



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

**INTER-RELAÇÃO ENTRE MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NO
RÚMEN DE BOVINOS**

BEATRIZ MIDORI TAKAGAKI

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

**INTER-RELAÇÃO ENTRE MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NO
RÚMEN DE BOVINOS**

BEATRIZ MIDORI TAKAGAKI

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, *Campus São Gabriel*, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Luiz Fernando Würdig Roesch

Coorientador: Filipe de Carvalho Victoria

Rio Grande do Sul

Dezembro de 2018

**INTER-RELAÇÃO ENTRE MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NO RÚMEN DE
BOVINOS**

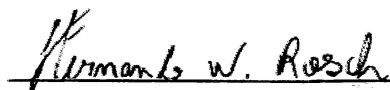
BEATRIZ MIDORI TAKAGAKI

ORIENTADOR: LUIZ FERNANDO WÜRDIG ROESCH

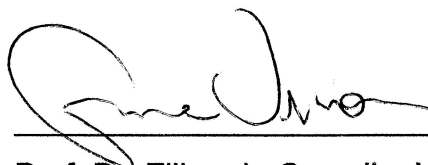
COORIENTADOR: FILIPE DE CARVALHO VICTORIA

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:



Presidente, Prof. Dr. Luiz Fernando Würdig Roesch
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA



Prof. Dr. Filipe de Carvalho Victoria
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA



Dr. Diego Bitencourt de David
Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – DDPA

São Gabriel, dezembro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA**TAKAGAKI, BEATRIZ MIDORI**

Inter-relação entre micro-organismos presentes no rúmen de bovinos / Beatriz Midori Takagaki. – Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, 2018.

XI, 19 f.: il. 5; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Würdig Roesch.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – UNIPAMPA/ *Campus* São Gabriel/ Trabalho de Conclusão de Curso, 2018.

Referências: f. 16-19.

1. Fungos. 2. Interações ecológicas. 3. Procariotos. 4. Ruminantes. 5. Sequenciamento de Nova geração. 6. Microbiologia e Biologia Molecular – Monografia I. Roesch, Luiz Fernando. II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a meus pais por terem me gerado, me apoiado e contribuído de diversas maneiras para que eu conseguisse chegar até aqui. À minha irmã que, apesar de me dar muito trabalho, ajudou-me a enfrentar algumas fases da vida e, à minha sobrinha, que veio agora nos proporcionar mais trabalho e principalmente mais alegrias.

Agradeço enormemente meu orientador Luiz Fernando que, além de ser um professor incrível, desde sempre me recebeu muito bem no laboratório, motivou-me, proporcionou-me diversas oportunidades, sempre esteve disposto a ajudar, fez excelentes churrascos e esteve ali presente em minhas apresentações de dança durante esse período da graduação, quando meus pais não podiam estar lá.

Agradeço também a todos meus amigos que me apoiaram e me acolheram nessa cidade e estado novos ao longo desses 4 anos e todos os outros que ainda mantenho contato mesmo estando distante. À Priscila, Anderson e Anthony pelo companheirismo no laboratório, ensinamentos e momentos de descontrações. À Fernanda, ao Márcio, que além de pessoas maravilhosas, fazem um trabalho impecável em todos os espetáculos e à Renata que me proporcionou a grandiosa experiência de dar aulas de dança e participar de uma competição de *ballet*. A todos meus amigos e alunas da dança, principalmente a Ana Vitória que é como uma irmã mais nova pra mim e está sempre me animando com toda sua energia e alegria.

Gostaria de agradecer a todos meus professores que participaram da minha vida escolar, oferecendo-me uma excelente base para que eu pudesse enfrentar as etapas seguintes da vida, em especial o Fábio, Marcelo e Rosa Lúcia que sempre serão um exemplo e uma inspiração para mim. Ao Andrés, Cássia, Felipe, Juliano e a todos os outros professores da universidade que participaram desse início da minha jornada acadêmica, aconselharam-me sobre a vida, esforçaram-se fazendo ciência e fizeram o possível e impossível para lidar com os acadêmicos, o que não é uma tarefa nada fácil.

Agradeço também à Alexia, Luciana e Ivany que me hospedaram durante esses 4 anos, acolhendo-me como da família.

Por último e não menos importante, gostaria de agradecer ao professor Filipe que aceitou prontamente ser meu orientador pela ausência do Luiz.

A todos os citados diretamente ou indiretamente meu muito obrigado!

“A ciência é o melhor instrumento para
medir a nossa ignorância”
Paolo Mantegazza

RESUMO

Os ruminantes não possuem a capacidade de degradar material lignocelulósico e, devido à sua alimentação herbívora, acabaram desenvolvendo um sistema gastrointestinal complexo em simbiose com diversos micro-organismos. Bactérias e fungos, produzem enzimas capazes de degradar moléculas de celulose, hemicelulose e fibras, gerando entre outros compostos, ácidos graxos voláteis, que são utilizados como principal fonte de energia para os ruminantes. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi analisar a ocorrência de interações intra e interespecíficas entre arqueias, bactérias e fungos que habitam o líquido ruminal de novilhas. Foram coletadas 17 amostras de líquido ruminal de novilhas da raça Bradford após o ciclo de pastejo matinal, alocadas em dois tipos de pastagem diferentes. O DNA microbiano foi isolado e a região V4 do gene rRNA 16S foi amplificada para análise de procariotos e a região ITS2 para análise dos fungos. Sequências geradas a partir de sequenciamento de nova geração foram processadas usando as recomendações do *Brazilian Microbiome Project*. Análises de diversidade alfa foram calculadas, bem como o *core* microbiano tanto da comunidade de procariotos quanto de fungos. Foi construída uma rede de interação na plataforma Gephi para avaliar as inter-relações entre os indivíduos da comunidade microbiana. Foram encontradas no total 131 correlações significativas ($p \leq 0,05$) entre bactérias, fungos e arqueias. Cálculos da centralidade de autovetor sugerem uma influência maior dos fungos no rúmen, sendo *Sporidiobolales* responsável pelo maior número de interações positivas, enquanto *Ascomycota* e *Myriogenospora atramentosa* foram associados a um maior número de interações negativas. *Ascomycota* engloba a maioria dos fungos patogênicos de plantas e animais, sendo *Myriogenospora atramentosa* um endofítico capaz de causar infecção sistêmica em gramíneas e possivelmente associado à toxicidade em bovinos. Em vista disso, pode-se concluir que, no ambiente ruminal existem interações entre os micro-organismos ali presentes, de modo a favorecer-lhes ou não. Essas interações podem resultar em um efeito sinérgico na degradação de vegetais, aumentando a eficiência alimentar ou antagonista, atuando no controle de algum patógeno.

Palavras-chave: Correlação, Interações, Líquido ruminal, 16S rRNA, ITS2.

ABSTRACT

Ruminants do not have the ability to degrade lignocellulosic material and due to their herbivorous feeding, they developed a more complex gastrointestinal system associated with symbiosis of several microorganisms. Bacteria, as well as fungi, produce enzymes able to degrading molecules of cellulose, hemicellulose and fibers, generating among other compounds, volatile fatty acids, which are used as the main source of energy for ruminants. Therefore, the aim of this work was to analyze the occurrence of intraspecific and interspecific interactions between archaea, bacteria and fungi that inhabit the ruminal fluid of heifers. Seventeen samples of ruminal fluid were collected from Bradford heifers after the morning grazing cycle, allocated to two different pasture types. The microbial DNA was isolated and the V4 region of the rRNA 16S gene was amplified for prokaryote analysis and the ITS2 region for fungal analysis. Sequences generated from new generation sequencing were processed using the recommendations of the Brazilian Microbiome Project. Alpha diversity analyzes were calculated as well as the core microbial of both the prokaryotic and fungal communities. An interaction network was built on the Gephi platform to assess the relationships among individuals in the microbial community. A total of 131 significant correlations ($p \leq 0.05$) were found between bacteria, fungi and archaea. Calculations of eigenvector centrality suggest a greater influence of fungi in the rumen, with *Sporidiobolales* accounting for the greater number of positive interactions, while *Ascomycota* and *Myriogenospora atramentosa* were associated with a greater number of negative interactions. *Ascomycota* includes most of the pathogenic fungi of plants and animals, *Myriogenospora* being an endophytic species able to causing systemic infection in grasses and possibly associated with toxicity in cattle. Thus, can be concluded that in the ruminal environment there are interactions between the microorganisms present, to favor them or not. These interactions may result in a synergistic effect on the degradation of plants, increasing the digestibility or antagonistic efficiency, acting in the control of some pathogen.

Keywords: Correlation, Interactions, Ruminal fluid, rRNA 16S, ITS2.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Medidas de diversidade alfa da comunidade microbiana presente no líquido ruminal de novilhas. Os painéis representam as UTOs observadas e índice de diversidade de Shannon respectivamente da esquerda para direita. As caixas abrangem o primeiro ao terceiro quartil; a linha horizontal dentro das caixas representa a mediana. A linha vertical que ultrapassa as caixas indica variabilidade fora dos quartis inferior e superior e os pontos indicam valores discrepantes (outliers). A) Comunidade de procariotos; B) Comunidade de fungos.....8
- Figura 2: Abundância relativa das UTOs mais abundantes do *core* microbiano de amostras do líquido ruminal de novilhas. A) Comunidade de procariotos; B) Comunidade de fungos.....10
- Figura 3: Rede de associação da comunidade microbiana presente em amostras do líquido ruminal de novilhas. Uma conexão representa uma forte correlação de Pearson ($p \geq 0.7$ e valor de $p \leq 0,05$). Cada nó representa uma Unidade Taxonômica Operacional (UTO). Os tamanhos de cada nó são proporcionais aos valores de centralidade de autovetor de cada táxon e as cores variam de acordo com a formação de uma classe modular. UTOs em roxo representam arqueias, em preto as bactérias e em verde os fungos. Linhas azuis representam correlações positivas e linhas vermelhas representam correlações negativas.....11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cobertura amostral, número de UTOs com corte de 97% de similaridade e estimador de riqueza de Chao1 antes e após a rarefação das sequências de procariotos e de fungos.....	7
---	---

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
SUMÁRIO.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	4
3.1 Local da coleta e amostragem.....	4
3.2 Extração do DNA microbiano e amplificação das regiões marcadoras.....	4
3.3 Análises de bioinformática e estatística.....	5
4 RESULTADOS.....	7
5 DISCUSSÃO.....	13
6 CONCLUSÕES.....	15
7 REFERÊNCIAS.....	16

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento crescente da população humana, foi necessário também o aumento da produção da pecuária de corte para atender ao consumo humano. De acordo com HACKMANN; SPAIN (2010) o número de animais domesticados já atingia por volta de 3,6 bilhões de espécies, sendo bovinos, ovinos e caprinos as principais populações de ruminantes domesticados.

Os Ruminantes pertencem a um grupo de mamíferos artiodátilos da subordem *Ruminantia* que engloba seis famílias: *Antilocapridae* (antilopas), *Bovidae* (gado, ovelhas e antílopes), *Cervidae* (cervos), *Giraffidae* (girafas e okapis), *Moschidae* (veado almiscarado) e *Tragulidae* (chevrotains) (HASSANIN; DOUZERY, 2003). Esses animais não possuem a capacidade de degradar material lignocelulósico e, portanto, por possuírem um hábito alimentar herbívoro, tornaram-se dependentes de micro-organismos localizados em seu trato gastrointestinal, além de desenvolverem um estômago dividido em quatro compartimentos especializados: rúmen, retículo, omaso e abomaso (HOBSON; STEWART, 1997). O rúmen, primeiro e possivelmente o principal desses compartimentos, abriga uma grande diversidade de micro-organismos como bactérias, fungos, arqueias, vírus, protozoários, que compõem o chamado microbioma ruminal. Esses micro-organismos simbiotes desempenham um papel muito importante na digestão e nutrição desses animais, pois a partir da fermentação dos componentes vegetais, fornecem ácidos graxos voláteis (principal fonte de energia de ruminantes), além de proteínas e vitaminas (DIJKSTRA, 1994; WOLIN, 1981). Além disso, atuam na detoxificação de algumas fitotoxinas (DOMINGUEZ BELLO; ESCOBAR, 1997; DOMINGUEZ-BELLO, 1996) e ainda, estão envolvidos na ciclagem do carbono e nitrogênio (HUNGATE, 1966). Essa fermentação gera H_2 entre seus compostos que, por sua vez, são utilizados por arqueias no processo de metanogênese, o que diminui a inibição da fermentação causada pelo excesso de H_2 (CHENG et al., 2009; JANSSEN, 2010).

Além de participar da degradação de celulose, hemicelulose e de fibras, os fungos ainda produzem exocelulases (KRAUSE et al., 2003) sendo que, fungos de podridão branca são capazes de digerir mais eficientemente o tecido lignificado das plantas, dificilmente degradado por outros micro-organismos (PÉREZ et al., 2002).

A complementariedade de funções desempenhadas entre os diferentes micro-organismos que habitam o ambiente ruminal mostra a grande complexidade e

interação tanto intra como interespecífica entre as espécies ali presentes, ajudando na manutenção da saúde e produtividade do ruminante.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência de interações intra e interespecíficas entre arqueias, bactérias e fungos que habitam o líquido ruminal de novilhas em pastejo sobre campos naturais (Bioma Pampa) do Rio Grande do Sul.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da coleta e amostragem

O trabalho foi aprovado no CEUA através do parecer nº 08/2012, ofício 10/12 de 29 de março de 2012. As coletas do material para o estudo foram realizadas durante o final do verão de 2017 pelo Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária – DDPa localizado na cidade de São Gabriel – RS (latitude 30° 20' 11" S, longitude 54° 19' 12" O). Foram coletadas 17 amostras de líquido ruminal de novilhas da raça Bradford com 340 ± 28 kg e dois anos de idade. As amostras foram coletadas logo após o ciclo de pastejo da manhã (entre 9:00 e 11:00 horas aproximadamente). Oito novilhas foram tratadas em pastagem natural, composto principalmente por capim-annoni (*Eragrostis planna* Ness) e nove em pastagem suplementada com azevém, fertilizante NPK e leguminosa. As novilhas foram mantidas nos respectivos tratamentos desde um ano de idade.

Para a coleta do líquido ruminal foi utilizada uma sonda esofágica acoplada a uma bomba a vácuo e kitassato. As amostras foram armazenadas em tubos cônicos estéreis com capacidade de 50 mL, identificados e transportados em uma caixa de isopor com gelo até a Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, onde foram manipuladas e processadas.

3.2 Extração do DNA microbiano e amplificação das regiões marcadoras

O DNA microbiano foi extraído utilizando o kit comercial PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a identificação de procariotos foram amplificadas a região V4 do gene rRNA 16S dos fragmentos de DNA utilizando os oligonucleotídeos universais para bactéria/arqueias 515F e 806R (CAPORASO et al., 2012). Doze amostras foram selecionadas para identificação dos fungos através da amplificação da região intergênica ITS2 do rRNA. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita utilizando o kit de Taq Platinum DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), contendo 4 µL de tampão de PCR de alta fidelidade 10X, 2U de Taq Polimerase, 2 mM de MgSO₄, 0,2 mM de dNTP, 25 µg de BSA

ultrapuro (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 0,1 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador e aproximadamente 50 ng de DNA molde. O volume final foi ajustado para 25 μ L com água ultra pura. A termociclagem seguiu os seguintes passos: 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 56 °C por 45 segundos, 72 °C por 60 segundos e, a extensão final ocorreu a 72 °C por 10 minutos.

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, Estados Unidos) e quantificado por fluorometria usando o kit Qubit Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos), para análise de DNA de alta sensibilidade. As amostras foram misturadas em razões equimolares para compor uma biblioteca contendo a mistura dos amplicons de cada amostra com cerca de 3×10^8 moléculas por microlitro.

O gene rRNA 16S e a região ITS2 foram sequenciados utilizando a plataforma PGM Ion Torrent™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Para a preparação da biblioteca, o pool de amostras foi submetido a uma PCR em emulsão, seguido de enriquecimento das amostras usando o Ion OneTouch™ 2 System e o kit Ion PGM™ Template OT2 400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). As amostras foram carregadas no Ion 318™ Chip v2.

3.3 Análises de bioinformática e estatística

As sequências obtidas foram processadas e analisadas seguindo as recomendações do *Brazilian Microbiome Project* (PYLRO et al., 2014). O agrupamento das sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) foi realizado usando o método UPARSE (EDGAR, 2013) com 97% de similaridade para definição de uma UTO. A classificação taxonômica foi feita de acordo com as bases de dados UNITE (para fungos) e Greengenes (para procariotos). O esforço de amostragem foi estimado usando a cobertura de Good (GOOD, 1953). O *core* microbiano tanto de fungos quanto de procariotos foi calculado utilizando a *pipeline* do QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPORASO et al., 2010), sendo incorporadas apenas UTOs presentes em 100% das amostras.

Cálculos de alfa diversidade foram gerados usando o pacote “*phyloseq*” (MCMURDIE; HOLMES, 2013) do R. Para isso, as sequências foram rarefeitas com

base na menor sequência obtida. Teste t de Student foi aplicado para verificar diferenças significativas na diversidade microbiana nos diferentes tratamentos. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

Para testar os padrões de co-ocorrência de procariotos e fungos, foram removidas UTOs com menos de cinco sequências e filtradas UTOs que não estavam presentes em no mínimo 3 amostras. Posteriormente foi feita sumarização com base na última classificação taxonômica encontrada e os arquivos foram unidos em um só para serem processadas no “mothur”, adotando o procedimento SparCC (FRIEDMAN; ALM, 2012). A co-ocorrência foi considerada robusta quando as correlações (positivas ou negativas) foram maiores ou iguais a 0,7 e estatisticamente significantes (valor de $p \leq 0,05$) baseada na correlação de Pearson. A rede de interações foi explorada e visualizada com a plataforma interativa Gephi.

4 RESULTADOS

Após filtrações por qualidade das leituras geradas pelo sequenciamento, foram obtidas um total de 204.834 sequências de procariotos agrupadas em 3.287 UTOs e 117.116 sequências de fungos, agrupadas em 778 UTOs. A partir dessas tabelas, foi feita sumarização e foram unidas em uma só para a construção da rede, resultando em 296.895 sequências agrupadas em 1.570 UTOs. Considerando a similaridade de 97% como critério para o agrupamento das sequências em UTOs, antes da rarefação a cobertura amostral de procariotos variou de 95 a 97% e a de fungos variou de 98 a 99%. Não houve diferença na cobertura após a rarefação dos dados e, apesar da cobertura das sequências fúngicas apresentar-se maior, ambas apresentaram um número suficiente de sequências indicando que a amostragem da microbiota do líquido ruminal foi representativa (Tabela 1).

Tabela 1: Cobertura amostral, número de UTOs com corte de 97% de similaridade e estimador de riqueza de Chao1 antes e após a rarefação das sequências de procariotos e de fungos.

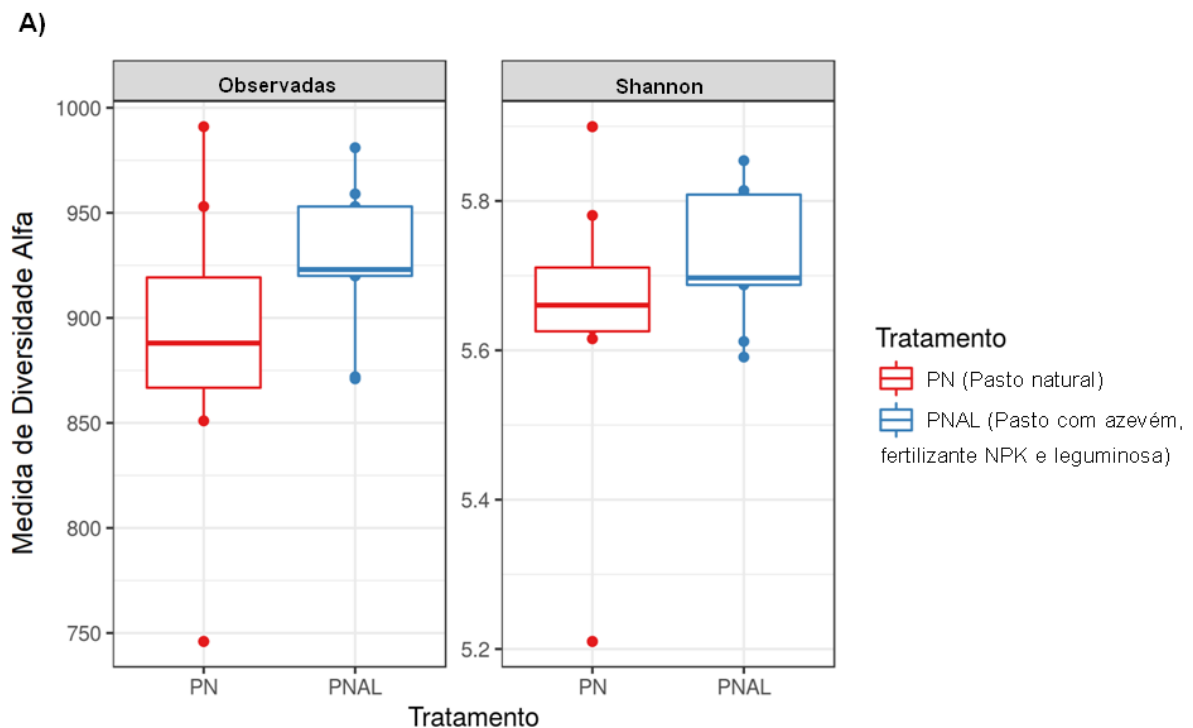
Organismos	Identificação das amostras	Pré-rarefação			Pós-rarefação		
		Cobertura	OTUs observadas	Chao1	Cobertura	OTUs observadas	Chao1
Procariotos							
	LR4058	0,96304	1064	1383,4	0,96473	988	1295
	LR4063	0,97162	1278	1629,4	0,96094	1042	1385
	LR4065	0,97627	1314	1641,2	0,95887	1026	1395,4
	LR4067	0,96651	1188	1538,9	0,96186	1011	1350,2
	LR4069	0,97108	1211	1550,7	0,9637	1016	1314
	LR4095	0,96941	1345	1699,3	0,95681	1135	1498,4
	LR4131	0,9729	966	1298,3	0,96933	825	1094
	LR4187	0,97281	1163	1560,7	0,96312	976	1285,4
	LR4033	0,96254	1108	1449,7	0,96278	1019	1318
	LR4047	0,9666	1207	1633,6	0,95991	1046	1411,8
	LR4075	0,96721	1150	1493	0,96508	993	1298
	LR4085	0,98019	1335	1680,1	0,96358	1026	1310,6
	LR4125	0,95873	1185	1588,3	0,95887	1076	1463,3
	LR4129	0,97537	1332	1577,2	0,96152	1075	1377,4
	LR4133	0,96344	1226	1574,3	0,95922	1062	1409,1
	LR4155	0,97067	1309	1622,4	0,96278	1079	1354,4
	LR4257	0,95839	1186	1558,2	0,95807	1084	1468
Fungos							
	LR4058	0,99928	176	178	0,9926	149	158
	LR4063	0,99888	93	98	0,99688	90	93,5

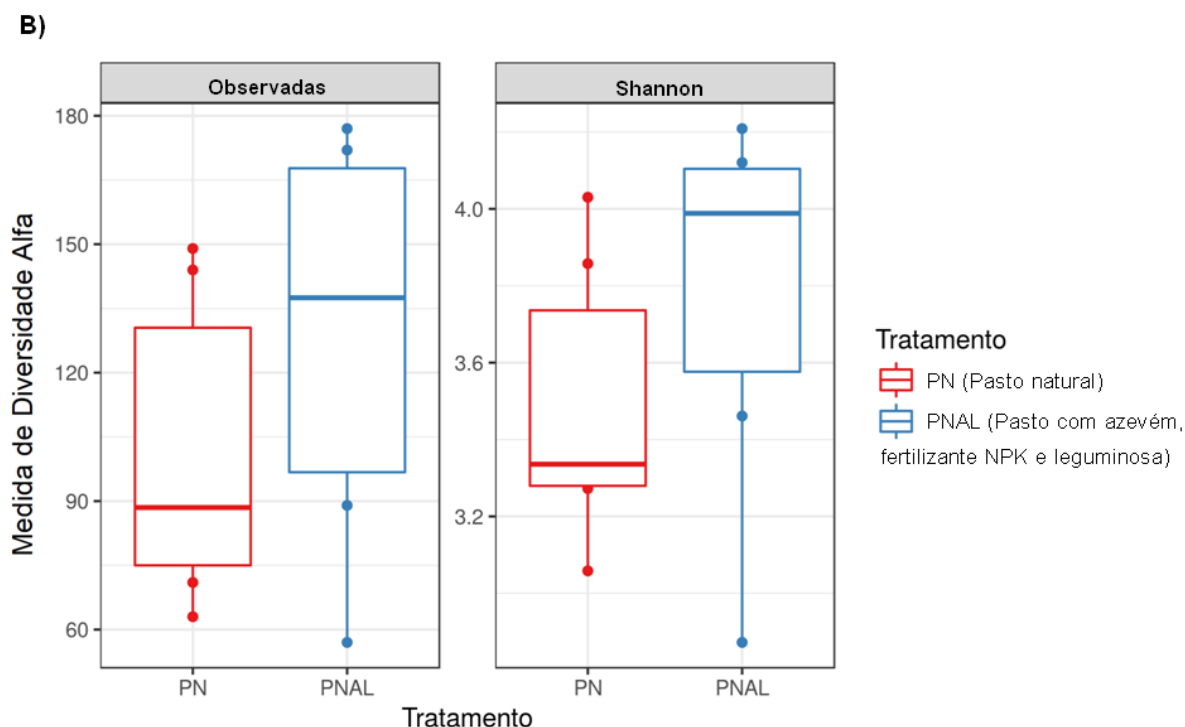
LR4065	0,99821	100	104,5	0,99532	90	96
LR4067	0,99815	73	82	0,99571	66	77
LR4095	0,99944	167	168,1	0,99376	145	151,7
LR4187	0,99805	74	74,8	0,99805	74	74,8
LR4033	0,99922	133	134,2	0,99532	124	128,1
LR4047	0,99883	60	62	0,99961	55	55
LR4125	0,99875	211	220,1	0,98597	176	200,2
LR4129	0,99861	169	180	0,99454	150	154,3
LR4133	0,99711	93	102	0,99649	91	94,6
LR4257	0,99903	211	214,6	0,98519	171	196,1

Fonte: da autora, 2018.

Os cálculos de alfa diversidade mostraram que a diversidade de bactérias no rúmen foi maior que a de fungos, porém, tanto na comunidade procariótica (Figura 1A) quanto na fúngica (Figura 1B) a diversidade microbiana entre os tratamentos foi semelhante ($p>0,05$).

Figura 1: Medidas de diversidade alfa da comunidade microbiana presente no líquido ruminal de novilhas. Os painéis representam as UTOs observadas e índice de diversidade de Shannon respectivamente da esquerda para direita. As caixas abrangem o primeiro ao terceiro quartil; a linha horizontal dentro das caixas representa a mediana. A linha vertical que ultrapassa as caixas indica variabilidade fora dos quartis inferior e superior e os pontos indicam valores discrepantes (outliers). A) Comunidade de procariotos; B) Comunidade de fungos.



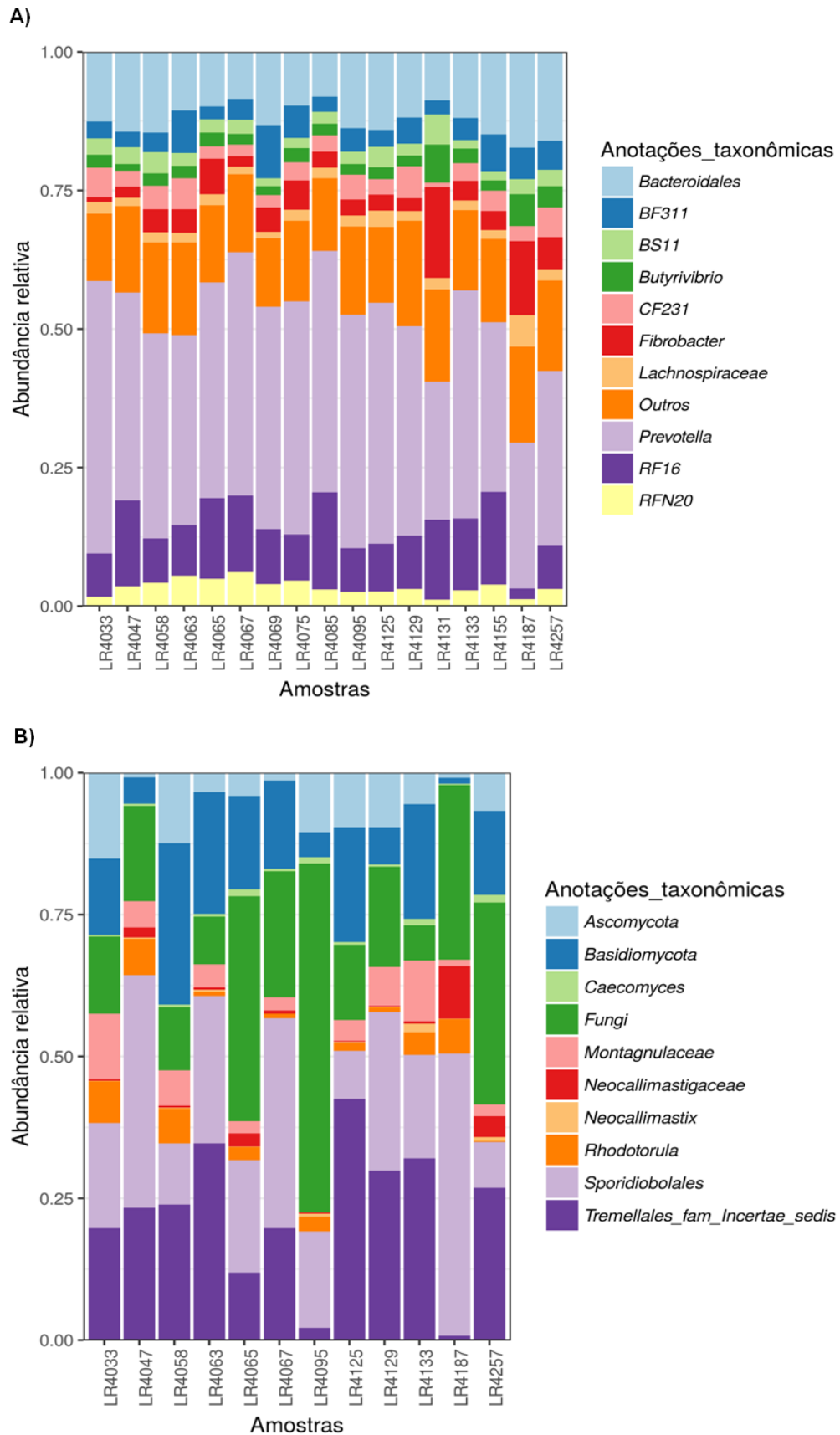


Fonte: da autora, 2018.

O *core* da comunidade de procariotos, representado por todos os microorganismos presentes em todas as amostras de líquido ruminal, foi composto por 38 UTOs: *Bacteroidales*, *Acholeplasmatales*, *Prevotella*, *CF231*, *RF16*, *YRC22*, *Fibrobacter succinogenes*, *Lachnospiraceae*, *BS11*, *Succiniclasticum*, *Butyrivibrio*, *RF39*, *RFN20*, *Clostridiales*, *BF311*, *Pseudobutyrvibrio*, *Oscillospira*, *Succinivibrionaceae*, *ML615J-28*, *Alphaproteobacteria*, *Victivallaceae*, *Paraprevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Succinivibrio*, *Treponema*, *Anaeroplasma*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Elusimicrobiaceae*, *LD1*, *R4-41B*, *Clostridium*, *SR1*, *PL-11B10*, *RF32*, *RFP12*, *LD1-PB3*, *Anaerovibrio*. O filo *Bacteroidetes* apresentou maior abundância relativa, totalizando em média quase 80% da comunidade procariótica, sendo *Prevotella* responsável por 40% dessa porcentagem total. As UTOs mais abundantes estão apresentadas na Figura 2A.

Em relação à comunidade fúngica, apenas 10 UTOs estavam presentes em 100% as amostras (Figura 2B). O filo *Basidiomycota* mostrou-se o mais abundante, com uma média amostral total de 63%. Dentre UTOs mais abundantes, com média amostral total em torno de 20%, encontravam-se *Sporidiobolales*, *Tremellales fam Incertae sedis* e uma UTO sem classificação de filo.

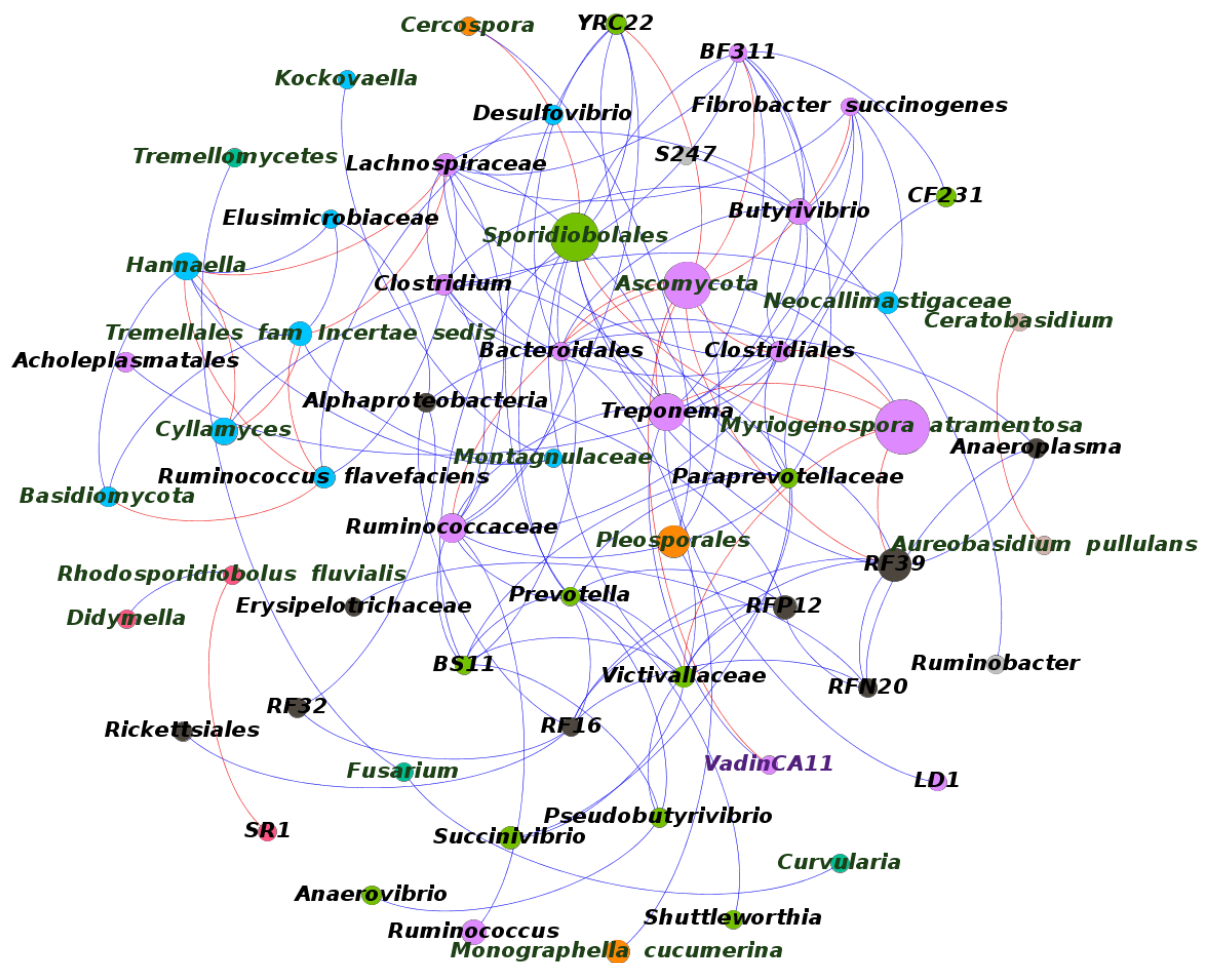
Figura 2: Abundância relativa das UTOs mais abundantes do core microbiano de amostras do líquido ruminal de novilhas. A) Comunidade de procaríotos; B) Comunidade de fungos.



Fonte: da autora, 2018.

Através da construção da rede foi possível identificar correlações microbianas existentes no líquido ruminal de novilhas essenciais para formação desta comunidade (Figura 3). De um total de 58 nós e 131 conexões significativas entre os filotipos ($p \leq 0,05$), 107 correlações foram positivas e 24 foram negativas. Dentre essas 131 conexões, haviam 84 correlações entre as bactérias, 19 entre os fungos, 26 entre fungos e bactérias, 1 entre arqueias e bactérias e 1 entre arqueias e fungos.

Figura 3: Rede de associação da comunidade microbiana presente em amostras do líquido ruminal de novilhas. Uma conexão representa uma forte correlação de Pearson ($p \geq 0,7$ e valor de $p \leq 0,05$). Cada nó representa uma Unidade Taxonômica Operacional (UTO). Os tamanhos de cada nó são proporcionais aos valores de centralidade de autovetor de cada táxon e as cores variam de acordo com a formação de uma classe modular. UTOS em roxo representam arqueias, em preto as bactérias e em verde os fungos. Linhas azuis representam correlações positivas e linhas vermelhas representam correlações negativas.



Fonte: da autora, 2018.

A rede apresentou-se modular, com um valor de 0,507 (valores maiores que 0,4 sugerem que a rede possui estrutura modular; NEWMAN, 2006), sendo dividida em 9 classes modulares. O valor do coeficiente médio de agrupamento foi de 0,157 e do comprimento médio do caminho foi 2,161. O coeficiente de agrupamento indica a probabilidade de que dois taxa co-ocorram com um terceiro, já o comprimento do caminho indica a distância média mais curta da rede entre todos os pares de nós.

Cálculos da centralidade de autovetor sugerem uma maior influência dos fungos no rúmen, sendo *Myriogenospora atramentosa* (1.0), *Sporidiobolales* (0,83) e *Ascomycota* (0,8) os filotipos mais influentes. *Sporidiobolales* mostrou-se responsável em sua maioria por interações positivas, enquanto *Ascomycota* e *Myriogenospora atramentosa* foram associados em sua maioria a interações negativas, excetuando-se quando relacionados entre si. No geral, todas as interações negativas estão relacionadas a uma UTO que engloba organismos causadores de doenças e apenas 5 delas são entre dois filotipos fúngicos.

A única UTO de arqueias metanogênicas identificada com correlação significativa foi pertencente ao gênero *VadinCA11* apresentando correlações por volta de 0,7 porém negativa em relação a *Ascomycota* e positiva quando em interação com *Treponema*.

5 DISCUSSÃO

Apesar de estudos destacarem modificações no microbioma do rúmen devido a mudança na alimentação, a comunidade bacteriana, que é a mais bem descrita na literatura, parece manter-se estável. (HENDERSON et al., 2015; KOIKE; KOBAYASHI, 2001; MARTIN et al., 2001). Isso corrobora com achados na alfa diversidade que, apesar da diferente composição das pastagens a que as novilhas estiveram submetidas, tanto a comunidade de procaríotos, quanto a de fungos não apresentaram diferenças significativas.

Já foi descrito também a manutenção do *core* microbiano em diferentes dietas em novilhas e *Prevotella* esteve presente em todas as amostras (JAMI; MIZRAHI, 2012; PETRI et al., 2013), como encontrado neste estudo, inclusive aumentando sua abundância em ambientes acidóticos (PETRI et al., 2013).

Ruminococcus flavefaciens, *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Prevotella* são algumas das principais bactérias capazes de degradar carboidratos estruturais como hemicelulose, celulose (KOIKE; KOBAYASHI, 2001), sendo que *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Lachnospiraceae* desempenham um importante papel na degradação de xilanas (KRAUSE et al., 2003), estando intimamente ligados a bactérias degradadoras de celulose (FLINT et al., 2008). Por outro lado, bactérias que não possuem capacidade lignocelulolítica, como a espiroqueta *Treponema*, são extremamente importantes para a atuação de bactérias celulolíticas e apresentam-se como primeiros colonizadores de superfícies de celulose, contribuindo para a maior liberação de ácidos graxos de cadeia curta (KUDO; CHENG; COSTERTON, 1987). Isso pode explicar a influência de *Treponema* na rede e sua densa conexão com outras bactérias celulolíticas.

Neocallimastigaceae e *Neocallimastix* identificadas como pertencentes ao *core* microbiano fúngico, estão entre os principais degradadores de fibras e produtores de exocelulases, juntamente a *Orpinomyces* e *Piromyces* (KRAUSE et al., 2003). Organismos pertencentes à *Sporidiobolales* já foram descritos não só pela sua capacidade de degradação de carboidratos (GALAFASSI et al., 2012), mas especialmente pela sua atividade como agente biocontrolador de fungos patogênicos de plantas e pequena ação na degradação de algumas micotoxinas (CASTORIA et al., 2005; LIMA et al., 1998; ŠTYRIAK et al., 2001). Esse potencial de biocontrole de patógenos pode estar relacionado a sua interação negativa com

Cercospora, um fungo que produz uma toxina fitotóxica chamada cercosporina (DAUB; EHRENSHAFT, 2000; FAJOLA, 1978) e *Myriogenospora atramentosa* um endofítico, que causa infecção sistêmica em gramíneas (LUTTRELL; BACON, 1977), afeta o desenvolvimento de insetos (CLAY; HARDY; HAMMOND, 1985) e ainda é descrita como possível causadora de toxicidade em bovinos (LUTTRELL; BACON, 1977). *Myriogenospora atramentosa* pertence ao filo *Ascomycota*, outra UTO que parece afetar negativamente a comunidade ruminal, já que engloba uma grande parte dos fungos patogênicos de plantas e animais (BERBEE, 2001).

6 CONCLUSÕES

A comunidade microbiana do líquido ruminal de novilhas submetidas à pastagem natural e a pastagem com adição de fertilizante NPK, azevém e leguminosas não se alterou significativamente, mostrando a estabilidade dessa comunidade em meio a mudanças de dieta. Apesar de bactérias dominarem a comunidade ruminal em abundância, fungos se mostram mais influentes sob o ponto de vista das interações que ocorrem dentro deste ambiente. Essas interações microbianas podem resultar em um efeito sinérgico na degradação de vegetais, aumentando a eficiência alimentar ou antagonista, atuando no controle de algum patógeno.

7 REFERÊNCIAS

BERBEE, M. L. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 165–187, 1 out. 2001.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, maio 2010.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, ago. 2012.

CASTORIA, R. et al. Effect of the Biocontrol Yeast *Rhodotorula glutinis* Strain LS11 on Patulin Accumulation in Stored Apples. **Phytopathology**, v. 95, n. 11, p. 1271–1278, nov. 2005.

CHENG, Y. F. et al. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 585–592, maio 2009.

CLAY, K.; HARDY, T. N.; HAMMOND, A. M. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. **Oecologia**, v. 66, n. 1, p. 1–5, 1 abr. 1985.

DAUB, M. E.; EHRENSHAFT, M. The Photoactivated *Cercospora* Toxin Cercosporin: Contributions to Plant Disease and Fundamental Biology. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 461–490, set. 2000.

DIJKSTRA, J. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. **Livestock Production Science**, Feed Evaluation for Ruminants. v. 39, n. 1, p. 61–69, 1 jun. 1994.

DOMINGUEZ BELLO, M. G.; ESCOBAR, A. Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. **Animal Feed Science and Technology**, Legume

Forages and Indigenous Browse for Ruminants in the Semi-Arid Tropics. v. 69, n. 1, p. 91–102, 1 nov. 1997.

DOMINGUEZ-BELLO, M. Detoxification in the rumen. **Annales de zootechnie**, v. 45, n. Suppl1, p. 323–327, 1996.

FAJOLA, A. O. Cercosporin, a phytotoxin from *Cercospora* spp. **Physiological Plant Pathology**, v. 13, n. 2, p. 157–164, 1 set. 1978.

FLINT, H. J. et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 121–131, fev. 2008.

FRIEDMAN, J.; ALM, E. J. Inferring Correlation Networks from Genomic Survey Data. **PLOS Computational Biology**, v. 8, n. 9, p. e1002687, 20 set. 2012.

GALAFASSI, S. et al. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 398–403, 1 maio 2012.

GOOD, I. J. The Population Frequencies of Species and the Estimation of Population Parameters. **Biometrika**, v. 40, n. 3/4, p. 237–264, 1953.

HACKMANN, T. J.; SPAIN, J. N. Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1320–1334, abr. 2010.

HASSANIN, A.; DOUZERY, E. J. P. Molecular and morphological phylogenies of ruminantia and the alternative position of the moschidae. **Systematic Biology**, v. 52, n. 2, p. 206–228, abr. 2003.

HENDERSON, G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14567, 9 out. 2015.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (EDS.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2. ed. [s.l.] Springer Netherlands, 1997.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. [s.l.] Academic Press, 1966.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33306, 14 mar. 2012.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, n. 1, p. 1–22, 27 ago. 2010.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS microbiology letters**, v. 204, n. 2, p. 361–366, 13 nov. 2001.

KRAUSE, D. O. et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 5, p. 663–693, dez. 2003.

KUDO, H.; CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the in vitro degradation of straw cellulose. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 244–248, mar. 1987.

LIMA, G. et al. Activity of the Yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* Against Post-harvest Rots on Different Fruits. **Biocontrol Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 257–267, 1 jun. 1998.

LUTTRELL, E. S.; BACON, C. W. Classification of *Myriogenospora* in the Clavicipitaceae. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, n. 15, p. 2090–2097, 1 ago. 1977.

MARTIN, C. et al. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 41, n. 5, p. 413–424, out. 2001.

NEWMAN, M. E. J. Modularity and community structure in networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 23, p. 8577–8582, 6 jun. 2006.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, jun. 2002.

PETRI, R. M. et al. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83424, 31 dez. 2013.

PYLRO, V. S. et al. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30–37, dez. 2014.

ŠTYRIAK, I. et al. The use of yeast for microbial degradation of some selected mycotoxins. **Mycotoxin Research**, v. 17, n. 1, p. 24–27, 1 mar. 2001.

WOLIN, M. J. Fermentation in the rumen and human large intestine. **Science**, v. 213, n. 4515, p. 1463–1468, 25 set. 1981.