

DETECÇÃO MOLECULAR DE GRUPOS DE BACTÉRIAS FERMENTADORAS NO RÚMEN DE BOVINOS E BUBALINOS EM SANTARÉM-PA

(Molecular detection of groups of fermentative bacteria in the rumen of cattle and buffaloes in Santarém-Pa)

Leandro Lira de SOUZA*; Márcia Mourão Ramos AZEVEDO; Adriane Xavier HAGER

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Rua Vera Paz, s/n (Unidade Tapajós)
Bairro Salé. CEP: 68.040-255. E-mail: leandrolirared@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi detectar grupos de bactérias do conteúdo ruminal de bubalinos e bovinos utilizando técnicas de Biologia Molecular. As coletas foram realizadas no Frigorífico Mararu, na cidade de Santarém-PA. Foram coletadas 10 amostras de líquido ruminal, sendo 5 de bovinos e 5 de bubalinos. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo do Kit Brasília baseado em sílica. Para a detecção das bactérias, foram utilizados os primers 16S L2 e 1472, AR e BR. Foi utilizado para a PCR, num volume de 25 µl, o kit PCR Mix LGC 2X. As amostras foram corridas em gel de agarose 3% corado com Azul de Bromofenol e GelRed. Após a corrida, o gel foi visualizado em radiação UV. Os primers utilizados na amplificação da região do gene 16S rRNA se mostraram eficientes para os estudos de detecção das bactérias ruminais. Foi observada a diferença entre bovinos e bubalinos, onde os primers L2 e 1472 amplificaram em bovinos o grupo de bactérias fibrolíticas e em bubalinos o grupo de bactérias não fibrolíticas. Enquanto os primers AR e BR amplificaram o grupo de bactérias não fibrolíticas para bovinos e o grupo de bactérias fibrolíticas para bubalinos. Os trabalhos de identificação de bactérias ruminais em bubalinos é escasso, por isso a importância dos resultados encontrados. Houve diferença nos grupos de microrganismos encontrados nos ruminantes entre bubalinos e bovinos, e no tipo de primer utilizado, mostrando a importância do estudo das bactérias presentes no rúmen. O estudo realizado necessita de uma abordagem maior, como o sequenciamento das amostras de DNA para se identificar melhor as espécies presentes dentro dos diferentes grupos detectados. Outras técnicas de Biologia Molecular podem ser utilizadas para uma melhor acurácia dos dados encontrados, como o uso da PCR em tempo real.

Palavras-chave: Biologia molecular, RNA ribossomal, ruminantes.

ABSTRACT

The objective of this work was to detect groups of bacteria in the rumen content of buffaloes and cattle using molecular biology techniques. The samplings were carried out in the Fridge Mararu, in the city of Santarém-PA. Were collected 10 samples of ruminal fluid, being 5 to buffaloes and 5 of cattle. DNA extraction was performed according to the protocol of the Kit Brasília based on silica. For the detection of bacteria, we used primers 16S L2 and 1472, AR and BR. It was used for PCR, a volume of 25 µl PCR kit Mix LGC 2X. The samples were run on 3% agarose gel stained with bromophenol blue and GelRed. The gel was visualized on a UV radiation. The primers used in the amplification of the region of the 16S rRNA gene was shown to be effective for the studies of detection of ruminal bacteria. It

*Endereço para correspondência:
leandrolirared@gmail.com

was observed the difference between cattle and buffalo, where the primers L2 and 1472 amplified in cattle the group of fibrolytic bacteria and in buffaloes the group of not fibrolytic bacteria. While the primers AR and BR amplified the group of not fibrolytic bacteria for cattle and the group of fibrolytic bacteria to Buffalo. The work of identification of ruminal bacteria in buffaloes is scarce, so the importance of the results found. There was a difference in the groups of microorganisms found in ruminants between buffaloes and cattle, and the type of primer used, showing the importance of the study of bacteria in the rumen. The study requires a larger approach, such as the sequencing of the DNA samples to better identify the species present within the different groups were detected. Other Molecular Biology techniques can be used for better accuracy of data found, such as the use of PCR in real time.

Key words: Molecular biology, ribosomal RNA, ruminants.

INTRODUÇÃO

A capacidade de aproveitamento de nutrientes na digestão microbiana mostra o interesse no potencial produtivo dos ruminantes. De acordo com Sampaio *et al.* (2009), o ruminante tem um sistema digestivo característico, permitindo a digestão de alimentos fibrosos, com a possibilidade de converter celulose e outros polissacarídeos encontrados na parede celular de vegetais em energia usados juntamente com compostos nitrogenados para a produção de carne, leite, entre outros derivados.

Os ácidos graxos de cadeia curta produzidos durante a fermentação dos carboidratos no rúmen, principalmente, os ácidos acético, propiônico e butírico, representam a principal fonte de energia para os ruminantes, correspondendo de 60 a 80% da energia digestível total (FURLAN *et al.*, 2006). Os compostos nitrogenados da dieta degradados no rúmen podem originar peptídeos, aminoácidos e amônia, e são utilizados pelos microrganismos ruminais para síntese de proteína microbiana, que é normalmente a principal fonte de proteína para os ruminantes (KOZLOSKI, 2002). Estas particularidades, permitem aos animais ruminantes aproveitar a celulose e os compostos nitrogenados não proteicos em suas dietas possibilitando a redução de custos de produção.

O estudo dos microrganismos ruminais deve ser encarado como uma importante área de pesquisa estratégica (RUSSELL, 2001), pois há um potencial de desenvolvimento da produtividade da pecuária tropical, baseado no conhecimento detalhado da microbiota ruminal e dos parâmetros que a afetam diretamente.

Muitos representantes da população microbiana do rúmen já foram descritos. No entanto, os microrganismos cultivados representam apenas uma pequena parte deste ecossistema. Métodos de biologia molecular baseados principalmente na análise da sequência do gene 16S RNA ribossomal (KONG *et al.*, 2010) têm sido utilizados nos últimos anos, a fim de identificar um grande número de microrganismos anaeróbios, que são desconhecidos ou que não tenham ainda sido cultivados.

O emprego de ferramentas de análise filogenética é uma maneira de conseguir isso, pois após o sequenciamento genômico da região 16S rRNA é permitido a caracterização de comunidades microbianas em ecossistemas complexos, tais como o rúmen (MCSWEENEY *et al.*, 2007). E, para que seja possível o sucesso nas detecções desses microrganismos, a extração do DNA total do líquido ruminal é etapa fundamental no processo. O objetivo deste

*Endereço para correspondência:
leandrolirared@gmail.com

trabalho foi detectar grupos de bactérias do conteúdo ruminal de bubalinos e bovinos utilizando técnicas de Biologia Molecular.

METODOLOGIA

As coletas dos líquidos ruminais foram realizadas manualmente, diretamente dos rumens, logo após os abates e as eviscerações de cinco bovinos e de cinco de bubalinos em um Frigorífico na cidade de Santarém-PA. Os líquidos ruminais foram acondicionados em garrafas pets com capacidade de 1 litro. No laboratório, alíquotas contendo 300 µL dos materiais frescos foram colocadas em tubos de eppendorf para posteriores extrações.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo de extração de DNA genômico do Kit Brasília baseado em sílica. Inicialmente, os 300 µL do material foram centrifugados e a suspensão foi utilizada para extração de bactérias.

Para lise celular, 100 µL de amostra foram adicionados ao tubo com o tampão L1 (tampão de lise e brasílica), previamente homogeneizado. O tubo foi agitado no vortex por 10 segundos, em seguida o tubo ficou descansando em temperatura ambiente por 10 minutos, o tubo foi agitado novamente no vortex por 10 segundos e centrifugado a 10.000 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado.

O pellet de sílica foi lavado para a retirada de outras substâncias, como proteínas, com 900 µL de tampão L2, misturado em vortex e centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 segundos. A lavagem com L2 foi realizada duas vezes. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com 900 µL de tampão L3, misturado em vortex e centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 segundos. Novamente, o pellet foi lavado duas vezes com 900 µL de tampão L4, misturado em vortex e centrifugado a 10.000 rpm, durante 30 segundos. Sempre descartando o sobrenadante.

A amostra foi deixada em 56 °C durante 10 minutos na estufa, com a tampa do tubo aberta, para secagem da sílica. Em seguida, foram adicionados 100 µL do tampão de eluição (E1) para que o DNA se desprendesse da sílica e entrasse no estado líquido, agitou-se vigorosamente e deixou-se na estufa a 56 °C, por 10 minutos, desta vez com a tampa do tubo fechada. Logo após, centrifugou-se as amostras a 10.000 rpm, por 10 minutos e recuperou-se 100 µL do sobrenadante.

Após a extração, os tubos foram armazenados em um refrigerador para serem utilizados posteriormente nas demais técnicas de Biologia Molecular.

Para a detecção molecular das bactérias, foram utilizados os primers 16S: L2, 1472, AR e BR (Tab. 01). O volume total de reação foi de 25 µL, o programa de amplificação foi o mesmo para todos os primers, mudando apenas a temperatura de anelamento 53 °C e 53,3 °C, respectivamente. As condições da PCR foram de uma etapa inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos, de 94 °C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos, variando a temperatura de anelamento de cada primer e extensão de 72 °C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Foi utilizado para a PCR, o kit PCR Mix LGC 2X, que já contém a enzima Taq DNA polimerase, tampões de reação adequados (Tris-HCl, KCl), dNTPs e MgCl₂, ajustado

*Endereço para correspondência:
leandrolirared@gmail.com

adequadamente à concentração final. As concentrações dos reagentes nas reações de PCR foram as mesmas para ambos os primers (Tab. 02) utilizados em sistema PCR convencional.

Tabela 01: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados nas reações de PCR.

Primers	Sequência
16S L2	5'TGCCTGTTTATCAAAAACAT3'
16S 1742	5'AGATAGAAACCAACCTGG3'
16S AR	5'CGCCTGTTTATCAAAAACAT3'
16S BR	5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3'

No controle negativo foi utilizada água ultrapura em substituição a amostra de DNA. Após as reações de amplificações, as amostras juntamente com o marcador de 100 pb foram corridos em gel de agarose 3% corado com Azul de Bromofenol e GelRed, durante 45 min em 100 V. Após a corrida, o gel foi visualizado em transiluminador sob a radiação UV.

Tabela 02: Reagentes utilizados nas reações de PCR.

PCR buffer	1X
PCR Mix LGC 2X	12,5 µL
Primer Foward	0,25 µL
Primer Reverso	0,25 µL
DNA (amostra)	2,00 µL
H ₂ O ultrapura	10,00 µL

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os primers utilizados na amplificação da região do gene 16S rRNA se mostraram eficientes para os estudos de detecção de grupos de bactérias ruminais, levando em consideração que conjunto de primers produziu produtos de PCR de tamanhos diferentes para cada grupo de bactérias. O sistema de PCR convencional mostrou resultado positivo nas reações de amplificação do DNA, corroborando com o trabalho de Del Vesco *et al.* (2012) que obtiveram sucesso em amplificar DNA extraído de líquido ruminal fresco.

Foi observada diferença entre bovinos e bubalinos, onde o primer L2, em bovinos, amplificou 450 pb que se refere ao grupo de bactérias fibrolíticas, em bubalinos amplificou 480 pb que se refere ao grupo de bactérias não fibrolíticas. Já o primer 1472 amplificou para ambos 560 pb que se refere ao grupo de bactérias não fibrolíticas (Fig. 01). Enquanto o primer AR amplificou o grupo de bactérias não fibrolíticas com 870 pb para bovinos e o grupo de bactérias fibrolíticas com 840 pb para bubalinos. Já o primer BR amplificou para ambos 650 pb que se refere ao grupo de bactérias não fibrolíticas (Fig. 02).

Esses dados corroboram com estudos realizados por Tajima *et al.* (2001), onde conseguiram detectar diferentes tipos de bactérias presentes no rúmen com propriedades metabólicas conhecidas como a degradação de alimento fibrosos: 445 pb para *Fibrobacter succinogenes*, 835 pb para *Ruminococcus flavefaciens* e não fibrosos: 485 pb para *Prevotella*

*Endereço para correspondência:
leandrolirared@gmail.com

ruminicola, 681 pb para *Eubacterium ruminantium*, 597 pb para *Anaerovibrio lipolytica*, e 869 pb para *Streptococcus bovis*.

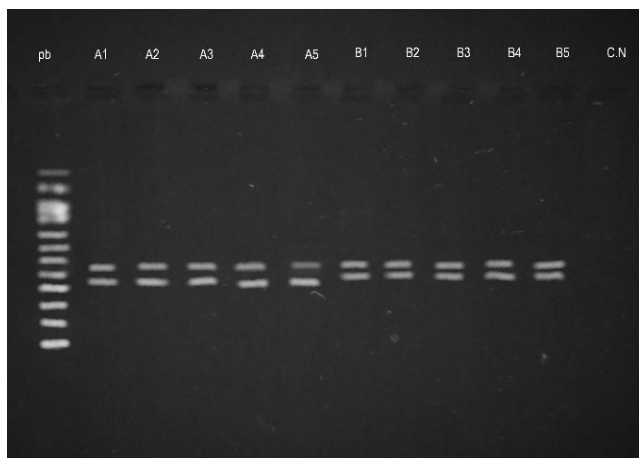


Figura 01: Gel de agarose 3%. Canaleta pb: padrão de 100 pb.

Obs.: Canaletas A1, A2, A3, A4 e A5: amostras de bovinos (Primer L2, 450 pb e primer 1472, 560 pb).
Canaletas B1, B2, B3, B4 e B5: amostras de bubalinos (Primer L2, 480 pb e primer 1472, 560 pb).
Canaleta C.N: Controle Negativo.

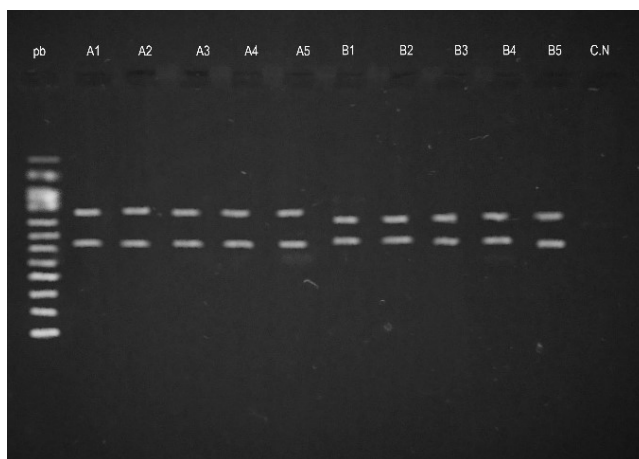


Figura 02: Gel de agarose 3%. Canaleta pb: padrão de 100 pb.

Obs.: Canaletas A1, A2, A3, A4 e A5: amostras de bovinos (Primer AR, 870 pb e primer BR, 650 pb).
Canaletas B1, B2, B3, B4 e B5: amostras de bubalinos (Primer AR, 840 pb e primer BR, 650 pb).
Canaleta C.N: Controle Negativo.

Um estudo realizado por Shynkai *et al.* (2010) identificaram grupos de bactérias fibrolíticas e não fibrolíticas que faziam consórcio fibrolítico com *Fibrobacter succinogenes*. Jami e Mizrahi (2012) afirmam que as bactérias associadas à fibra no rúmen consistem não apenas de bactérias fibrolíticas, mas também de bactérias não fibrolíticas. Mostrando a importância da interação entre os diferentes microrganismos na fermentação do alimento para melhor aproveitamento pelo ruminante.

Koike e Kobayashi (2003) realizaram ensaios competitivos de PCR para a determinar espécies de bactérias fibrolíticas do rúmen de bovinos. Os mesmos autores

*Endereço para correspondência:
leandrolirared@gmail.com

relataram a importância desses microrganismos presentes no rúmen para que ocorra uma melhor eficiência de utilização dos alimentos fibrosos da dieta pelos animais ruminantes.

Os trabalhos de identificação de bactérias ruminais em bubalinos são escassos, por isso a importância dos resultados encontrados. Wanapat e Cherdthong (2009) realizaram um trabalho de detecção de grupos de bactérias fibrolíticas em bubalinos, assim como no trabalho apresentado, porém os autores utilizaram a técnica de PCR em tempo real, determinando a população de importantes espécies bacterianas no rúmen (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*). Singh *et al.* (2013) avaliaram as espécies bacterianas fibrolíticas e não fibrolíticas presentes no rúmen de bubalinos com o uso da PCR em tempo real.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os microrganismos do rúmen, especialmente as bactérias ruminais, representam a principal fonte de energia e de proteína aos animais ruminantes. Considerando a complexidade do rúmen, atualmente o número de primers projetados para monitorar os grupos de microrganismos neste ecossistema é bastante limitado, em especial aos bubalinos. A utilização e o desenvolvimento dessa detecção molecular são importantes para o estudo das bactérias ruminais, devido principalmente à dificuldade de cultivá-las *in vitro*.

O estudo realizado necessita de uma abordagem maior, como o sequenciamento das amostras de DNA para se identificar as espécies presentes nos grupos de bactérias fibrolíticas e não fibrolíticas detectados. Outras técnicas de Biologia Molecular podem ser utilizadas para uma melhor acurácia dos dados encontrados, como o uso da PCR em tempo real.

REFERÊNCIAS

DEL VESCO, A.P.; SILVA, S.C.C.; BAGATOLI, A.; GASPARINO, E.; SOARES, M.A.M.; VOLTOLINI, D.M.; BUZZO, A.M.R.; MARQUES, L.A.; KHATLAB, A.S. Identificação de bactérias ruminais via PCR - Multiplex utilizando DNA extraído diretamente do líquido ruminal fresco e conservado em metanol. *Acta Tecnológica*, v.7, n.2, 2012.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D.E. Anatomia e fisiologia do trato gastrintestinal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.) *Nutrição de ruminantes*. 1ª ed., Jaboticabal: Funep, p.1-23, 2006.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One*, v.7, n.3, p.1-8, 2012.

KOIKE, S.; YOSHITANI, S.; KOBAYASHI, Y.; TANAKA, K. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v.229, p.23-30, 2003.

*Endereço para correspondência:
leandrolirared@gmail.com

KONG, Y.; TEATHER, R.; FORSTER, R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiology Ecology*, v.74, p. 612–622, 2010.

KOZLOSKI, G.V. *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria, RS: 1^a ed., Editora UFSM, 2002. 140p.

MCSWEENEY, C.S.; DENMAN, S.E.; WRIGHT, A.; YU, Z. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v.20, n.2, p.283, 2007.

RUSSELL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. *Science*, v.292, Issue 5519, p.1119-1122, 2001.

SAMPAIO, C.B.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; SOUZA, M.A.; LAZZARINI, I.; PAULINO, P.V.R.; QUEIROZ, A.C. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.10, p.2021-2030, 2009.

SHINKAI, T., UEKI, T.; KOBAYASHI, Y. Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. *Animal Science Journal*, v.81, p.72-79, 2010.

SINGH, K.M.; TRIPATHI, A.K.; PANDYA, P.R.; PARNERKAR, S.; RANK, D.N.; KOTHARI, R.K.; JOSHI, C.G. Use of Real-Time PCR Technique in Determination of Major Fibrolytic and non Fibrolytic Bacteria Present in Indian Surti Bufaloes (*Bubalus bubalis*). *Polish Journal of Microbiology*, v.62, n.2, p. 195–200, 2013.

TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.67, n.6, p.2766-2774, 2001.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A. Use of Real-Time PCR Technique in Studying Rumen Cellulolytic Bacteria Population as Affected by Level of Roughage in Swamp Buffalo. *Current Microbiology*, v.58, p.294–299, 2009.