



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



NUREYEV FERREIRA RODRIGUES

**ANÁLISE METAGENÔMICA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO
APARELHO GENITAL DE BOVINOS SADIOS E ACOMETIDOS POR
DISTÚRBIOS REPRODUTIVOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

João Pessoa – PB

2013



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



NUREYEV FERREIRA RODRIGUES

**ANÁLISE METAGENÔMICA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO
APARELHO GENITAL DE BOVINOS SADIOS E ACOMETIDOS POR
DISTÚRBIOS REPRODUTIVOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: Prof. Dr. Savio Torres de Farias

João Pessoa - PB

2013

R696a Rodrigues, Nureyev Ferreira.
Análise metagenômica de comunidades microbianas do
aparelho genital de bovinos saudáveis e acometidos por distúrbios
reprodutivos / Nureyev Ferreira Rodrigues.-- João Pessoa,
2013.
48f. : il.
Orientador: Savio Torres de Farias
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Biologia celular e molecular. 2. Metagenômica.
3. Distúrbios reprodutivos - bovinos. 4. 16S rRNA.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



NUREYEV FERREIRA RODRIGUES

Dissertação de Mestrado avaliada em 19/04/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Fernando Marques-Santos

Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba

Presidente

Dr^a. Teresa Cristina Soares de Lima Grisi

Departamento de Biologia Molecular - Universidade Federal da Paraíba

Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Krystyna Gorlach-Lira

Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba

Examinador Interno

Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

Departamento de Biologia Molecular – Universidade Federal da Paraíba

Suplente

A ciência não é uma vaca sagrada. A ciência é um cavalo. Não o adores, simplesmente alimenta-o.

Abba Eban

(político e diplomata israelense)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela oportunidade de viver até aqui, tudo isso...

A minha mãe, Geny Ferreira de Sousa, não só pela metade dos genes que me deu, mas por sempre acreditar e investir na minha pessoa, nunca permitindo faltar nada em todo o tempo que estive em João Pessoa, fosse dinheiro, amor, carinho, conselho e repreensão; te amo muito minha mãe! Tudo o que eu fizer será pouco pelo que fez e tens feito por mim!

A minha esposa, Renata Kelly, pelo desprendimento e compreensão nos tempos que passamos longe e pelo amor e cuidado em todos os momentos. Sem você não seria o homem que sou. Não mereço tudo que fazes por mim, mas sempre tentarei retribuir a altura deste amor.

Ao meu pai, Aloysio Rodrigues de Sousa, pelo encorajamento e exemplo desde a graduação, para seguir na academia.

Aos meus irmãos, Natarajan, Natacha, Nabila, Neuza, Namíbia e Amanda Nara, pelo apoio incondicional.

A Lucimar Rodrigues, que carinhosamente chamamos “Dá”, por estar sempre cuidando de mim, como se fosse seu filho e agraciando-me ao chegar no Sertão, como as iguarias produzidas por suas mãos.

Ao meu avô, Joaquim Genésio de Sousa (*in memorian*), por sempre incentivar-nos a aprender sempre. Quando ainda lúcido, lembro-me da ocasião em que conversava com Natarajan e ele perguntou: - Joaquim, por quê lhe chamam de mestre? E ele respondeu: - Talvez porque construa (casas, igrejas, açudes, e muitas coisas)! Ele era chamado de “mestre”; eu também quis ser chamado assim, “construindo” o que ele sempre deu valor, o conhecimento.

A minha avó, Doninha, pelas orações e súplicas feitas para me guardar e iluminar, e pelo seu carinho e cuidado sem medidas.

A minha tia, Maria da Guia Duarte Nobre (*in memorian*), que sempre se doou por mim e pelos meus irmãos; até mesmo, quando em estado de saúde debilitado por um câncer no pâncreas, rogou a Deus pela minha defesa. Não pude retribuir tudo o que fizeste, mas fico feliz por ter estado junto, infelizmente, em seus últimos momentos, cuidando de você, assim como sempre fez conosco.

Ao meu tio Wilson Rodrigues de Sousa e sua esposa, minha “tia”, Genilda Coutinho Rodrigues, por terem me acolhido em sua casa e ter-me como um de seus filhos, tanto no tratamento, como no amor; nunca poderei pagar ou retribuir o que fazem por mim.

Aos meus primos, Dibs Coutinho Rodrigues, Keoma Coutinho Rodrigues e Goldie Coutinho Rodrigues, em especial aos meninos, por serem meus amigos e principalmente, meus irmãos, para todas as alegrias e tristezas.

A Luis Frederico Barbosa da Rocha e sua esposa, Ana Maria Bignotto da Rocha, por disponibilizarem seu tempo, conselhos, conhecimento e muitas vezes, seus bens, para que pudesse realizar esse mestrado. Tenho uma dívida eterna, com vocês!

A Maria do Socorro Pereira, por desde a minha graduação incentivar-me e dispor-se a ponto de deslocar-se de Cajazeiras - PB, para apresentar-me pessoalmente para Sávio, para que conseguisse orientador no programa.

A Sávio Torres de Farias, meu orientador, que apesar das nossas diferenças, demonstrou ser um homem íntegro e, na medida do possível, respeitoso quanto a minha crença. Obrigado por confiar-me tamanha responsabilidade e ajudar-me a crescer intelectualmente, mesmo nas minhas dificuldades, apostando na minha capacidade.

Ao meu amigo e irmão, Tarcisio Domingos Coutinho, por sempre ajudar sem pretensões, sempre ser disponível quando precisei, por confiar-me sua amizade e por ainda hoje ser um dos meus maiores incentivadores. Muito obrigado meu irmão!

Aos meus amigos, Jonathas Diego, Vanessa e Suellen, pelos momentos de risadas, brigas e construção de conhecimento.

A minha grande amiga, Ludmilla Maul, pela presteza, educação e atenção que sempre dispôs à minha pessoa... és uma mulher valorosa, tenho imenso prazer de tê-la como amiga!

Ao meu amigo Helton Charlyls Batista Cardôso, por ter compartilhado parte de seu tempo e conhecimento comigo.

Aos professores do PPGBM, Luis Fernando Marques-Santos, Krystyna Gorlach-Lira, Tatiane Santi Gadelha, Naila Francis Paulo de Oliveira, Márcia Rosa de Oliveira e Rômulo Marino Llamoca Zárate, por todo conhecimento transmitido em cada disciplina.

RESUMO

Distúrbios reprodutivos em bovinos podem ser causados por diversos patógenos, que poderiam já estar presentes no trato reprodutivos. A comunidade microbiana dos aparelhos reprodutivos, quando conhecida, pode fornecer informações a respeito da saúde do hospedeiro. A metagenômica tem sido utilizada para caracterizar e obter informações genéticas a respeito de comunidades microbianas de diversos ambientes, podendo relacionar determinadas doenças com alterações na composição das comunidades. Nesse trabalho, foram coletadas amostras de secreção de mucosa da superfície vaginal de 05 vacas sadias e 05 vacas que apresentaram sintomas de distúrbios reprodutivos. Amostras de DNA metagenômico foram extraídas das amostras de secreção e amplificadas com primers para as regiões V5-V6 do gene 16S rRNA e sequenciadas na plataforma “Ion Torrent Personal Genome Machine – PGM”. Os dados foram tratados para retirada de sequencias de baixa qualidade e quimeras, com o programa Mothur; em seguida, os dados foram lançados no Ribosomal Database Project para classificação das OTU’s. Blastn local foi efetuado e seus resultados foram carregados no programa MEGAN, para visualização de perfis taxonômicos e atributos microbianos. O perfil controle apresentou um total de 15 taxa, sendo os taxa *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* e *Victivallis*, os de maior representação de OTU’s; o perfil com distúrbios apresentou 68 taxa, sendo *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Histophilus*, *Victivallis*, *Alistipes*, e *Coriobacteriaceae*, os taxa com maior representação de OTU’s. O gênero *Histophilus* possui espécies patogênicas em trato reprodutivo de bovinos. Observou-se uma alteração na composição das comunidades estudadas, bem como nos atributos microbianos dos perfis podendo haver uma relação entre patógenos e representantes de outros taxa, na produção de metabólitos para progressão da doença.

Palavras-chave: metagenômica, distúrbios reprodutivos, 16S rRNA.

ABSTRACT

Reproductive disorders in bovines can be caused by various pathogens, which might already be present in the reproductive tract. The microbial community of the reproductive apparatus, when known, can provide information about the health of the host. The metagenomics has been used to characterize and obtain genetics information about microbial communities in various environments and can relate certain diseases with changes in community composition. In this study, samples were collected from the secretion of mucosa of vaginal surface of 05 healthy cows and 05 cows that showed symptoms of reproductive disorders. Metagenomics DNA samples were extracted of secretion samples and amplified with primers for the V5-V6 regions of the 16S rRNA and sequenced on the platform "Ion Torrent Personal Genome Machine - PGM". The data were processed to remove low quality sequences and chimeras, with the Mothur program, then the data were released in the Ribosomal Database Project for classification of OTU's. Local blastn was performed and this results was loaded in MEGAN program, for viewing profiles and taxonomic microbial attributes. The control profile showed a total of 15 taxa, being the taxa *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* and *Victivallis*, with the highest representation of OTU's; the positive profile showed 68 taxa, and *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Histophilus*, *Victivallis*, *Alistipes* and *Coriobacteriaceae*, the taxa with more OTU's representation. The genus *Histophilus* have pathogenics species in reproductive tract of cattle. There was a change in the community composition, well as in microbial attributes of profiles there may be a relationship between the pathogen and of other representatives taxa, in production of metabolites to disease progression.

Keywords: metagenomics, reproductive disorders, 16S rRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Deoxirribonucleosídeo Trifosfato
pb	pares de bases
rRNA	RNA ribossômico
pH	Potencial de hidrogênio
RDP	Ribossomal Database Project
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
OUT	Operation Taxonomic Unit
MEGAN	Metagenomic Analyze Program
PCR	Polymerase Chain Reaction
µl	Microlitro
ml	Mililitro
min	Minuto
sec	Segundo
U	Unidade
RPM	rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de carne bovina mundial, ano 2010 (FAO, 2011).....	12
Figura 2. Top 5 de países produtores de carne bovina, pelo número de cabeças, ano 2011 (FAO, 2013)	13
Figura 3. Ranking e variação anual do abate de bovinos - Unidades da Federação - 2011-2012; *Variação 2012/2011. **Somatório dos bovinos abatidos nas Unidades da Federação onde a participação no abate nacional foi inferior a 1% (BRASIL, 2013).....	14
Figura 4. Metodologia básica da abordagem metagenômica (modificado de HANDELSMAN, 2004).....	20
Figura 5. Modelo da estrutura secundária do rRNA 16S (linhas duplas indicam região variável ou hipervariável; linhas negras indicam altamente conservada; V1 a V9 indicam grandes regiões variáveis) (modificado de TORTOLI, 2003).	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Produção bovina e doenças bacterianas	12
1.2. Diversidade de microrganismos e ambiente.....	15
1.3. Microrganismos cultiváveis e não cultiváveis.....	17
1.4. Metagenômica	18
1.5. O gene 16S rRNA	21
1.6. Bionformática e metagenômica.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. CONCLUSÕES.....	44
5. REFERÊNCIAS	45

1. Introdução

1.1. Produção bovina e doenças bacterianas

O crescimento demográfico, devido principalmente à melhoria das condições de vida, bem como o aumento da sua expectativa, tem trazido consigo problemas intrinsecamente ligados, como o aumento do consumo de certos produtos alimentícios, dentre eles, a carne bovina, motivo este que força um aumento da produção desse produto.

O Brasil tem se destacado com o aumento progressivo de sua produção bovina a cada ano; chegou a possuir o 2º maior rebanho de bovinos do mundo em 2009, sendo também o segundo maior produtor de carne bovina, atrás apenas dos Estados Unidos, e, simultaneamente, maior exportador mundial deste produto (BRASIL, 2009; FAO, 2011). Em 2011 o Brasil passou a maior produtor de carne bovina do mundo (FAO, 2013).

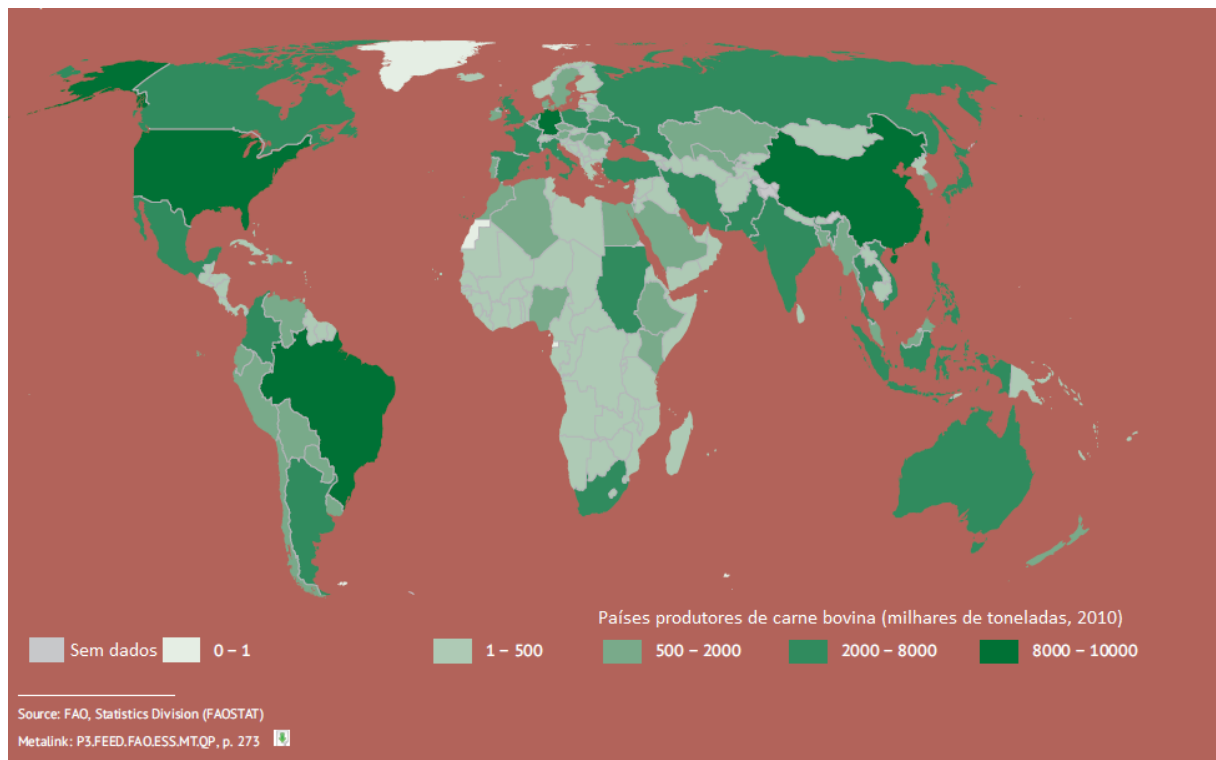


Figura 1. Produção de carne bovina mundial, ano 2010 (FAO, 2011).

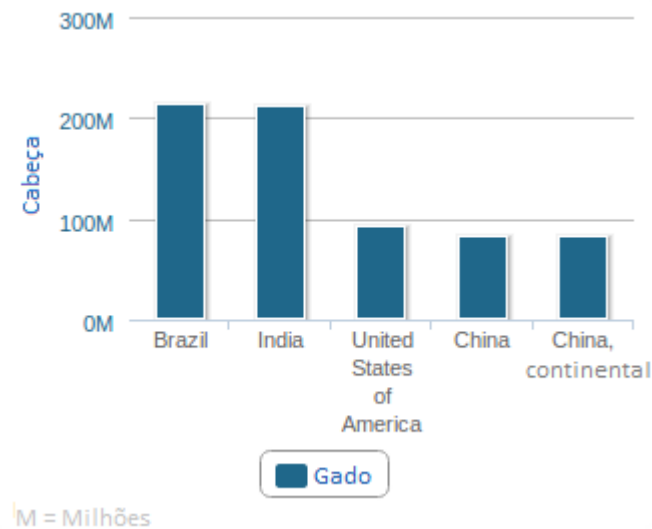


Figura 2. Top 5 de países produtores de carne bovina, pelo número de cabeças, ano 2011 (FAO, 2013)

Cada grande região do país contribui de uma forma diferente dentro dessa totalidade. Em 2012, a região Centro-Oeste foi responsável pela maior parte da produção de cada bovina do país (38,5%), seguida pelo Sudeste (20,2%), Norte (19,4%), Sul (11,9%) e Nordeste (10%) (BRASIL, 2013).

Na região Nordeste, o estado da Bahia possui a produção mais expressiva, tendo esta, crescido ao longo dos anos (Figura 03). No ano de 2012, com exceção da região Centro-Oeste, todas as regiões apresentaram queda na participação nacional na produção de carne bovina; todavia, o estado da Bahia demonstrou um aumento na produção, destaque dentro da conjuntura produtiva. Também, dentre as Unidades de Federação, o estado da Bahia apresentou uma variação anual (2011-2012), da quantidade de carne bovina *in natura* exportada, de 278,2% (BRASIL, 2013).

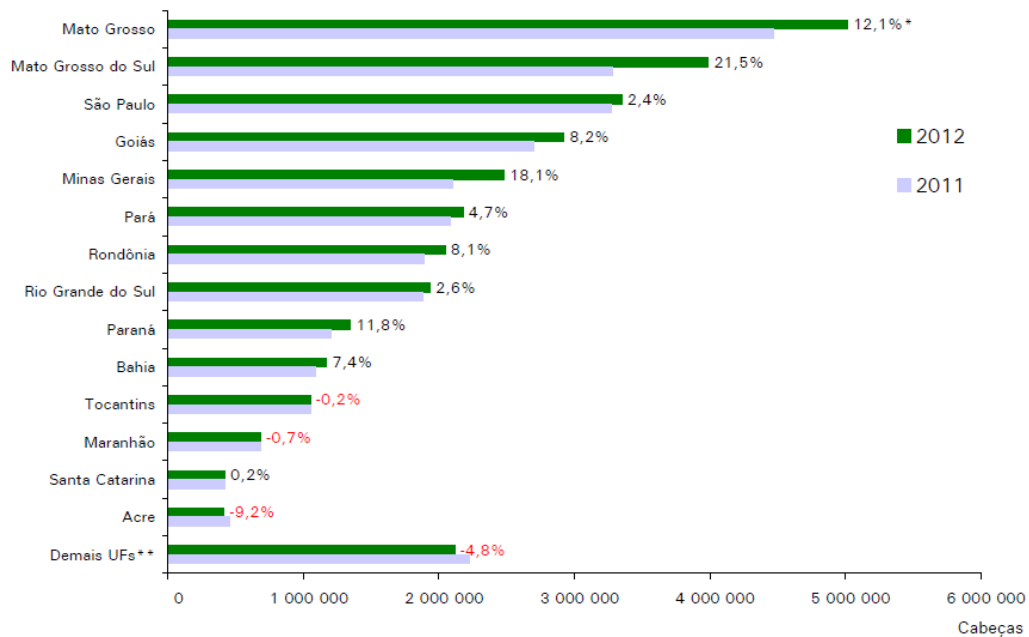


Figura 3. Ranking e variação anual do abate de bovinos - Unidades da Federação - 2011-2012; *Variação 2012/2011. **Somatório dos bovinos abatidos nas Unidades da Federação onde a participação no abate nacional foi inferior a 1% (BRASIL, 2013).

A exportação de carne bovina brasileira faz jus ao tamanho do seu rebanho; o Brasil exporta carne bovina para 92 países (BRASIL, 2013), dentre os quais, 16 respondem por 92,4% das importações – Rússia (26,9%), Egito (14,1%), Japão (10,5%), Venezuela (9,2%), Irã (7,2%) Chile (6,9%), Arábia Saudita (3,5%), Itália (2,5%), Líbia (2,0%) China (1,8%), Holanda (1,7%), Israel (1,5%), Líbano (1,3%), Argélia (1,2%), Jordânia (1,1%), Emirados Árabes Unidos (1,0%), demais países (7,6%) (BRASIL, 2013).

Apesar desses números promissores, a intensificação da pecuária acarreta problemas quanto à manutenção da saúde dos animais de produção. Diversas doenças têm minado a sanidade dos animais de produção, deixando em xeque a qualidade dos produtos no mercado nacional e internacional. Estas doenças são causadas por diversos microrganismos, vírus, bactérias, fungos, protozoários, entre outros, os quais, em alguns casos, uma única espécie pode causar uma gama de doenças. Doenças causadas por bactérias são bem estudadas devido sua alta incidência em rebanhos bovinos. Um grupo procariótico conhecido é a Classe *Mollicutes* que é composta pelos gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma* (RAZIN *et al.*,

1998). Destes, os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são bem estudados e relacionados como causa de doenças em bovinos.

Micoplasmas são considerados os menores organismos auto-replicantes, distinguidos fenotipicamente de outras bactérias por seu tamanho diminuto e total falta de uma parede celular (RAZIN *et al.*, 1998). Apesar de muitas espécies de micoplasma ocorrerem como parte da microbiota normal de vertebrados, plantas e insetos (TAYLOR-ROBINSON & BÉBÉAR, 1997), organismos deste gênero podem causar conjuntivite, mastite, poliartrites, ceratite, septicemia, agalactia, pleuropneumonia (Rosendal, 1981; Bashiruddin, Taylor e Gould, 1994; Taylor-Robinson e Bébéar, 1997; Grand *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009), bem como distúrbios no sistema reprodutor de ruminantes, tais como vulvites, vaginites, cervicites e endometrites (RIZZO *et al.*, 2011).

Essas infecções são as responsáveis por aborto e morte de neonatais nos rebanhos (RUHNKE *et al.*, 1984), sendo em geral disseminadas durante a ordenha, aerossóis e secreções de animais com distúrbios respiratórios e genitais (PRETTO *et al.*, 2001).

Espécies do gênero *Leptospira* também são patógenos de grande relevância em bovinos; são responsáveis por causarem febre, insuficiência hepática e renal, manifestações pulmonares, abortos, natimortos, infertilidade e perdas não-reprodutivas devido a septicemia (Levett, 2001; Grooms, 2006; Adler e De La Peña Moctezuma, 2010).

Histophilus somni é uma bactéria Gram-negativa que pode causar diversas síndromes em bovinos; meningoencefalite tromboembólica, pneumonia, sendo que patologias do trato reprodutivo são as manifestações clínicas mais frequentes (CORBEIL, 2007).

Todas essas doenças são comumente disseminadas dentro do rebanho, por diversos meios, desde o contato direto, até contaminação cruzada através de manejo humano. A detecção desses microrganismos através de novas técnicas, em especial da reação de PCR específica, tem contribuído para a separação de animais infectados, interferindo, portanto, na disseminação e infecção de outros animais no rebanho. Quando o rebanho já está contaminado, em alguns casos, pouco se pode fazer e o custo do tratamento pode ser relevante.

1.2. Diversidade de microrganismos e ambiente

Uma comunidade microbiana é formada por diversos organismos que compartilham, a princípio, uma característica: o pequeno tamanho, sendo na maioria dos casos, organismos

procarióticos. Atualmente, as formas de vida microbiana são encontradas em praticamente todos os nichos ecológicos existentes na Terra, desde os trópicos até o Ártico e a Antártida, a partir de minas subterrâneas e campos de petróleo até o topo de grandes montanhas, dos desertos até o Mar Morto, em fontes de água termais superficiais e submarinas (Van Trappen *et al.*, 2002; Chanal *et al.*, 2006; Xu, 2006).

A capacidade de resposta às alterações ambientais e a capacidade de rápida reprodução permite alterações na composição microbiana em habitats específicos tanto qualitativamente quanto quantitativamente, sendo assim, os índices de diversidade microbiana (nucleotídica, funcional, genética, morfológica, estrutural, de espécies, metabólica, filogenética, proteica e evolutiva) são considerados excelentes parâmetros para realização de uma avaliação do estado do ambiente e da saúde de um determinado habitat ou ecossistema (Xu, 2006; Kisand *et al.*, 2012).

A ecologia microbiana investiga a diversidade de microrganismos e como estes interagem uns com os outros e com o ambiente para gerar e manter tais diversidades. Consequentemente, os estudos que envolvem ecologia microbiana se concentram em duas áreas: (I) a diversidade microbiana, incluindo o isolamento, a identificação e quantificação dos microrganismos de vários habitats; e da atividade microbiana (II), isto é, como os microrganismos interagem com seus habitats e como suas atividades contribuem à diversidade microbiana observada no ambiente (XU, 2006).

A diversidade microbiana pode variar entre locais separados por milímetros ou milhares de quilômetros. O pequeno tamanho dos microrganismos pode facilitar sua dispersão por longas distâncias o que é fundamental para distribuição de organismos cosmopolitas que normalmente são também os mais abundantes nas comunidades microbianas (NEMERGUT *et al.*, 2011).

O número total de células microbianas na Terra é estimado em $> 10^{30}$, das quais as procarióticas representam a maior proporção de organismos individuais, compreendendo 10^6 – 10^8 genoespécies separadas (AMANN *et al.*, 1995). Esta enorme quantidade estimada de indivíduos representa uma grande quantidade de material genético a ser analisado, possibilitando assim um maior e melhor entendimento dos possíveis papéis desempenhados pelos mesmos nas relações existentes em ambientes naturais, além de permitir a busca por organismos não descritos, novos genes e seus papéis metabólicos (SIMON & DANIEL, 2009).

1.3. Microrganismos cultiváveis e não cultiváveis

As principais abordagens utilizadas no estudo da diversidade microbiana presente em um determinado ambiente incluem as análises dependentes e independentes de cultivo. Estima-se que apenas cerca de 0,1% a 1% de toda a comunidade microbiana seja detectada em placas com meio de cultura devido às condições seletivas, em função da composição dos meios utilizados (TORSVIK *et al.*, 1990; TORSVIK *et al.*, 2002). Os dados expostos estão de acordo com a proposta de que mais de 99% da diversidade fisiológica, metabólica e genética microbiana não está disponível para a pesquisa básica (XU, 2006).

A abordagem de análise independente de cultivo indica a predominância de muitas espécies não cultivadas (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005). O isolamento e cultivo destes organismos não são possíveis por razões diversas, tais como: necessidade de simbiose, ausência de nutrientes, superfícies inadequadas, excesso de compostos inibitórios, combinações incorretas de temperatura e/ou pressão, dentre outros (SIMU & HAGSTRÖM, 2004), o que leva, dentre outras coisas, à necessidade de desenvolvimento de novas condições de cultivo específicas para tais tipos de organismos (Rappé e Giovannoni, 2003; Stevenson *et al.*, 2004).

No contexto de busca de técnicas que evitem as limitações da exploração genética dependente de cultivo e que permitam o acesso à riqueza de informações contidas nos genomas dos mais diversos organismos presentes em comunidades naturais, especialmente microbianas (COWAN *et al.*, 2005), a metagenômica tem ganhado relativo destaque devido ao fato de ser uma técnica que permite o acesso aos genomas de amostras ambientais e está gerando uma grande quantidade de informações biológicas (WARD, 2006).

Não somente detectar esses microrganismos, mas caracterizar a comunidade microbiana em que estes estão inseridos é um passo importante para entender as relações ecológicas e genéticas, como possível transferência horizontal ou vertical de genes. No intestino de vertebrados, a alteração na constituição de comunidades microbianas pode levar a distúrbios na saúde de seu hospedeiro (VACHARAKSA & FINLAY, 2010).

Compreender como os microrganismos e/ou seus genes interagem em diversos nichos ambientais representa um grande desafio para o microbiologista ambiental, já que mais de 99% dos microrganismos não podem ser cultivados com as tecnologias disponíveis

(SUENAGA, 2011). Este desafio gerou várias abordagens, incluindo a metagenômica, a análise genômica de comunidades microbianas (HANDELSMAN, 2004).

1.4. Metagenômica

Entre os métodos que permitem o estudo da fisiologia e genética de organismos não cultiváveis, a metagenômica surgiu como uma abordagem eficiente de análise devido à possibilidade de obtenção direta de DNA a partir de uma amostra ambiental (HANDELSMAN, 2004), consistindo na análise do DNA genômico de toda uma comunidade, fato que difere da análise de DNA genômico de um organismo individual em particular ou de uma célula. O termo metagenômica foi utilizado pela primeira vez por Handelsman em 1998, onde *meta* vem do grego e significa "além", caracterizando assim a expressão literal "estudo que vai além de um único genoma" (GILBERT & DUPONT, 2011).

A análise metagenômica de uma comunidade microbiana consiste nas seguintes etapas básicas: (a) isolamento de DNA de qualquer amostra ambiental, (b) clonagem do DNA em vetor apropriado, (c) transformação dos clones recombinantes em uma célula hospedeira, normalmente uma estirpe de *E. coli*, (d) análise da biblioteca metagenômica, que pode ser baseada na função dos genes ou no sequenciamento de DNA (Figura 1) (HANDELSMAN, 2004).

Estudos visando encontrar genes envolvidos em reações de interesse biotecnológico, como para degradação de compostos orgânicos (SUENAGA *et al.*, 2007), degradação de biomassa (HESS *et al.*, 2011), lipases (GLOGAUER *et al.*, 2011), proteases (Neveu, Regard e Dubow, 2011; Zhang, Zhao e Zeng, 2011), esterases (CHU *et al.*, 2008), nitrilases (BAYER *et al.*, 2011), quitinases (HJORT *et al.*, 2010), xilanases (HU *et al.*, 2008), bem como diversas outras enzimas e biosurfactantes (KENNEDY *et al.*, 2011) utilizam a metagenômica para alcançar tal objetivo.

Na microbiologia médica humana, estudos da microbiota digestiva (Hattori e Taylor, 2009; Manges *et al.*, 2010; Vacharaksa e Finlay, 2010) e oral (Belda-Ferre *et al.*, 2011; Heuer *et al.*, 2011), e sua relação com a modificação destas comunidades e determinadas doenças, bem como a distribuição de genes de resistência bacteriana (SEVILLE *et al.*, 2009) têm sido possíveis por meio da análise metagenômica.

Estudos ecológicos utilizando a metagenômica caracterizam a diversidade biológica em diversos ambientes (Beardsley, 2006; Piganeau e Moreau, 2007; Hugenholtz e Tyson,

2008), incluindo a pele humana (GRICE *et al.*, 2008); outros são concernentes à coevolução de organismos (LEY *et al.*, 2008), e paleogenômica (NOONAN *et al.*, 2005). Inferências ecológicas da metagenômica vão desde simbiose entre seres, à fonte de antibióticos, biocatalisadores, e a influência dos microrganismos nos ciclos biogeoquímicos (SINGH *et al.*, 2009).

A metagenômica abriu novos caminhos de pesquisa, permitindo análises sem precedentes de heterogeneidade do genoma e evolução em contextos ambientais, proporcionando o acesso à diversidade microbiana (HANDELSMAN, 2004); permitindo aos cientistas investigar a ecologia procariota mais plenamente e destravar o vasto potencial biotecnológico encontrado nas populações procarióticas (STEELE & STREIT, 2005).

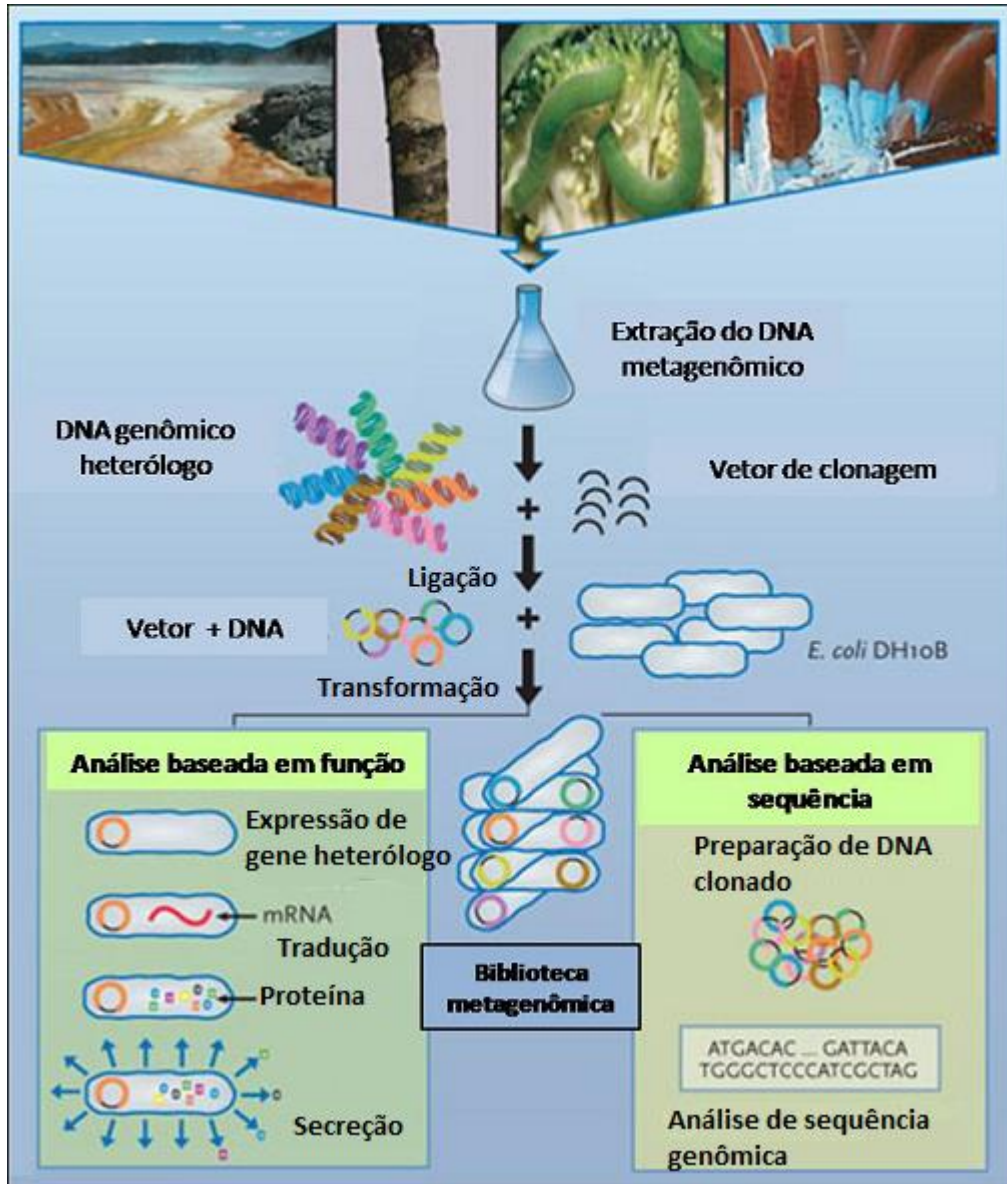


Figura 4. Metodologia básica da abordagem metagenômica (modificado de HANDELSMAN, 2004).

A análise metagenômica baseada na função do gene oferece a possibilidade de localizar e caracterizar uma ampla variedade de enzimas ou outros produtos a partir de amostras ambientais. A detecção dessas moléculas requer uma triagem funcional que necessita da expressão heteróloga dos genes seguida do sequenciamento dos fragmentos isolados (DANIEL, 2004).

A grande vantagem desta metodologia é que apenas genes inteiros e produtos gênicos funcionais podem ser detectados, no entanto, uma limitação está no fato da dependência da expressão de genes em hospedeiros (DANIEL, 2005).

Quanto a análise metagenômica baseada na sequência do gene, um exemplo muito utilizado é o do gene rRNA 16S uma vez que permite a identificação de células, mesmo que em pequenas quantidades. Com isso, são obtidas importantes informações sobre a composição taxonômica de uma comunidade microbiana de determinado ambiente, constituindo assim uma importante ferramenta para a análise da diversidade molecular de comunidades de microrganismos (Nogales *et al.*, 2001; Janssen, 2006), inclusive é capaz de identificar táxons presentes em baixa frequência, tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos, que não apresentam relação filogenética com nenhum filo descrito (Schloss e Handelsman, 2005; Sogin *et al.*, 2006; Elshahed *et al.*, 2008).

1.5. O gene 16S rRNA

O gene 16S de RNA ribossomal contém informações de uma molécula que apresenta um elevado grau de conservação (WOESE *et al.*, 1975). Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula que apresentam informações úteis para inferências filogenéticas.

As sequências de rRNA contêm regiões conservadas, intercaladas com regiões variáveis (Figura 2); tanto as regiões variáveis, como as regiões conservadas, são importantes para identificação taxonômicas dos organismos. Mesmo que não seja encontrada uma sequência com similaridade satisfatória, ela pode ser relacionada por implicações filogenéticas ou comportamento fisiológico provável (AMANN *et al.*, 1995). Sendo assim, o sequenciamento do gene do 16S rRNA é o método mais eficiente para descrição da diversidade microbiana em amostras naturais (MUYZER, 1999).

No entanto, a análise dos dados tornou-se o principal fator limitante dos estudos metagenômicos. O sequenciamento do DNA não é mais o gargalo em estudos microbianos, em vez disso, o aumento do volume de dados gerados a partir dos sequenciamentos está se constituindo em desafio significativo para as atuais ferramentas utilizadas na análise (DESAI *et al.*, 2012).

Este elevado volume de dados gerados pela abordagem metagenômica deve-se às modernas plataformas de sequenciamento conhecidas como sequenciadores de nova geração

que permitem a exploração de comunidade complexas a custos relativamente baixos (SCHOLZ *et al.*, 2012). Por isso o sequenciamento consiste em uma ferramenta fundamental nas análises metagenômicas e o desenvolvimento de tecnologias que permitam um sequenciamento mais rápido e de excelente rendimento é de extrema importância para o estudo das comunidades biológicas (RONAGHI, 2001).

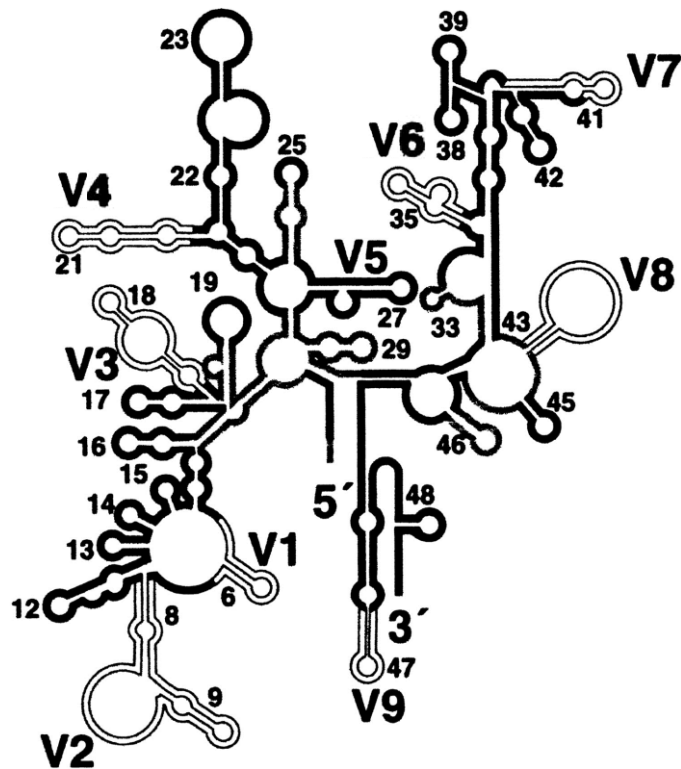


Figura 5. Modelo da estrutura secundária do rRNA 16S (linhas duplas indicam região variável ou hipervariável; linhas negras indicam altamente conservada; V1 a V9 indicam grandes regiões variáveis) (modificado de TORTOLI, 2003).

1.6. Bionformática e metagenômica

Os desafios computacionais são novos e muito instigantes. O momento o qual vivemos é semelhante ao da revolução genômica ocorrida a quase duas décadas. A genômica de organismos nos permite examinar a evolução não só de um único gene, mas de todas as unidades de transcrição, cromossomos, e das redes celulares. No entanto, mais recentemente, a metagenômica nos deu a capacidade de estudar, em nível genômico mais fundamental, a relação entre os microrganismos pertencentes às comunidades e os habitats em que vivem e

assim compreendermos melhor como estão adaptados em ambientes diferentes, não apenas nos solos ou água, mas incluindo suas relações com animais e vegetais, sejam elas positivas ou negativas para os hospederios (WOOLEY *et al.*, 2010).

A bioinformática baseia-se na utilização de ferramentas computacionais para análise e interpretação de padrões biológicos. Este ramo recente da biologia objetiva não apenas direcionar objetivos de pesquisas experimentais, mas acima de tudo integrar informações oriundas de diversas fontes e buscar padrões existentes que normalmente não seriam reconhecidos através da experimentação isolada (XU, 2006).

A utilização de ferramentas de bioinformática é fundamental para as mais diversas análises relacionadas aos estudos metagenômicos, tais como: predição de genes, caracterização da diversidade microbiana tanto qualitativamente quanto quantitativamente, predição da função da comunidade no ambiente, comparação entre comunidades de diferentes ambientes para reconhecimento de padrões que reflitam as características próprias desses ambientes; dentre outros (WOOLEY & YE, 2010).

Projetos microbioma, um termo análogo a bioma em ecologia, referindo-se a comunidade microbiana de um ambiente particular, que também pode se referir a um local específico no corpo de um indivíduo, têm utilizado a abordagem metagenômica e o poder computacional da bioinformática, contribuindo para a identificação de microrganismos responsável pelo equilíbrio da saúde de hospedeiros (Mckenna *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Turnbaugh *et al.*, 2008; Turnbaugh e Gordon, 2009; Turnbaugh *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2011).

Sendo assim, a utilização da abordagem metagenômica na caracterização de comunidade microbianas pela análise do gene 16S rRNA confere vantagens em relação aos estudos de doenças e distúrbios em vários organismos; em bovinos, estudos utilizando essas abordagem ainda são poucos, mas a compreensão dos vários quadros de infecção é necessária para o desenvolvimento de tratamentos eficazes (SANTOS *et al.*, 2011).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Realizar uma abordagem metagenômica da diversidade bacteriana do trato reprodutivo de bovinos saudáveis e com distúrbios reprodutivos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as comunidades bacterianas das amostras, quanto suas relações interpopulacionais e interações com o meio ambiente;
- Estabelecer uma relação entre as comunidades bacterianas presentes nas amostras e às patologias associadas.

3. Resultados e discussão

Artigo submetido à revista Veterinary Microbiology

18/03/13

Gmail - Submission Confirmation for Veterinary Microbiology



Nureyev Ferreira Rodrigues <nureyevrod@gmail.com>

Submission Confirmation for Veterinary Microbiology

VETMIC <vetmic@elsevier.com>
Para: nureyevrod@gmail.com

18 de março de 2013 16:32

Title: Metagenomic analysis of 16s rRNA genes from normal and disturbed vaginal microflora in cows

Dear Mr Rodrigues,

Your submission has been received by the journal
Veterinary Microbiology.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an
Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/vetmic/>

Your username is: nureyevrod

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/VETMIC/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Veterinary Microbiology

**Metagenomic analysis of 16s rRNA genes from normal and disturbed vaginal microflora
in cows**

Nureyev Ferreira Rodrigues Rodrigues^a, Joana Kästle^a, Tarcisio José Santos Coutinho^a, Aline
Teixeira Amorim^{b,c}, Guilherme Barreto Campos^{b,c}, Verena Macedo Santos^{b,c}, Lucas Miranda
Marques^{b,c}, Jorge Timenetsky^c, Savio Torres de Farias^a

^aCentro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Biologia Molecular,
Universidade Federal da Paraíba, Brazil, Cidade Universitária, CEP: 58059-900 - João
Pessoa, PB – Brasil

^bInstituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São
Paulo, Brazil Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, Butantan, CEP:
05508-900 - São Paulo, SP – Brasil

^cInstituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira, Núcleo de Tecnologia em
Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Olívia Flores, 3000 – Candeias, Candeias, CEP:
45055-090 - Vitória da Conquista, BA – Brasil

+55 83 91161127, +55 83 3216 7787 nureyevrod@gmail.com

Rua Joaquim Pinto de Oliveira, 02, Gato Preto, CEP: 58802-090, Sousa, PB – Brasil,
nureyevrod@gmail.com

Abstract

Reproductive disorders in cows can be caused by various pathogens, which might already be present in the reproductive tract. The microbial community of the reproductive apparatus, when known, can provide information about the health of the host. The metagenomics has been used to characterize and obtain genetics information about microbial communities in various environments and can relate certain diseases with changes in community composition. In this study, DNA samples were collected from the vaginal surface of 05 healthy cows and 05 cows showed symptoms of reproductive disorders. The samples were amplified with primers for the V5-V6 regions of the 16S rRNA and sequenced on the platform "Ion Torrent Personal Genome Machine - PGM". The data were processed to remove low quality sequences and chimeras, with the program Mothur, then the data were released in the Ribosomal Database Project for classification of OTU's. Local blastn was performed and the output was loaded in MEGAN, for viewing profiles and taxonomic microbial attributes. The control profile showed a total of 15 taxa, being the taxa *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae* and *Victivallis* the highest representation of OTU's; the positive profile showed 68 taxa, and *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Histophilus*, *Victivallis*, *Alistipes* and *Coriobacteriaceae* the taxa more OTU's representation. The genus *Histophilus* is opportunistic pathogen of the reproductive tract of cattle. There was a change in the microbial attributes of profiles and there may be a relationship between the pathogen and of other representatives taxa, in production of metabolites to disease progression.

Keywords: metagenomics, reproductive disorders, 16S rRNA.

1. Introduction

Cattle are affected by several diseases related to genital tract caused by various pathogens, as bacteria of the genus *Bacteroides*, *Mycoplasma*, *Histophilus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, species as *E. coli*, *Streptococcus* spp., among other (Corbeil, 2007; LeBlanc, 2008; Pfützner and Sachse, 1996). These diseases have common aspects, but sometimes the symptoms are more distinct. The diagnosis of infection is based on information specific to the evaluated pathogen and this is the most common method for starting up the control of the disease. New researches that demonstrate the setting clinical pictures have been highlighted by its focus on

ecological interactions, based on the new data provided through a metagenomic approach. Studies of the composition of microbial communities in diverse environments have revealed the existent intricate ecological interactions (Baudoin et al., 2003; Kent and Triplett, 2002), and how environmental degradation and other anthropogenic activities cause impacts in these communities (Garbeva et al., 2004; Lynch et al., 2004); in hosts, studies show that the change in the constitution of communities can lead to health disorders (Ott et al., 2004; Seksik et al., 2003; Turnbaugh and Gordon, 2009). However, the identification of microbial community requires cultivation of isolated strains in vitro, excluding several organisms which unique physiology do not allow cultivation. A new era in microbial ecology was initiated with the sequencing of genes of ribosomal RNAs (rRNAs) by metagenomics, allowing the description of uncultured bacteria (Singh et al., 2009). The metagenomics has permitted to collect and study biological information without the need to culture the organisms in the sample. Microbiome projects, a term analogous to biome in ecology, refers to the microbial community of a particular environment, it could be a specific location in the body of an individual has contributed to the identification of microorganisms responsible for the balance of the health of the host (Brown et al., 2011; Turnbaugh and Gordon, 2009). This study aimed to characterize the cows microbiota with reproductive disorders symptoms and relate the components of the microbial infection, comparing it with a normal microbiota.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection, DNA Isolation and Purification

Samples were collected of five (05) females who showed clinical signs of reproductive disorders (whitish vagina, purulent vulvar discharge and inflamed hyperaemic vulvar mucosa with granulomatous vulvovaginitis) (Nicholas et al., 2008) and five (05) who showed no aspect of the disorders. After disinfection of vagina external surface of the animal, a vulvovaginal swab was performed on the site. The genital samples were collected from the vagina and care was taken to avoid the vestibule and clitoral fossa in the animal. After insertion into the vestibule, the swab was initially directed almost completely dorsally before redirecting cranially, and then rolled over the cranial vaginal mucosa. The swabs were placed in 25 ml of transport medium and stored at -20°C until further use. Bacterial genomic DNA was isolated

and purified with the Invisorb® Spin Blood Midi Kit (Stratec Molecular, Berlin, Germany). The protocol followed the manufacturer's instructions with minor modifications, i.e., a pretreatment step with the Buffer EL, was not performed. After isolation, the purified DNA was eluted in 200 µl of elution buffer. Quality and purity of the isolated genomic DNA was confirmed by agarose gelelectrophoresis and spectrophotometry on the NanoDrop 2000 device (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany).

2.2. 16S Primers and Amplicon Library Generation

PCR amplification of the hypervariable region of the 16s rRNA V5-V6 was performed using degenerate forward (V5F-784: AACRGGATTAGATACCC) and reverse primers (V6R-1064: CGACRRCCATGCANCACT) for bacteria. The 5' end of forward primers were fused to the adapter-A followed by the key sequence; reverse primers were fused with a truncated sequence of the adapter-Pi (TRP1). The primers were diluted in water to molecular biology and mixed in equimolar manner. To prepare the library of amplicons, in 25 µL reactions were used 4 ng of metagenomic DNA from each sample, 1U of Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity, 5 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂ (all Life Technologies) and 10 pmol of primers premixed. For PCR, the amplification conditions were 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 94°C for 15 s, 55°C for 15 s, 68°C for 10s and a final step of elongation at 68°C for 30 s. The PCR products were purified by 1.5% agarose gel.

2.3. Emulsion PCR and Sequencing

The emulsion PCR was performed using the "Express Ion Template Kit V2.0" (Life Technologies) as its own instruction manual advises (User Guide Part No. 4469004 Rev. B 07/2011). The sequencing of amplicons were performed through libraries platform "Ion Torrent Personal Genome Machine - PGM" using reagents "Sequencing kit 200" (all from Life Technologies) following the corresponding protocol (Part No. 4471999 Rev. B, 13. Oct. 2011) with some modifications: i) the chip was washed once more with isopropanol and after annealing buffer, checked and calibrated to remove possible air bubbles resulting from these procedures, ii) the beads were loaded two times the chip 314, each load was followed by 4 cycles of centrifugation at maximum speed for 15 sec (Mini Star, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany) and stirring at 3000 rpm for 10 sec in an IKA orbital shaker (IKA-Werke GmbH & Co. KG , Staufen, Germany) equipped with a special adapter to the chip

followed by centrifugation at the end of each load for 15 s. iii) the entire sample was loaded on the chip.

2.4. Sequence Analysis

Raw sequencing reads were checked for different quality criteria using the Mothur program (Schloss et al., 2009). Low quality reads were removed as follows: i) reads not matching the PCR primers with at most two errors; ii) sequences containing ambiguously called bases (N); and iii) reads with a length minor that 150pb. The sequences were screened for artificial chimeric formations using the UCHIME algorithm in Mothur. Subsequently, operational taxonomic unit (OTU) analysis was done on a clustering basis for each sample individually in Ribosomal Database Project (Cole et al., 2009). Local blastn was used to assign 16S rRNA gene sequences of each sample, using the database 16SMicrobial (version data, 16/02/2013). The output text file of blastn was loaded in MEGAN (Huson and Mitra, 2012) that the data used to create graphs of the profiles taxonomic tree comparative and microbial attributes.

3. Results

A total of 228.842 sequence reads were generated in sequencing process; after the initial pipeline of RDP and mothur processing, been obtained a total of 32.185 high-quality sequences. The majority of 16S rRNA amplicons sequenced belonged to the hypervariable region V5-V6. Chimeric sequences were found in very small quantities (less than 1% per profile). Clustering of reads defined by 3% sequence difference, at species-level, generated 594 and 1057 clusters, to Control and Positive profiles, respectively (Table 1).

Table 01. OTU counts (Clusters) in Positive and Control profiles.

Profile	distance	N¹	clusters
Positive	0.03	31229	10754
Positive	0.05	31229	6645
Positive	0.10	31229	2246
Control	0.03	956	594
Control	0.05	956	442
Control	0.10	956	207

¹Number of sequences

Rarefaction curves showed that in the level of family (0.10), we obtained a satisfactory coverage of OTU's analyzed, yet the species level (0.03) and genus (0.05) did not reach the asymptote, being therefore not optimal curves, but still of considerable quality (Figure 01 and 02). Approximately 3.19% of total 15,310 OTU's identified are common to profiles under investigation in this study (Table 02).

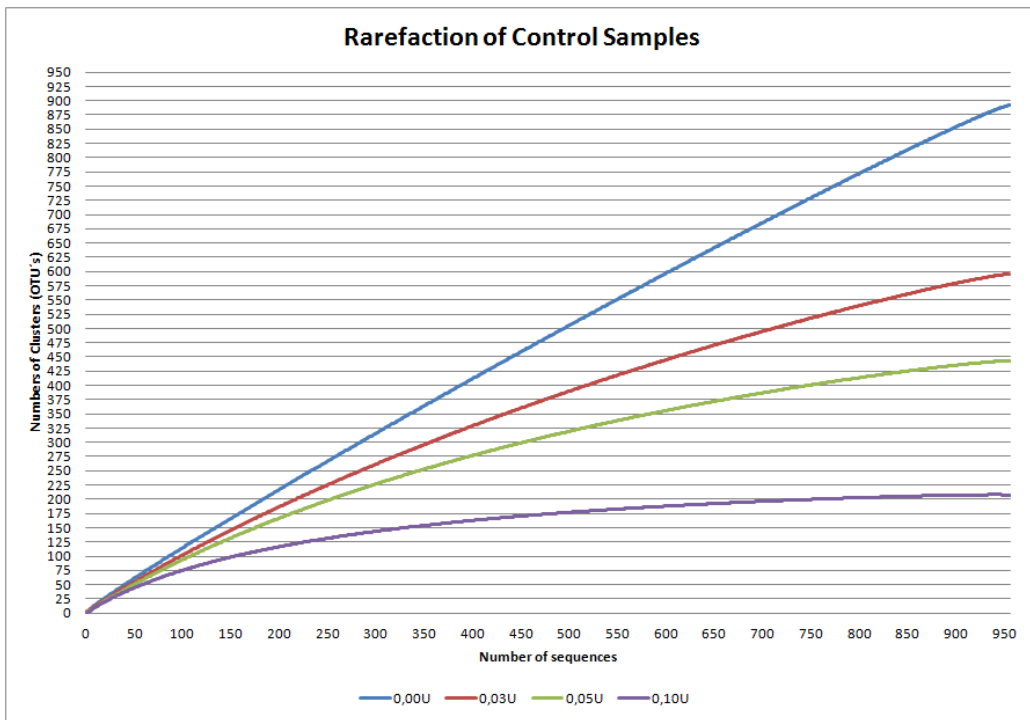


Figure 01. Curves of rarefaction of control profile of OTU's obtained from RDP to three levels distance (90, 95 and 97%).

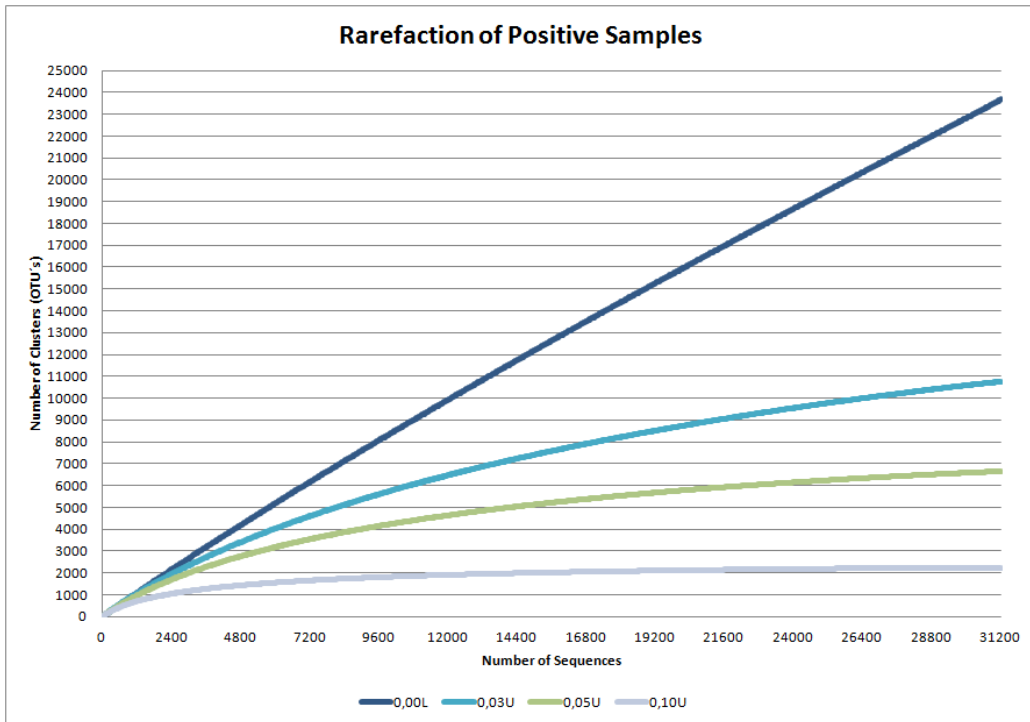


Figure 02. Curves of rarefaction of positive profile of OTU's obtained from RDP to three levels distance (90, 95 and 97%).

The taxonomic classification of OTU's revealed the constitution of the communities; the profile of the control animals presented OTU's corresponding to 15 taxa: *Corynebacterineae* (5 reads, 2,8%), *Coriobacteriaceae* (6 reads, 3,3%), *Bacteroides* (51 reads, 28,3%), *Porphyromonadaceae* (9 reads, 5%), *Alistipes* (7 reads, 3,9%), *Cytophagaceae* (5 reads, 2,8%), *Victivallis* (13 reads, 7,2%), *Streptococcus* (11 reads, 6,1%), *Clostridium* (6 reads, 3,3%), *Oscillibacter* (5 reads, 2,8%), *Selenomonadales* (10 reads, 5,6%), *Planctomycetaceae* (5 reads, 2,8%), *Betaproteobacteria* (5 reads, 2,8%), *Enterobacteriaceae* (32 reads, 17,8%), *Treponema* (10 reads, 5,6%) (Figure 03); the profile of animals with reproductive disorders presented correspondence to 68 taxa; the predominant taxa were: *Coriobacteriaceae* (153 reads, 2,44%), *Bacteroides* (2246 reads, 35,83%), *Barnesiella* (127 reads, 2,03%), *Alistipes* (272 reads, 4,34%), *Flavobacteriaceae* (111 reads, 1,77%), *Victivallis* (532 reads, 8,49%), *Streptococcus* (131 reads, 2,09%), *Oscillibacter* (78 reads, 1,24%), *Enterobacteriaceae* (1167 reads, 18,62%), *Histophilus* (551 reads, 8,79%) (Figure 04).

Taxonomy profile for Control Samples

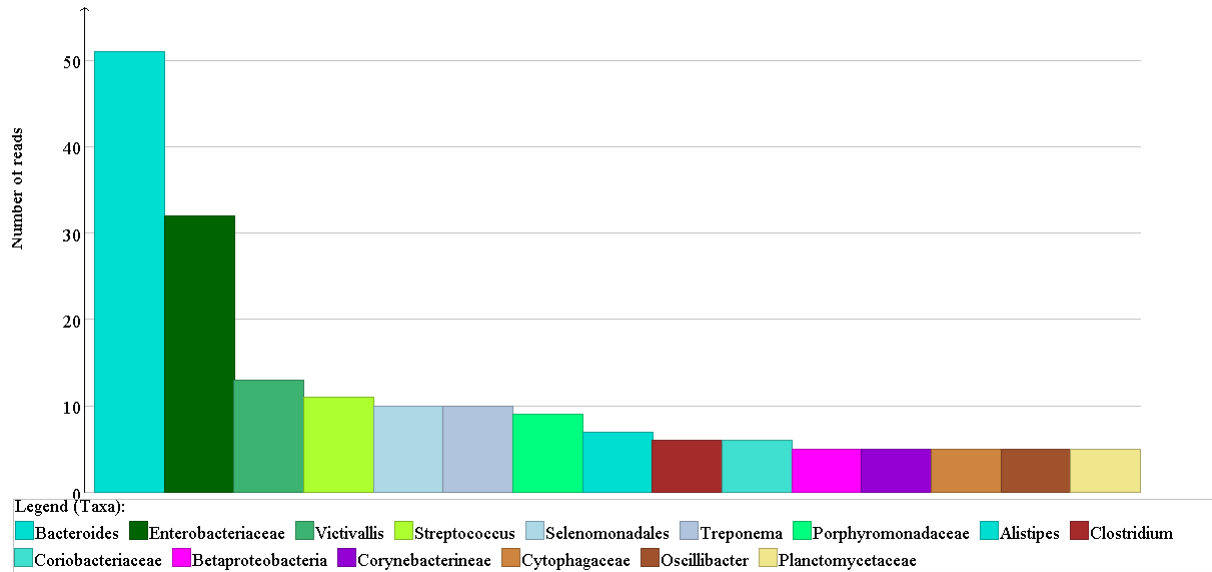


Figure 03. Taxonomic groups in the control profile, generated in the MEGAN, through local blastn, with 95% similarity.

Taxonomy profile for Positive Samples

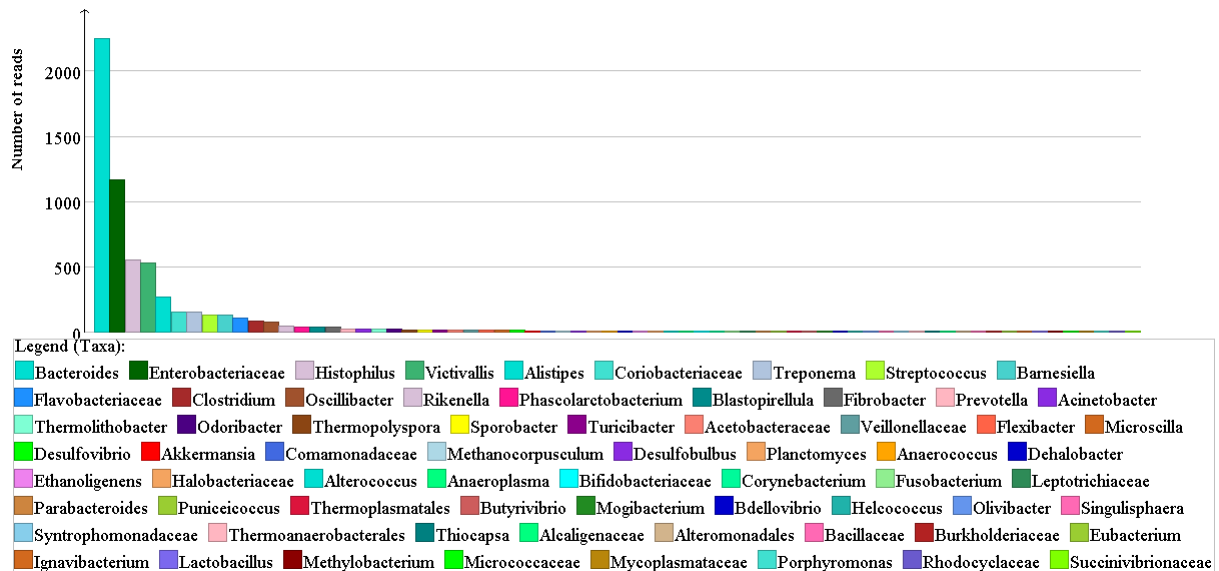


Figure 04. Taxonomic groups in the positive profile, generated in the MEGAN, through blastn site, with 95% similarity.

In reads evaluated in the control profile (without reproductive disorders), all showed the same microbial attributes: negative gram, no motility, optimal temperature at 37°C, anaerobic, host-

associated habitat, not pathogenic, coccus shaped (Figure 05). The positive profile (without reproductive disorders) differed in several attributes; Gram stain – Positive: 14 reads, Negative: 1554 reads; Motility – Yes: 15 reads, No: 589 reads; Optimal temperature: 35-37°C: 551 reads, 37°C: 580 reads; Anaerobic: 623, Facultative: 551; Habitat – Host-associated: 1150 reads, Aquatic: 38 reads; Disease – None: 71 reads, Pneumonia, arthritis, myocarditis, and reproductive problems: 551 reads, Unknown: 634 reads; Pathogenic – No: 646 reads, In animal, human: 551 reads; Shaped – Coccus: 532 reads, Fusiform: 9 reads, Helical: 6 reads, Oval: 11 reads, Pleomorphic Rod: 37 reads, Ring: 5 reads, Rod: 574 reads, Unknow: 49 reads (Figure 06). A comparative phylogram with taxonomic classification of the OTU's can be seen in Figure 07.

Table 02. OTU shared in Positive and Control profiles.

Distance ¹	Shared OTU's	% of total OTU's
0.03	489	3,19
0.05	388	4,49
0.10	217	6,78

¹Levels distance

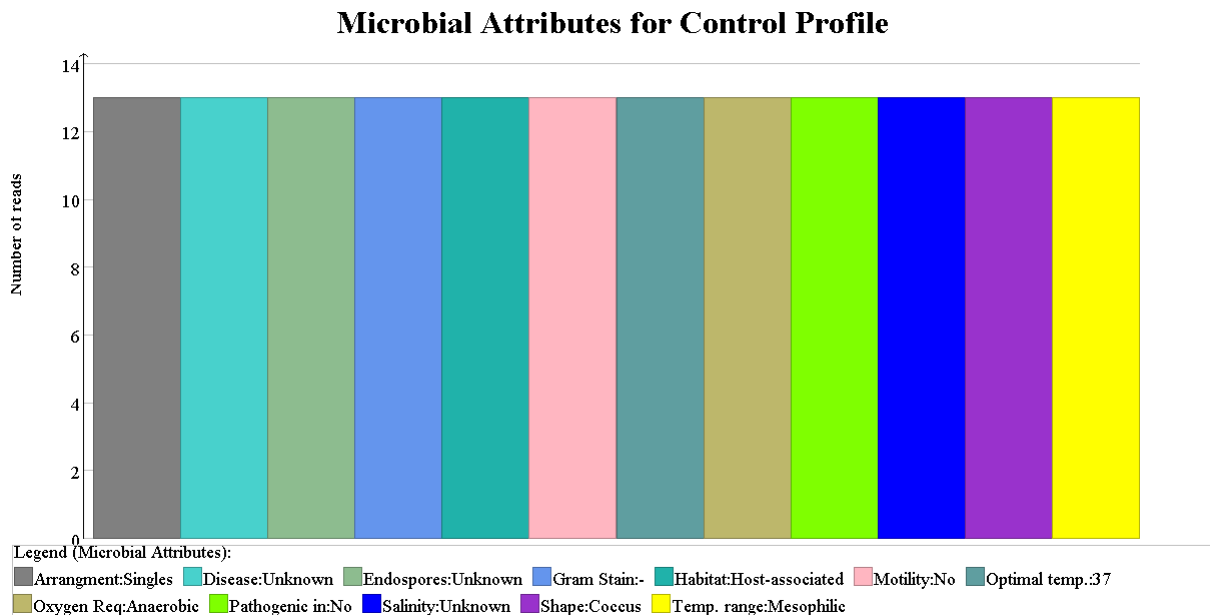


Figure 05. Attributes microbial profile control, this figure is observed a balance in the morph and physiological characteristics of the organisms in the community.

Microbial Attributes for Positive Profile

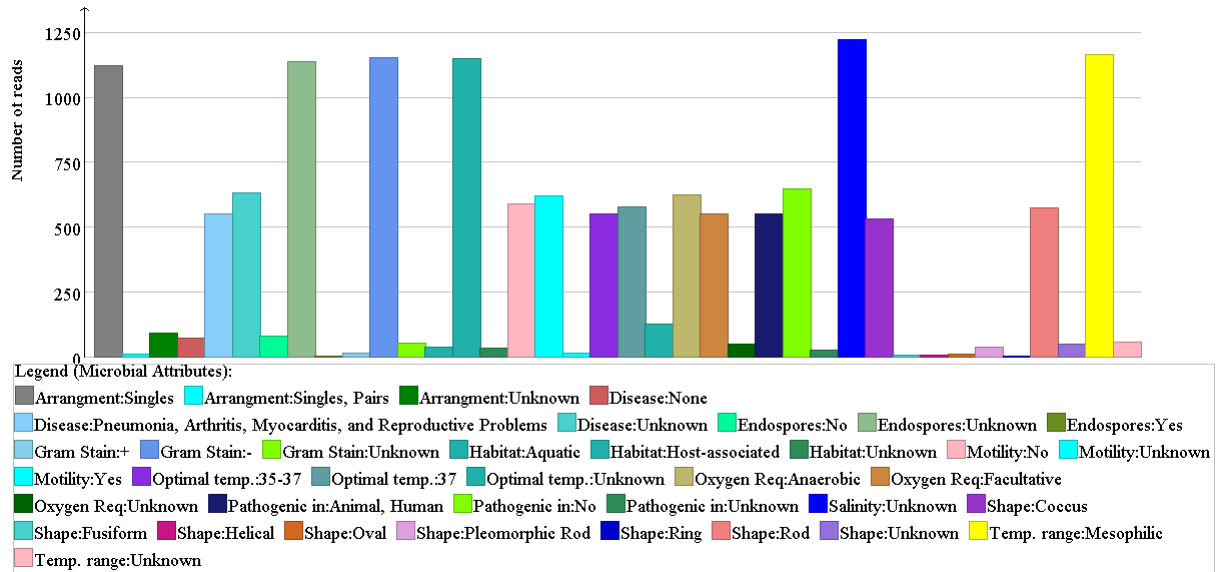


Figure 06. Microbial attributes of positive profile, observed the presence of microorganisms morph and physiologically distinct of community profile control.

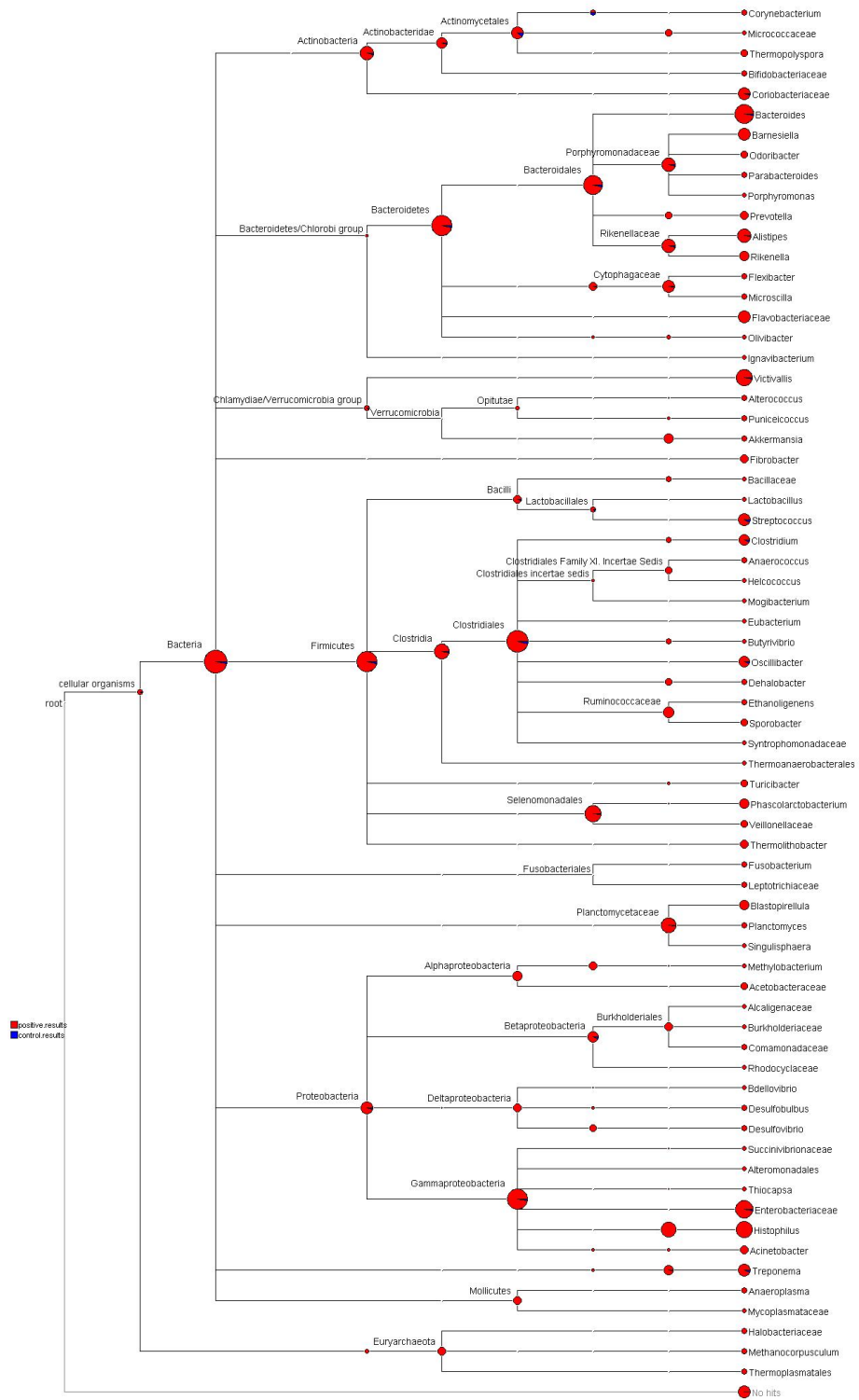


Figure 07. Cladogram comparative of profiles; the pies showed the proportion of reads in the taxa; positive profile in red, control profile in blue.

4. Discussion

In this study, the community composition of each profile showed significant differences, not only by the enrichment of taxa in the positive profile, but also by increasing reads in taxa *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Victivallis*, *Streptococcus*, *Selenomonadales*, *Treponema*, *Porphyromonadaceae*, *Alistipes*, *Clostridium*, *Coriobacteriaceae*, *Betaproteobacteria*, *Corynebacterineae*, *Cytophagaceae*, *Oscilibacter*, when compared to the control profile; these taxa are part of the core of the vaginal microbiota bovine (Otero et al., 2000; Panangala et al., 1978). In positive profile for reproductive disorders, 53 other taxa were found, maintaining the presence of organisms of the core microbiota *Bacteroides* and *Enterobacteriaceae* have been described as part of the rumen microbiota in cattle (Wexler, 2007) but also occasionally causing disease (Dohmen et al., 1995; Kraipowich et al., 2000). *Histophilus* can be found in genital tracts of cattle as opportunist, but can cause various disorders (van der Burgt et al., 2007); of all the pathogenic organisms this genus has the largest representation, as well as correspondence to the clinical signs observed. *Mycoplasmataceae* also commonly inhabit mucous in cattle and can become pathogens (Nicholas et al., 2008), having an range sites of infection greater than *Histophilus*; their representation was discreet not corresponding to a infecting pathogen. The other taxa was not described as pathogens in cattle. Alterations in the composition of the microbial communities related to diseases in various organisms have been described, both by suppression (Manichanh et al., 2006; Ott et al., 2004) and colonization by new populations (Fredricks et al., 2005). Because of the high co-evolutionary association between individuals and microorganisms, a simple change in community composition can alter these interactions and trigger a change of a commensal to a pathogenic interaction. Changes in abiotic factors in an ecosystem can open new ecological niches, providing a change in the composition of the community, by new emerging interactions. The microbial attributes evaluated in both profiles show changes in the balance of the characteristics of the vaginal ecosystem; the increase of populations of aerobic and facultative aerobic bacteria, for example *Singulisphaera* (Kulichevskaya et al., 2008), *Olivibacter* (Wang et al., 2008), *Comamonadaceae* (Willems et al., 1991), in the community, that before were almost totally anaerobic, this may be related to formation of microecosystems; pH seems to change by the presence of taxa with representatives that lives in acidic environments as *Fibrobacter* (Chow and Russell, 1992), and *Lactobacillus*, a fact that may result from the release of acidic compounds from the own

fermentation of these organisms and of anaerobic organisms such as *Victivalles* (Zoetendal et al., 2003) and *Bacteroides*. The availability of nutrients may be increased indirectly by organisms like *Bdellovibrio*, an intracellular parasite (Seidler and Starr, 1969), whose cycle may partially or completely lyse their host, releasing ions and organic and inorganic compounds utilized in metabolic pathways of other bacteria; *Akkermansia muciniphila* can also contribute to the emergent cycle of elements by fermenting mucin it is able to release sulfate in a free form, in addition to promoting a reduction in protection against pathogens, which is the function of the mucin (Derrien et al., 2004); *Desulfovibrio* can reduce this sulfate (Voordouw, 1995), while *Desulfobulbus* oxidize the sulfide generated (Lien et al., 1998). *Methanocorpusculum* was described as methanogenic which use H₂/CO₂ or formate as substrates for methanogenesis, although some can also use alcohols as electron donors (Garcia et al., 2006) and *Succinivibrionaceae* has been described capable of reducing methane (Stackebrandt and Hespell, 2006). These compounds could also be used for *Histophilus* in its methane, nitrogen and sulfur metabolism, contributing to the context of infection. Competitions could occur by use of iron between *Histophilus*, *Acinetobacter* and *Corynebacterium*, because they use iron in some metabolic processes and/or pathogens (Follmann et al., 2009; Tremblay et al., 2006; Zimble et al., 2009).

5. Conclusions

Our profiles showed that the composition of the microbiota is consistent with, but not conclusively demonstrative, vaginal health. There may be variations in microbiota due host-dependent and host-independent factors that were not contemplated. The evidence of the relationship between reproductive disorders and changes in the composition of the vaginal microbiota of cattle is multifactorial and future studies may contribute to a greater understanding of this relationship. We propose that this knowledge may be used to modulate the vaginal microbiota for therapeutic assistants to treat these diseases.

6. References

- Baudoin, E., Benizri, E., Guckert, A., 2003, Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1183-1192.
- Brown, C.T., Davis-Richardson, A.G., Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C.H., Schatz, D., Atkinson, M.A., Triplett, E.W., 2011, Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* 6, e25792.
- Chow, J.M., Russell, J.B., 1992, Effect of pH and Monensin on Glucose Transport by *Fibrobacter succinogenes*, a Cellulolytic Ruminant Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1115-1120.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009, The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37, D141-D145.
- Corbeil, L.B., 2007, *Histophilus somni* host–parasite relationships. *Animal Health Research Reviews* 8, 151-160.
- Derrien, M., Vaughan, E.E., Plugge, C.M., de Vos, W.M., 2004, *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1469-1476.
- Dohmen, M.J.W., Lohuis, J.A.C.M., Huszenicza, G., Nagy, P., Gacs, M., 1995, The relationship between bacteriological and clinical findings in cows with subacute/chronic endometritis. *Theriogenology* 43, 1379-1388.
- Follmann, M., Ochrombel, I., Kramer, R., Trotschel, C., Poetsch, A., Ruckert, C., Huser, A., Persicke, M., Seiferling, D., Kalinowski, J., Marin, K., 2009, Functional genomics of pH

homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics* 10, 621.

Fredricks, D.N., Fiedler, T.L., Marrazzo, J.M., 2005, Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. *New England Journal of Medicine* 353, 1899-1911.

Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2004, MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42, 243-270.

Garcia, J.-L., Ollivier, B., Whitman, W., 2006, The Order Methanomicrobiales, In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 208-230.

Huson, D., Mitra, S., 2012, Introduction to the Analysis of Environmental Sequences: Metagenomics with MEGAN, In: Anisimova, M. (Ed.) *Evolutionary Genomics*. Humana Press, pp. 415-429.

Kent, A.D., Triplett, E.W., 2002, MICROBIAL COMMUNITIES AND THEIR INTERACTIONS IN SOIL AND RHIZOSPHERE ECOSYSTEMS. *Annual Review of Microbiology* 56, 211-236.

Kraipowich, N.R., Morris, D.L., Thompson, G.L., Mason, G.L., 2000, Bovine Abortions Associated with *Bacteroides Fragilis* Fetal Infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 369-371.

Kulichevskaya, I.S., Ivanova, A.O., Baulina, O.I., Bodelier, P.L.E., Damsté, J.S.S., Dedysh, S.N., 2008, *Singulisphaera acidiphila* gen. nov., sp. nov., a non-filamentous, *Isosphaera*-like planctomycete from acidic northern wetlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1186-1193.

LeBlanc, S.J., 2008, Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *The Veterinary Journal* 176, 102-114.

Lien, T., Madsen, M., Steen, I.H., Gjerdevik, K., 1998, *Desulfobulbus rhabdoformis* sp. nov., a sulfate reducer from a water-oil separation system. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 469-474.

- Lynch, J.M., Benedetti, A., Insam, H., Nuti, M.P., Smalla, K., Torsvik, V., Nannipieri, P., 2004, Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biol Fertil Soils* 40, 363-385.
- Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., Dore, J., 2006, Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55, 205-211.
- Nicholas, R., Ayling, R.D., McAuliffe, L., Agency, V.L., 2008, *Mycoplasma Diseases of Ruminants: Disease, Diagnosis and Control*. Stylus Pub Llc.
- Otero, C., Saavedra, L., Silva de Ruiz, C., Wilde, O., Holgado, A.R., Nader-Macías, M.E., 2000, Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Letters in Applied Microbiology* 31, 251-254.
- Ott, S.J., Musfeldt, M., Wenderoth, D.F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U.R., Timmis, K.N., Schreiber, S., 2004, Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 685-693.
- Panangala, V.S., Fish, N.A., Barnum, D.A., 1978, Microflora of the cervico-vaginal mucus of repeat breeder cows, Vol 19, 83-89 pp.
- Pfützner, H., Sachse, K., 1996, *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 15, 1477-1494.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009, Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537-7541.
- Seidler, R.J., Starr, M.P., 1969, Factors Affecting the Intracellular Parasitic Growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* Developing Within *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 97, 912-923.

- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., Doré, J., 2003, Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52, 237-242.
- Singh, J., Behal, A., Singla, N., Joshi, A., Birbian, N., Singh, S., Bali, V., Batra, N., 2009, Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal* 4, 480-494.
- Stackebrandt, E., Hespell, R., 2006, The Family Succinivibrionaceae, In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.) *The Prokaryotes*. Springer New York, pp. 419-429.
- Tremblay, Y.D.N., Bahrami, F., Niven, D.F., 2006, Acquisition of haemoglobin-bound iron by *Histophilus somni*. *Veterinary Microbiology* 114, 104-114.
- Turnbaugh, P.J., Gordon, J.I., 2009, The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of Physiology* 587, 4153-4158.
- van der Burgt, G., Clark, W., Knight, R., 2007, Cattle fertility problems and *Histophilus somni*. *Veterinary Record* 160, 600.
- Voordouw, G., 1995, The genus *Desulfovibrio*: the centennial. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2813-2819.
- Wang, L., Ten, L.N., Lee, H.-G., Im, W.-T., Lee, S.-T., 2008, *Olivibacter soli* sp. nov., *Olivibacter ginsengisoli* sp. nov. and *Olivibacter terrae* sp. nov., from soil of a ginseng field and compost in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1123-1127.
- Wexler, H.M., 2007, Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 593-621.
- Willems, A., De Ley, J., Gillis, M., Kersters, K., 1991, NOTES: Comamonadaceae, a New Family Encompassing the Acidovorans rRNA Complex, Including *Variovorax paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 445-450.

Zimblér, D., Penwell, W., Gaddy, J., Menke, S., Tomaras, A., Connerly, P., Actis, L., 2009, Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals* 22, 23-32.

Zoetendal, E.G., Plugge, C.M., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., 2003, *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 211-215.

4. Conclusões

Neste trabalho verificamos que existe relação entre distúrbios reprodutivos e alterações na composição da microbiota vaginal. Também foi visto que o patógeno do gênero *Histophilus* aparenta apresentar-se como fator chave dos distúrbios reprodutivos; desta forma a infecção pode ter desencadeado alterações físico-químicas que interferiram na ecologia do ecossistema, o que pode ter permitido a colonização de microrganismos que contribuíram ainda mais à infecção, ou, a mudança da composição da microbiota, e suas conseqüentes alterações ecológicas, pode ter contribuído para a instalação do processo infeccioso. Assim, propomos que este conhecimento seja utilizado para modular a microbiota vaginal por meio de recolonização do trato genital, como tratamento adjunto aos tratamentos convencionais de tais doenças, com fins de maior eficácia desses tratamentos.

5. Referências

- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- BAYER, S.; BIRKEMEYER, C.; BALLSCHMITER, M. A nitrilase from a metagenomic library acts regioselectively on aliphatic dinitriles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 91-98, 2011.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa da Agropecuária Municipal**. v. disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/comentarios.pdf>, p., 2009.
- BRASIL, I. B. D. G. E. E. I., DIRETORIA DE PESQUISAS, COORDENAÇÃO DE AGROPECUÁRIA. Estatística da Produção Pecuária, 2011-2012. v., p., 2013.
- CHU, X.; HE, H.; GUO, C.; SUN, B. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 615-625, 2008.
- CORBEIL, L. B. Histophilus somni host–parasite relationships. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, n. 02, p. 151-160, 2007.
- COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTEW, P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 321-329, 2005.
- DANIEL, R. The soil metagenome--a rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199-204, 2004.
- DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nat Rev Micro**, v. 3, n. 6, p. 470-478, 2005.
- DESAI, N.; ANTONOPOULOS, D.; GILBERT, J. A.; GLASS, E. M.; MEYER, F. From genomics to metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 72-76, 2012.
- FAO, F. A. A. O. O. T. U. S.-. Production Database. v., p., 2011.
- FAO, F. A. A. O. O. T. U. S.-. Production Database. v., p., 2013.
- GILBERT, J. A.; DUPONT, C. L. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, n. 1, p. 347-371, 2011.
- GLOGAUER, A.; MARTINI, V.; FAORO, H.; COUTO, G.; MÜLLER-SANTOS, M.; MONTEIRO, R.; MITCHELL, D.; DE SOUZA, E.; PEDROSA, F.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2011.

GRICE, E. A.; KONG, H. H.; RENAUD, G.; YOUNG, A. C.; PROGRAM, N. C. S.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; WOLFSBERG, T. G.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. A. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, v., n., p., 2008.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T.-W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D. S.; CHEN, F.; ZHANG, T., et al. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. **Science**, v. 331, n. 6016, p. 463-467, 2011.

HJORT, K.; BERGSTRÖM, M.; ADESINA, M. F.; JANSSON, J. K.; SMALLA, K.; SJÖLING, S. Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phytopathogen-suppressive soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 2, p. 197-207, 2010.

HU, Y.; ZHANG, G.; LI, A.; CHEN, J.; MA, L. Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-derived metagenomic library with an efficient approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 823-830, 2008.

KENNEDY, J.; O'LEARY, N. D.; KIRAN, G. S.; MORRISSEY, J. P.; O'GARA, F.; SELVIN, J.; DOBSON, A. D. W. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 787-799, 2011.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. **Science**, v. 320, n. 5883, p. 1647-1651, 2008.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 317-322, 1999.

NEMERGUT, D. R.; COSTELLO, E. K.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; JIANG, L.; SCHMIDT, S. K.; FIERER, N.; TOWNSEND, A. R.; CLEVELAND, C. C.; STANISH, L.; KNIGHT, R. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 135-144, 2011.

NOONAN, J. P.; HOFREITER, M.; SMITH, D.; PRIEST, J. R.; ROHLAND, N.; RABEDER, G.; KRAUSE, J.; DETTER, J. C.; PÄÄBO, S.; RUBIN, E. M. Genomic Sequencing of Pleistocene Cave Bears. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 597-599, 2005.

PRETTO, L. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n., p. 143-145, 2001.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RIZZO, H.; MEIRA JUNIOR, E. B. D. S.; OLIVEIRA, R. C. D.; YAMAGUTI, M.; BUZINHANI, M.; TIMENETSKY, J.; GREGORY, L. Isolamento e PCR para detecção de Mollicutes em muco vaginal e sua associação com problemas reprodutivos em ovinos criados na região de Piedade, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v., n., p. 0-0, 2011.

RONAGHI, M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. **Genome Research**, v. 11, n. 1, p. 3-11, 2001.

RUHNKE, H. L.; PALMER, N. C.; DOIG, P. A.; MILLER, R. B. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. **Theriogenology**, v. 21, n. 2, p. 295-301, 1984.

SANTOS, T. M. A.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 1, p. 291-302, 2011.

SCHLOSS, P.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p. 229, 2005.

SCHOLZ, M. B.; LO, C.-C.; CHAIN, P. S. G. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 9-15, 2012.

SEVILLE, L. A.; PATTERSON, A. J.; SCOTT, K. P.; MULLANY, P.; QUAIL, M. A.; PARKHILL, J.; READY, D.; WILSON, M.; SPRATT, D.; ROBERTS, A. P. Distribution of Tetracycline and Erythromycin Resistance Genes Among Human Oral and Fecal Metagenomic DNA. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 3, p. 159-166, 2009.

SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 265-276, 2009.

SIMU, K.; HAGSTRÖM, Å. Oligotrophic Bacterioplankton with a Novel Single-Cell Life Strategy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2445-2451, 2004.

SINGH, J.; BEHAL, A.; SINGLA, N.; JOSHI, A.; BIRBIAN, N.; SINGH, S.; BALI, V.; BATRA, N. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 480-494, 2009.

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 2, p. 105-111, 2005.

SUENAGA, H. Targeted metagenomics: a high-resolution metagenomics approach for specific gene clusters in complex microbial communities. **Environmental Microbiology**, v., n., p. no-no, 2011.

SUENAGA, H.; OHNUKI, T.; MIYAZAKI, K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2289-2297, 2007.

TAYLOR-ROBINSON, D.; BÉBÉAR, C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 622-630, 1997.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

VACHARAKSA, A.; FINLAY, B. B. Gut Microbiota: Metagenomics to Study Complex Ecology. **Current biology : CB**, v. 20, n. 13, p. R569-R571, 2010.

WARD, N. New directions and interactions in metagenomics research. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, n. 3, p. 331-338, 2006.

WOESE, C. R.; FOX, G. E.; ZABLEN, L.; UCHIDA, T.; BONEN, L.; PECHMAN, K.; LEWIS, B. J.; STAHL, D. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. **Nature**, v. 254, n. 5495, p. 83-86, 1975.

WOOLEY, J.; YE, Y. Metagenomics: Facts and Artifacts, and Computational Challenges. **J Comput Sci Technol**, v. 25, n. 1, p. 71-81, 2010.

WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A Primer on Metagenomics. **PLoS Comput Biol**, v. 6, n. 2, p. e1000667, 2010.

XU, J. INVITED REVIEW: Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 7, p. 1713-1731, 2006.