores representam menos de 1% do total de contigs gerados. O restante dos contigs gerados não apresentaram identidade com nenhuma sequência depositada no banco de dados. Quando utilizou-se o algoritmo BLASTx foi observado que 14% dos contigs apresentaram alguma identidade com sequências depositadas no banco de dados (Tabela 1). Não foi realizada a análise para a amostra 11 utilizando-se o algoritmo BLASTx. Entretanto, os resultados obtidos para a amostra 08 mostram que o algoritmo BLASTx foi mais eficiente para a identificação de sequências obtidas a partir de amostras enriquecidas para sequências virais.

Entre os contigs que apresentaram identidade pelo BLASTn, 4.136 (97,7%) contigs da amostra 08, se relacionaram com genomas bacterianos depositados no RefSeq e somente 94 (2,25) foram identificadas como sequências virais. O mesmo padrão aconteceu com as sequências ruminais da amostra 11, onde dos 4.575 contigs (98,5%) foram identificados como sequências bacterianas e somente 69 (1,5%) se relacionaram a sequências virais.

Sequências virais geralmente representam uma proporção bem pequena de sequências conhecidas em estudos metagenômicos. O alto número de sequências desconhecidas em análises metagenômicas virais é comum, podendo variar de aproximadamente 60 a 90% (Wommack *et al.* 2015; Rosario e Breitbart, 2011; Sullivan, 2015). Em um estudo de metagenômica ruminal 0,1% das sequências eram de origem viral, sendo que a maioria dessas sequências eram relacionadas a vírus de DNA fita dupla (Brulc *et al.* 2009).

Tabela 1. Análise dos contigs montados por BLASTn e BLASTx

Amostra	BLASTn		BLASTX	
	Hits	No hits	Hits	No hits
08	4.230 (1,4%)	290.527 (98,5%)	42.772 (14,5%)	251.985 (85,5%)
11	4644 (2,4%)	188.618 (97,5%)		nd

Essa baixa quantidade de sequências virais, juntamente com o alto número de sequências que não apresentaram homologia com nenhuma sequência no banco

de dados evidencia um dos aspectos desafiantes da abordagem metagenômica, a falta de dados de referência. Estudos metagenômicos em fezes de humanos (Kim *et al.* 2011); estromatólitos (Desnues *et al.* 2008); relataram a presença de sequências desconhecidas em suas análises. Há vários fatores relacionados a metodologia que contribuem para o grande número de sequências desconhecidas: tipo de amostra, tamanho das reads geradas pela plataforma de sequenciamento, ferramentas utilizada para identificar homologias e o banco de dados utilizados como referência (Mokili *et al.* 2012).

O número de genomas de bacteriófagos depositados em bancos de dados é extremamente menor que o número de genomas bacterianos. Essa falta de informação se contrasta com a diversidade e abundância das populações de bacteriófagos descritas. O baixo número de sequências associadas a vírus durante os estudos de metagenômica pode ser atribuído ao pequeno tamanho do genoma dos bacteriófagos, que são bem menores que os genomas de bactérias e arqueas (Hatfull 2008). Os estudos metagenômicos geralmente incorporam material genético de bactérias e protozoários ruminais, e dependendo dos parâmetros de cobertura utilizados para o sequenciamento o número relativo de vírus pode ser subestimado. Além disso, muitas sequências relacionadas aos vírus encontradas em bancos de dados muitas vezes são classificadas como sequências bacterianas quando regiões de profagos ou genes associados a bacteriófagos são incorporados nos bancos de dados como parte do genoma bacteriano e não anotadas separadamente e submetidas como sequências relacionadas aos vírus (Gilbert e Klieve 2015).

Os genomas bacterianos que apresentaram homologia com as sequências das amostras do rúmen são pertencentes a bactérias sabidamente existentes no rúmen, tais como: *Eubacterium limosum*, *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Treponema saccharophilum*, *Ruminobacter sp* e *Selenomonas ruminantium* (Dados não mostrados).

A análise das 94 sequências virais da amostra 08 revelou a presença de bacteriófagos pertencentes às famílias *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Mimiviridae*, *Podoviridae* e *Phycodnaviridae*, além de bacteriófagos não classificados (Figura

4). As duas famílias viral com maiores porcentagens de representantes foram *Siphoviridae* e *Myoviridae*.

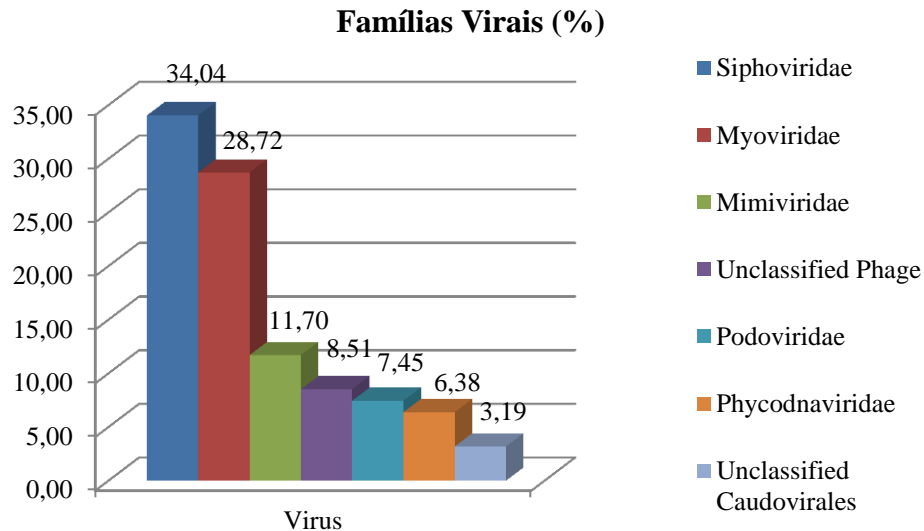


Figura 3 - Porcentagem famílias virais presentes na amostra 08

A amostra 11 apresentou um número menor de sequências virais, totalizando 69. Por comparação, *de novo assembly* dessa amostra também gerou um número menor de reads quando comparado com a amostra 08. A análise das 69 sequências virais revelou bacteriófagos pertencentes as seguintes famílias: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Mimiviridae*. Detectamos também a presença de bacteriófagos sem classificação taxonômica definida. As duas famílias virais mais abundantes nessa amostra foram *Myoviridae* e *Siphoviridae*, diferentemente da amostra 08 (Figura 4).

Famílias Virais (%)

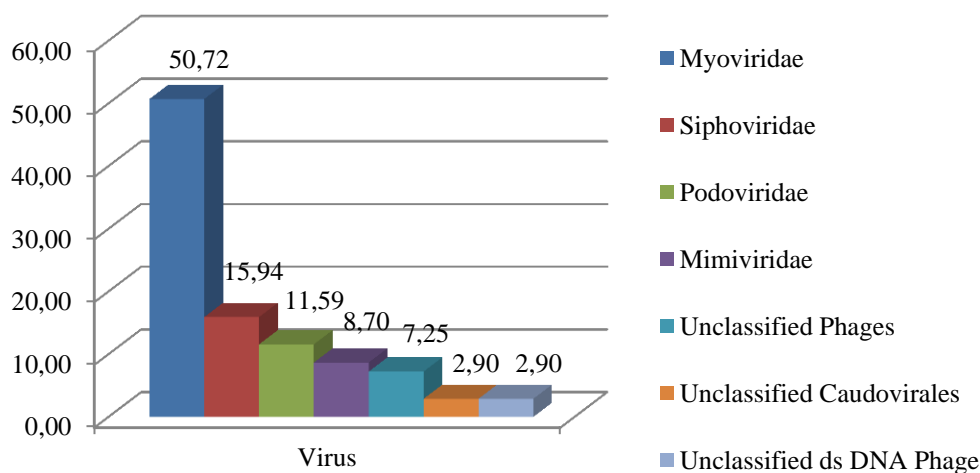


Figura 4- Porcentagem famílias virais presentes na amostra 11

Os primeiros estudos sobre bacteriófagos ruminais utilizando microscopia eletrônica revelaram a presença de vários vírus que representavam bacteriófagos caudados pertencentes às famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (RITCHIE *et al.* 1970) (Klieve e Bauchop 1988).

Entretanto, bacteriófagos pertencentes a outras famílias virais poderia estar presentes nas amostras ruminais examinadas, porém em uma quantidade bem menor ou talvez, não apresentassem características marcantes para que pudessem ser identificados (Gilbert e Klieve 2015).

Estudos mostraram grande diversidade viral em fezes de equinos com 69 tipos de bacteriófagos morfologicamente distintos. Esses resultados corroboram achados de análises metagenômicas em fezes de equinos que mostraram que o fago mais abundante da amostra representa somente 5 a 10% do total da população viral (Clokier *et al.* 2011).

Acredita-se que uma das funções dos bacteriófagos no ecossistema ruminal é a manutenção da diversidade da população bacteriana e a transferência horizontal de genes. Fagos líticos têm sido isolados de bactérias ruminais como *Streptococcus bovis* (Hegarty e Klieve 1999), *Ruminococcus albus* (Klieve *et al.* 2004), *Butyrivibrio fibrisolvens* (Klieve *et al.* 1989), *Prevotella ruminicola* (Klieve *et al.* 1991) e *Ruminococcus flavefaciens* (Klieve *et al.* 1989). Os dois fagos que não possuem morfologias típicas de fagos caudados incluem uma partícula filamentosa isolada de *Butyrivibrio fibrisolvens* e dois fagos líticos

filamentosos classificados taxonomicamente na família *Inoviridae*. A maioria dos fagos que infectam *S. bovis* pertencem as famílias *Siphoviridae* e *Podoviridae*. Estes bacteriófagos têm recebido bastante atenção devido à importância econômica dessa bactéria que tem sido associada com doenças metabólicas que afetam bovinos em dietas com alto teor de grãos. Além disso, *S. bovis* foi a primeira bactéria para a qual a terapia fágica foi considerada ser utilizada no rúmen (Nagaraja e Titgemeyer 2007, Tarakanov 2006)

Interessantemente, as duas amostras ruminais mostraram homologia com genomas de vírus que infectam eucariotos pertencentes a família *Mimiviridae*. Esses vírus também são conhecidos como gigantes e refutam o conceito inicial que os vírus são organismos filtráveis, pois suas partículas permanecem retidas. Essa característica dos vírus gigantes desfazem os conceitos sobre os limites de tamanho viral e celulares (Yutin *et al.* 2014). Nesse contexto, a presença de sequências relacionadas aos vírus gigantes indica que o DNA desses vírus permaneceu nas amostras após o tratamento com DNase e RNase.

Para avaliar o quanto a “variável” banco de dados afeta os resultados das análises metagenômicas, realizamos um BLASTn das sequências dos contigs gerados nas amostras somente com as sequências virais depositadas no RefSeq. Apenas 292 sequências da amostra 08 obtiveram identidade com sequências do banco de dados e 286 para a amostra 11. Apesar de observar um aumento, a porcentagem de sequências virais identificadas a partir do RefSeq ainda permaneceram baixas. Entretanto, foi possível observar um aumento no número de famílias identificadas, sendo possível identificar contigs com identidade com vírus famílias *Inoviridae*, *Baculoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae* e *Papillomaviridae*.

Para determinar se o alto número de contigs sem identidade são possíveis sequências virais, alguns contigs que não apresentaram identidade de ambas amostras foram selecionados aleatoriamente e as ORFs presentes nestes contigs foram identificadas utilizando-se a ferramenta ORFinder. A análise mostrou que em todos os contigs selecionados aleatoriamente é possível encontrar ORFs que apresentam similaridade com ORFs virais (Tabela 2).

Nesse sentido, análises futuras serão necessárias para a anotação total dos genomas desses vírus presentes no rúmen na tentativa de esclarecer a diversidade

desse viroma. O grande número de sequências geradas faz necessário o desenvolvimento de estratégias práticas, não tendenciosas e confiáveis.

Tabela 2. Identificação de ORFs nos contigs “no hits”

Contig	Tamanho (nt)	Cobertura	no aa da ORF predita	Proteína	no acesso GB
Amostra 08					
505	12.072	608,13	304	proteína de montagem (Phi 29)	PHA00147
6300	3130	464,06	194	exonuclease DexA (phage mEp460)	YP_007112100
372	2487	593,33	620	Cauda viral Achromobacter phage JWX	AJD82793.1
185	825	572,15	123	Terminase Lactobacillus hokkaidonensis JCM 18461	BAP85964
4384	1578	477,04	413	Proteína V LambdaW5	ADO47400.1
1790	1318	696,25	221	Terminase viral Bacillus phage Bcp1	YP_009031337
Amostra 11					
123	12.721	11.463,84	921	Primase de Liberibacter phage SC2	YP_007011123
227	2.763	3.364,60	311	Terminase Lactobacillus hokkaidonensis JCM 18461	BAP85964
158	16.907	1.301,40	628	Cauda de Clostridium sporogenes PA 3679	EHN13445
158	16.907	1.301,40	207	Endonuclease de uncultured Mediterranean phage uvMED	BAQ87774
13	1.084	757,22	104	Terminase de Paenibacillus phage HB10c2	AJD83014
5206	438	1.075,74	138	Proteína capsidial de uncultured Mediterranean phage uvMED	COG4626
26	15.010	2.029,36	549	Primase de Liberibacter phage SC2	BAR14852

CONCLUSÃO

Nesse trabalho realizamos a análise da diversidade viral do rúmen de dois bovinos. Os resultados sugerem que bacteriófagos pertencentes as famílias Siphoviridae e Myoviridae sejam predominantes nesse ambiente. Esses dados são condizentes com famílias virais de bacteriófagos que sabidamente infectam bactérias ruminais, indicando a conexão entre as populações virais e bacterianas ruminais. Mesmo com o recente avanço nas tecnologias modernas de sequenciamento pouco se avançou no sentido de elucidar a verdadeira importância dos bacteriófagos no funcionamento do ecossistema ruminal, com muitas sequências permanecendo desconhecidas. Apesar do pouco conhecimento, acredita-se que esses vírus são responsáveis por manter o equilíbrio da população bacteriana e o fluxo de material genético entre os micro-organismos nesse ambiente.

REFERÊNCIAS

- Anderson, R.E., Brazelton, W.J. and Baross, J.A. (2011) Using CRISPRs as a metagenomic tool to identify microbial hosts of a diffuse flow hydrothermal vent viral assemblage.
- Baldwin, D.A., Feldman, M., Alwine, J.C. and Robertson, E.S. (2014) Metagenomic Assay for Identification of Microbial Pathogens in Tumor Tissues. *mBio*, 5.
- Berg Miller, M.E., Yeoman, C.J., Chia, N., Tringe, S.G., Angly, F.E., Edwards, R.A., Flint, H.J., Lamed, R., Bayer, E.A. and White, B.A. (2012) Phage–bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environmental Microbiology*, 14, 207-227.
- Bexfield, N. and Kellam, P. (2010) Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *The Veterinary Journal*, 190, 191-198.
- Breitbart, M. and Rohwer, F. (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, 13, 278-284.
- Breitbart, M., Salamon, P., Andresen, B., Mahaffy, J.M., Segall, A.M., Mead, D., Azam, F. and Rohwer, F. (2002) Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 14250-14255.
- Brulc, J.M., Antonopoulos, D.A., Berg Miller, M.E., Wilson, M.K., Yannarell, A.C., Dinsdale, E.A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J.B., Wacklin, P., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Nelson, K.E. and White, B.A. (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 1948-1953.
- Cersosimo, L.M. and Wright, A.-D.G. (2015) Rumen Methanogens. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (Puniya, A.K., Singh, R. and Kamra, D.N. eds): Springer India, pp. 379.
- Chaucheyras-Durand, F.d.r. and Ossa, F. (2014) Review: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools, pp. 1-12.
- Clokier, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V. and Heaphy, S. (2011) Phages in nature. *Bacteriophage*, 1, 31-45.
- Coetzee, B., Freeborough, M.-J., Maree, H.J., Celton, J.-M., Rees, D.J.G. and Burger, J.T. (2010) Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400, 157-163.
- De Paepe, M., Leclerc, M., Tinsley, C.R. and Petit, M.-A.s. (2014) Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 39.
- Delwart, E.L. (2007) Viral metagenomics. *Reviews in Medical Virology*, 17, 115-131.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H. and Wanapat, M. (2008) The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular biology reports*, 35, 265-274.

- Denman, S.E. and McSweeney, C.S. (2015) The Early Impact of Genomics and Metagenomics on Ruminant Microbiology, pp. 447-465.
- Desnues, C., Rodriguez-Brito, B., Rayhawk, S., Kelley, S., Tran, T., Haynes, M., Liu, H., Furlan, M., Wegley, L., Chau, B., Ruan, Y., Hall, D., Angly, F.E., Edwards, R.A., Li, L., Thurber, R.V., Reid, R.P., Siefert, J., Souza, V., Valentine, D.L., Swan, B.K., Breitbart, M. and Rohwer, F. (2008) Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites. *Nature*, 452, 340-343.
- Dewhurst, R.J., Davies, D.R. and Merry, R.J. (2000) Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 85, 1-21.
- Edwards, R.A. and Rohwer, F. (2005) Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 504-510.
- Fliegerova, K., Kaerger, K., Kirk, P. and Voigt, K. (2015) Rumen Fungi. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (Puniya, A.K., Singh, R. and Kamra, D.N. eds): Springer India, pp. 379.
- Gilbert, R.A.; Klieve, A.V. (2015) Ruminant Viruses (Bacteriophages, Archaeophages). In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (Puniya, A.K., Singh, R. and Kamra, D.N. eds): Springer India, pp. 379.
- Goebel, B.M.; Stackebrandt, E. (1994) Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1614-1621.
- Hall, R. J., Wang, J., Todd, A. K., Bissielo, A. B., Yen, S., Strydom, H., & Peacey, M. (2014). Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *Journal of Virological Methods*, 195, 194-204.
- Hall, R.J., Draper, J., Nielsen, F. and Dutilh, B.E. (2015) Beyond research: a primer for considerations on using viral metagenomics in the field and clinic.
- Hatfull, G.F. (2008) Bacteriophage Genomics. *Current opinion in microbiology*, 11, 447-453.
- Hegarty, R.S. and Klieve, A.V. (1999) Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis: CSIRO, pp. 1315-1320.
- Heidelberg, J.F., Nelson, W.C., Schoenfeld, T. and Bhaya, D. (2009) Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS One*, 4, e4169.
- Horvath, P. and Barrangou, R. (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327, 167-170.
- Ishler, V.A., Heinrichs, A.J. and Varga, G.B. (1996) *From Feed to Milk: Understanding Rumen Function*: Pennsylvania State University.
- Jami, E. and Mizrahi, I. (2012) Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. *PLoS ONE*, 7, e33306.
- Jouany, J.-P. (1996) Effect of Rumen Protozoa on Nitrogen Utilization by Ruminants, pp. 1335S-1346S.
- Kamra, D.N. (2005) Rumen microbial ecosystem, pp. 124-135.

- Kim, M.-S., Park, E.-J., Roh, S.W. and Bae, J.-W. (2011) Diversity and abundance of single-stranded DNA viruses in human faeces.
- Klieve, A.V., Bain, P.A., Yokoyama, M.T., Ouwerkerk, D., Forster, R.J. and Turner, A.F. (2004) Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67: Wiley Online Library, pp. 333-338.
- Klieve, A.V. and Bauchop, T. (1988) Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle, pp. 1637-1641.
- Klieve, A.V., Gregg, K. and Bauchop, T. (1991) Isolation and characterization of lytic phages from *Bacterioides ruminicola* ssp. *brevis*: Springer, pp. 183-187.
- Klieve, A.V., Hudman, J.F. and Bauchop, T. (1989) Inducible bacteriophages from ruminal bacteria, pp. 1630-1634.
- Klieve, A.V. and Swain, R.A. (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry, pp. 2299-2303.
- Klieve, A.V., Swain, R.A. and Nolan, J.V. (1996) Bacteriophages in the rumen: types present, population size and implications for the efficiency of feed utilisation. In *Proceedings-australian society of animal production: australian society of animal production*, pp. 92-94.
- Krause, D.O., Nagaraja, T.G., Wright, A.D.G. and Callaway, T.R. (2014) Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. Madison, WI: American Society of Animal Science, pp. 331-341.
- Kristensen, D.M., Mushegian, A.R., Dolja, V.V. and Koonin, E.V. (2010) New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends in Microbiology*, 18, 11-19.
- Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K. and Hugenholtz, P. (2008) A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 72, 557-578.
- Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Cheng, J., Peng, Y., Ghabrial, S.A. and Yi, X. (2010) Widespread Horizontal Gene Transfer from Double-Stranded RNA Viruses to Eukaryotic Nuclear Genomes. *Journal of Virology*, 84, 11876-11887.
- McCann, J.C., Wickersham, T.A. and Loor, J.J. (2014) High-throughput Methods Redefine the Rumen Microbiome and Its Relationship with Nutrition and Metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 8, 109-125.
- Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies the next generation. *Nat Rev Genet*, 11, 31-46.
- Mokili, J.L., Rohwer, F. and Dutilh, B.E. (2012) Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology*, 2, 63-77.
- Nagaraja, T.G. and Titgemeyer, E.C. (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook 1, 2: Elsevier, pp. E17-E38.
- Ng, T.F.F., Duffy, S., Polston, J.E., Bixby, E., Vallad, G.E. and Breitbart, M. (2011) Exploring the Diversity of Plant DNA Viruses and Their Satellites Using Vector-Enabled Metagenomics on Whiteflies. *PLoS ONE*, 6, e19050.

- Paul, J.H. (2008) Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? *ISME J*, 2, 579-589.
- RITCHIE, A.E., ROBINSON, I.M. and ALLISON, M.J. (1970) Rumen bacteriophage: survey of morphological types. In *Microscopic Electronique* (Favard, P. ed. Paris: Societé Française de Microscopic electronique).
- Rohwer, F., Prangishvili, D. and Lindell, D. (2009) Roles of viruses in the environment. *Environmental Microbiology*, 11, 2771-2774.
- Ross, E., Moate, P., Bath, C., Davidson, S., Sawbridge, T., Guthridge, K., Cocks, B. and Hayes, B. (2012) High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing, pp. 53.
- Ross, E., Petrovski, S., Moate, P. and Hayes, B. (2013) Metagenomics of rumen bacteriophage from thirteen lactating dairy cattle, pp. 242.
- Roux, S., Tournayre, J., Mahul, A., Debross, D. and Enault, F.O. (2014) Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis: BioMed Central Ltd, pp. 76.
- Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Sanguino, L., Franqueville, L., Vogel, T.M. and Larose, C. (2015) Linking environmental prokaryotic viruses and their host through CRISPRs: The Oxford University Press, pp. fiv046.
- Santiago-Rodriguez, T.M., Ly, M., Bonilla, N. and Pride, D.T. (2015) The human urine virome in association with urinary tract infections.
- Seifert, K.A. (2009) Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1, 83-89.
- Shi, C., Liu, Y., Hu, X., Xiong, J., Zhang, B. and Yuan, Z. (2015) A Metagenomic Survey of Viral Abundance and Diversity in Mosquitoes from Hubei Province. *PLoS ONE*, 10, e0129845.
- Sime-Ngando, T.I. (2014) Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 5, 355.
- Souza, W. (2007) Técnica de microscopia eletrônica aplicada às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 357 páginas.
- Sullivan, M.B. (2015) Viromes, not gene markers, for studying double-stranded DNA virus communities. *Journal of Virology*, 89, 2459-2461.
- Tarakanov, B.V. (2006) The Phenomenon of Bacteriophagy in the Rumen of Ruminants.
- Thurber, R.V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L. and Rohwer, F. (2009) Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nature Protocols*, 4, 470-483.
- THURBER, Rebecca Vega. *Methods in Viral Metagenomics. Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats*, v. 2, p. 15, 2011.
- Weimer, P.J. (2015) Redundancy, resilience and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations.

- Wommack, K.E., Bhavsar, J., Polson, S.W., Chen, J., Dumas, M., Srinivasiah, S., Furman, M., Jamindar, S. and Nasko, D.J. (2011) VIROME: a standard operating procedure for analysis of viral metagenome sequences. *Standards in Genomic Sciences*, 6, 427-439.
- Wright, A.-D.G. (2015) Rumen Protozoa. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (Puniya, A.K., Singh, R. and Kamra, D.N. eds): Springer India, pp. 379.
- Yin, Y. and Fischer, D. (2008) Identification and investigation of ORFans in the viral world. *BMC Genomics*, 9, 24.
- Yutin, N., Wolf, Y.I. and Koonin, E.V. (2014) Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology*, 466- 467.
- Zhou, M., Chen, Y. and Guan, L.L. (2015) Rumen Bacteria. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (Puniya, A.K., Singh, R. and Kamra, D.N. eds): Springer India, pp. 379.