

ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA FÚNGICA RUMINAL ESTÃO RELACIONADAS AO GANHO MÉDIO DIÁRIO DE PESO EM BOVINOS

Anderson Santos de Freitas¹

Diego Bitencourt de David²

Beatriz Midori Takagaki³

Priscila Caroline Thiago Dobbler⁴

Luiz Fernando Wurdig Roesch⁵

Resumo:

Ruminantes são animais herbívoros que possuem um sistema digestivo multicavitário, onde a primeira porção é denominada rúmen. Nesta porção, o alimento é fermentado por bactérias e fungos endógenos, produzindo ácidos graxos, vitaminas e aminoácidos para serem absorvidos. Considerando a importância destes microrganismos para os animais, o presente trabalho objetivou identificar diferenças na composição e na abundância das comunidades microbianas entre animais com ganho de peso médio diário (GMD) superior (maior que 200g por dia) e ganho de peso médio diário (GMD) inferior (menor que 200g por dia). Foram avaliadas 17 novilhas cedidas pelo Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária no final do verão de 2017, através de coletas de líquido ruminal com auxílio de sonda esofágica. O DNA microbiano do rúmen foi extraído com kits comerciais. Os genes marcadores de bactérias e fungos foram amplificados por PCR e sequenciados na plataforma Ion PGM. As sequências geradas foram processadas de acordo com as orientações do Brazilian Microbiome Project e agrupadas por similaridade em unidades taxonômicas operacionais (UTOs). As análises de diversidade e abundância diferencial foram realizadas no ambiente R tanto para bactérias quanto para fungos. Os resultados não mostraram diferenças significativas na alfa e na beta diversidade, tanto em bactérias quanto em fungos. A análise de abundância diferencial também não mostrou diferenças significativas na abundância de bactérias. No entanto, a diferença na comunidade fúngica entre os dois grupos testados foi bastante considerável. Em animais com GMD superior foi constatado um aumento na presença de fungos considerados fitopatógenos, como *Pestalotiopsis*, *Sarocladium* e *Cryptococcus*, enquanto que no rúmen de animais com GMD inferior há maior abundância de fungos encontrados no solo, como *Preussia*, *Aspergillus* e *Psilocybe*. Estes resultados apontam para uma maior abundância de fungos especializados em degradar matéria vegetal auxiliando no metabolismo do alimento ingerido pelos ruminantes com GMD superior. A presença destes microrganismos pode auxiliá-los acelerando a degradação das fibras vegetais e acelerando a digestão e, consequentemente, o ganho de peso. Mais estudos são necessários

para confirmar os dados mostrados aqui, mas os resultados mostram um cenário promissor e perspectivas futuras como procura de biomarcadores microbianos de dieta e também para terapias microbianas.

Palavras-chave: 16S rRNA, ITS2, Ruminantes, Sequenciamento de Nova Geração

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA FÚNGICA RUMINAL ESTÃO RELACIONADAS AO GANHO MÉDIO DIÁRIO DE PESO EM BOVINOS

¹ Aluno de graduação. andersonsf234@gmail.com. Autor principal

² Pós-doutorando. diego-david@seapi.rs.gov.br. Co-autor

³ Aluna de graduação. biah.midori@gmail.com. Co-autor

⁴ Doutoranda. prisciladobbler@gmail.com. Co-autor

⁵ Docente. luizroesch@unipampa.edu.br. Orientador

ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA FÚNGICA RUMINAL ESTÃO RELACIONADAS AO GANHO MÉDIO DIÁRIO DE PESO EM BOVINOS

1 INTRODUÇÃO

Animais ruminantes são mamíferos herbívoros pertencentes à subordem Artiodactyla, ordem *Ruminantia*, como os bovinos, bubalinos e ovinos (LI et al., 1990). Seu sistema digestivo compreende um estômago multicavitário, composto por rúmen, retículo, omaso e abomaso (UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2018). O rúmen é a primeira destas cavidades e apresenta uma grande diversidade de fungos e bactérias que fermentam o alimento e produzem ácidos graxos voláteis, fonte primária de energia para estes animais, além de vitaminas e aminoácidos (WLODARSKI et al, 2017; UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2018).

Considerando a importância dos microrganismos do rúmen para a conversão alimentar dos ruminantes, é possível hipotetizar que a presença de diferentes microrganismos no rúmen promove diferentes capacidades de metabolização de alimento. Dessa forma, compreender comportamentos da microbiota ruminal é importante para melhorar o entendimento sobre a nutrição animal e propiciar *insights* sobre melhorias nos processos de suplementação da dieta de animais de interesse econômico, como o gado de corte.

O presente trabalho objetivou analisar diferenças entre a microbiota ruminal de novilhas com ganho de peso diário alto e novilhas com ganho de peso diário baixo em pastagens naturais e adubadas no estado do Rio Grande do Sul.

2 METODOLOGIA

O trabalho foi aprovado no CEUA através do parecer nº 08/2012, ofício 10/12 de 29 de março de 2012 e utilizou amostras de líquido ruminal de 17 novilhas da raça Braford cedidas 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). Essas novilhas foram previamente avaliadas quanto ao ganho médio diário de peso durante 60 dias anteriores à coleta de líquido ruminal (GMD) e classificadas em superior (maior que 200g.dia⁻¹) e inferior (menor que 200g.dia⁻¹). Os animais estavam alocados em pastagens naturais e em pastagens suplementadas com fertilizante NPK, azevém e leguminosa. O líquido foi extraído no fim do verão de 2017, com auxílio de uma sonda esofágica acoplada a uma bomba de vácuo.

O DNA microbiano foi extraído por meio do kit comercial QIAGEN® QIAmp Fast DNA Stool kit. As regiões ITS2 (para identificação de fungos) e V4 do 16S rRNA ribossomal (para identificação de bactérias) foram amplificadas por PCR com primers específicos, sendo posteriormente sequenciados na plataforma Ion PGM™. Ao todo, foram obtidas 17 amostras de DNA bacteriano (9 com GMD inferior e 8 com GMD superior) e 12 de DNA fúngico (6 com GMD inferior e 6 com GMD superior).

As sequências foram processadas seguindo as orientações do Brazilian Microbiome Project (PYLRO et al., 2014). A classificação taxonômica foi feita de acordo com as bases de dados UNITE (para fungos) e Greengenes (para bactérias). A abundância de UTOs foi utilizada para cálculos de alfa e beta diversidade e também para testes de abundância diferencial no ambiente R. Foram considerados como significativos todos os valores de p menores ou iguais a 0,05

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os dados dos 17 animais analisados são apresentados na Tabela 1. Dos 17 animais avaliados, 9 foram classificados como tendo GMD inferior e 8 tendo GMD superior. A tabela mostra que em ambos os grupos há animais tanto da pastagem natural quanto da pastagem suplementada. Também é importante notar que a digestibilidade de matéria orgânica foi similar entre todos os animais e que variáveis como o consumo de proteína bruta e o peso vivo variaram similarmente entre os dois grupos testados (GMD superior e GMD inferior).

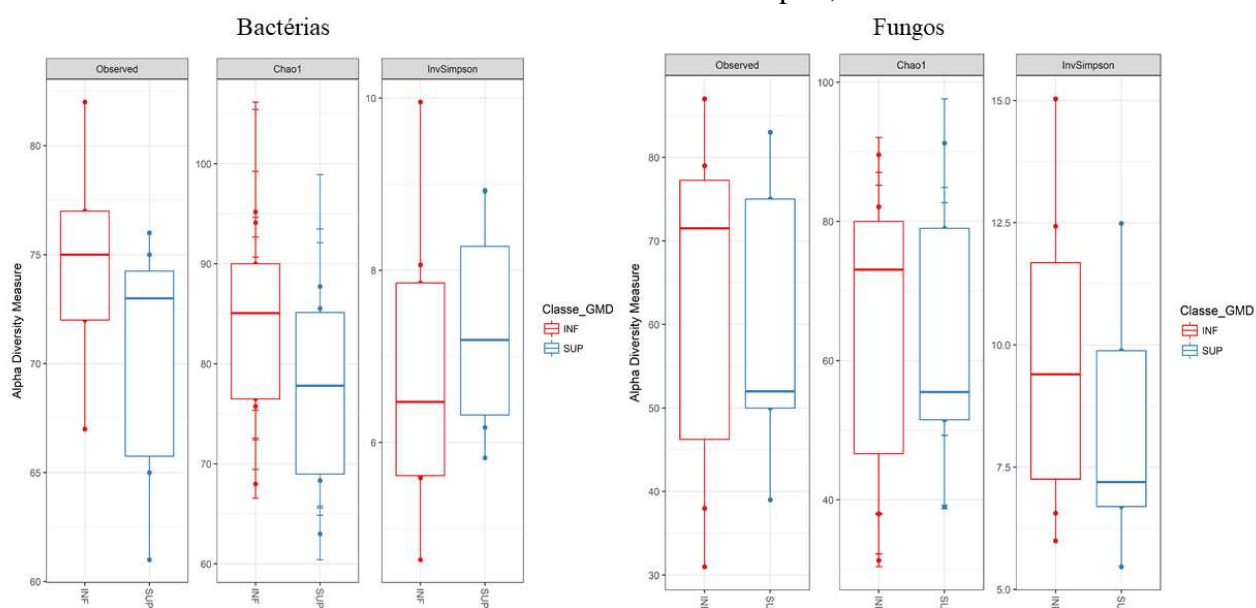
Tabela 1 – Descrição dos animais estudados. Valores cuja diferença entre tratamentos foi significativa segundo o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney estão destacados em negrito.

Variável	Animais com GMD superior (n = 8)	Animais com GMD inferior (n = 9)	Valor p
Pastagem (natural : suplementada)*	3:5	6:3	0,35
Digestibilidade de matéria orgânica (média ± desvio padrão)	0,61 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,35
Consumo de Proteína Bruta (média ± desvio padrão)	582,5 ± 133,8	645,4 ± 50,3	0,34
Ganho de peso médio diário (média ± desvio padrão)	476,5 ± 110,6	210,5 ± 66,4	<0,001
Peso vivo, em kg (média ± desvio padrão)	345,3 ± 33,9	336,2 ± 26,0	0,54

Fonte: dos autores, 2018.

Os resultados não mostraram diferenças significativas na alfa e na beta diversidade tanto de fungos quanto de bactérias (Figuras 1 e 2). No entanto, é possível perceber uma tendência a uma menor diversidade em amostras de animais com ganho médio diário de peso superior, acompanhada de um maior índice de dominância (Figura 1).

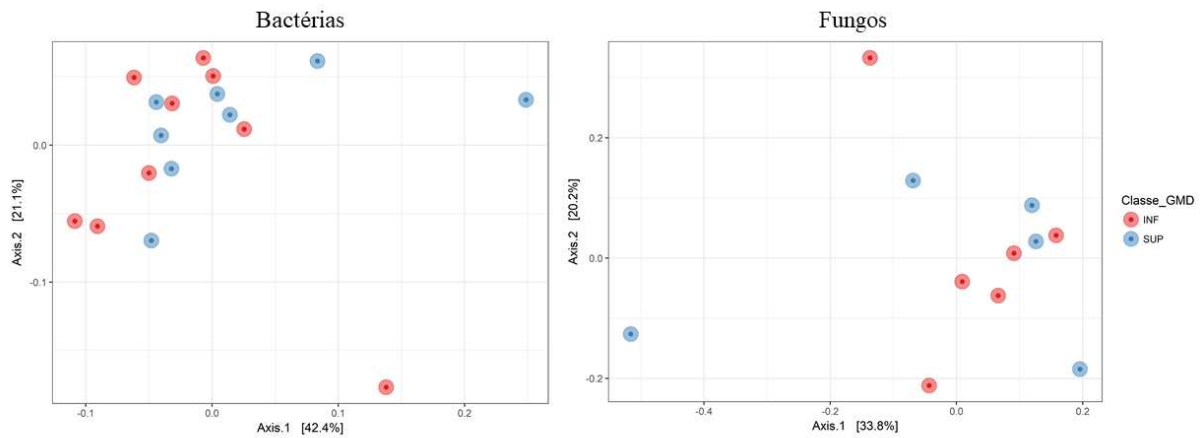
Figura 1- Alfa diversidade de bactérias (n=17) e fungos (n=12) nos dois grupos testados. Observed = diversidade observada. Chao1 = índice de diversidade microbiana. invSimpson = índice de dominância. Legenda: INF = inferior, SUP = superior. A diferença entre os grupos foi testada com o teste t. Valores de $p > 0,05$.



Fonte: dos autores, 2018.

Figura 2 - Beta diversidade de bactérias (n=17) e fungos (n=12) nos dois grupos testados. Foi utilizado o método MDS e plotados os dois eixos mais influentes. Valores de $p > 0,05$.

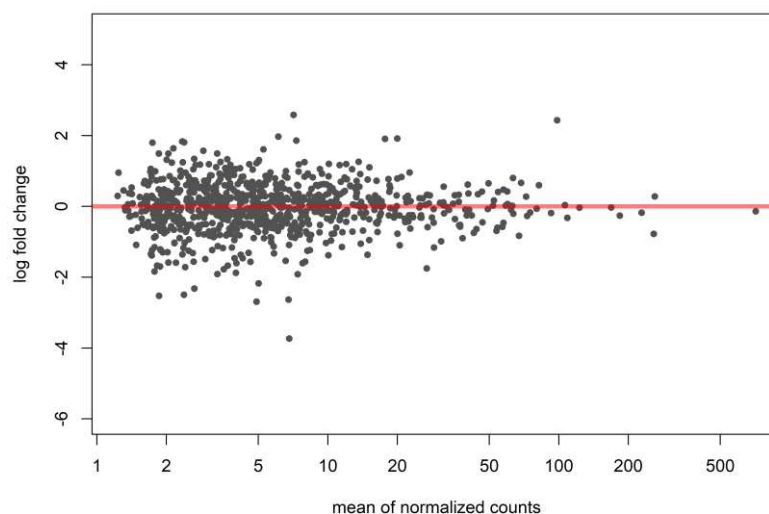
Legenda: INF = inferior, SUP = superior



Fonte: dos autores, 2018.

As análises de abundância diferencial não mostraram diferença significativa na abundância de bactérias entre os dois grupos testados (Figura 3). Entre os fungos, aqueles assinalados como significativamente mais abundantes em animais com GMD superior foram assinalados como pertencentes à espécie *Sarocladium implicatum* e aos gêneros *Pestalotiopsis* e *Cryptococcus*, acompanhados de UTO's agrupadas na família *Tremellales*, no filo *Ascomycota* e de duas UTOs que não foram classificadas além do reino Fungi (Tabela 2). Em contrapartida, UTO's correspondentes aos gêneros *Preussia*, *Aspergillus* e *Psilocybe*, assim como à ordem *Auriculariales*, apresentaram-se como mais abundantes em animais com GMD inferior.

Figura 3 – Gráfico da abundância diferencial de bactérias entre animais com GMD superior e GMD inferior. Cada ponto representa uma UTO. Quanto mais próxima da linha vermelha, mais similar a abundância da UTO entre os dois grupos testados. Nenhuma UTO apresentou diferença significativa entre os dois grupos.



Fonte: dos autores, 2018.

Com base nestas análises, é possível compreender que a microbiota ruminal de bovinos apresenta grande similaridade em organização tanto entre animais com GMD alto quanto animais com GMD baixo. No tocante à comunidade de bactérias, por exemplo, a ausência de diferenças significativas pode ser atribuída à dinâmica das comunidades microbianas, que tendem a se manter estáveis no ambiente ruminal (SHABAT et al., 2016).

Tabela 2 – Abundância diferencial de fungos entre animais com GMD superior e GMD inferior.

Organismo mais similar à UTO	Log2 Fold Change	Valor p
<i>Preussia</i>	-6,43	0,02
<i>Auriculariales</i>	-6,38	<0,01
<i>Aspergillus</i>	-4,89	0,05
<i>Psilocybe</i>	-4,83	0,02
<i>Tremellales</i>	4,17	0,01
<i>Cryptococcus</i>	4,30	0,03
<i>Fungi (1)</i>	5,09	0,04
<i>Pestalotiopsis</i>	5,14	0,04
<i>Sarocladium implicatum</i>	5,83	0,02
<i>Fungi (2)</i>	6,46	0,02

Fonte: dos autores, 2018. Valores positivos indicam UTO's aumentadas em amostras com GMD superior. Valores negativos indicam amostras aumentadas em amostras com GMD inferior.

No entanto, era esperado que diferenças, ainda que sutis, estivessem relacionadas a um melhor ganho de peso. Grandes diferenças de abundância, mostradas por valores de log2 fold change acima de 4, mostram que a abundância de táxons fúngicos se mostrou bastante diferente entre os dois grupos testados. Os gêneros *Pestalotiopsis*, *Sarocladium* e *Cryptococcus*, aumentados em animais com GMD superior, representam fungos fitopatógenos, que são especializados em degradar matéria orgânica vegetal (XUE et al., 2007; GIRALDO et al., 2015; POLETTTO et al., 2016). Sendo fungos com essa especialidade, é possível sugerir que sua atividade celulolítica esteja associada a uma melhor digestibilidade. Em contrapartida, UTOs que representam fungos primariamente oriundos do solo, mais generalistas quanto à decomposição de matéria orgânica, como *Preussia*, *Aspergillus* e *Psilocybe* (LUMBSCH e HUHNDOERF, 2007), apresentam-se como diminuídos em animais com ganho de peso inferior.

Analizando os dados, a principal inferência possível é a de que alguns animais tiveram o aumento de certos microrganismos, principalmente fungos, que são especializados em degradar fibra vegetal e matéria orgânica oriunda de plantas como um todo, e essa característica favoreça a obtenção de ganhos de peso superiores.

É importante ressaltar que diferenças entre ganho de peso médio estão ligadas a padrões individuais em cada indivíduo, como metabolismo e fisiologia. No entanto, sabe-se e descobre-se cada vez mais que os microrganismos estão intimamente ligados a essas características e podem ser promotores e/ou marcadores de processos nos seres vivos (JAMI et al., 2004).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de limitações como número de indivíduos analisados, o presente trabalho sugere que diferenças na microbiota do rúmen, principalmente na abundância de fungos, podem estar ligadas a um maior ganho de peso médio diário por parte de novilhas. Foi

possível observar um padrão de especialização na microbiota ruminal que pode resultar em uma melhor digestibilidade e em um ganho maior de peso. As perspectivas para o trabalho incluem a procura por marcadores daqueles animais “superiores” para futuros programas de seleção animal e também o uso de microorganismos como promotores do ganho de peso de animais de corte em pastagens naturais.

REFERÊNCIAS

GIRALDO, A.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; MADRID, H.; de HOOG, G. S.; CANO, J.; DECOCK, C.; CROUS, P. W.; GUARRO, J. Phylogeny of *Sarocladium* (*Hypocreales*). *Persoonia*, v. 34, p. 10-24, 2015.

JAMI, E.; WHITE, B. A.; MIZRAHI, I. Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. *Plos One*, v.9, p. 85423, 2014.

KOIKE, S.; YOSHITANI, S.; KOBAYASHI, Y.; TANAKA, K. Kinetics of in sacco fiberattachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J Dairy Sci*, v. 86, n. 4, p. 1429–1435, 2003.

LI, W. H.; GOUY, M.; SHARP, P. M.; O’HUGIN, C.; YANG, Y. W. Molecular phylogeny of Rodentia, Lagomorpha, Primates, Artiodactyla, and Carnivora and molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 17, p. 6703-6707, 1990.

LUMBSCH, T. H.; HUHNDOERF, S. M. **Outline of Ascomycota – 2007**. 13^a ed. Chicago, The Field Museum – Department of Botany, 2007.

POLETO, I.; MUNIZ, M. F. B.; LIPPERT, D. B. **Doenças Em Espécies Arbóreas No Sul Do Brasil**. 1^a ed. São Paulo, Paco Editorial, 2016.

PYLRO, V. S.; ROESCH, L. F. W.; MORAIS, D. K.; CLARK, I. M.; HIRSH, P. R.; TÓTOLA, M. R. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *Journal of Microbiological Methods*, n. 107, p. 30-37, 2014.

SHABAT, S. K. B.; SASSON, G.; DORON-FAIGENBOIM, A.; DURMAN, T.; YAACOBY, S.; MILLER, M. E. B.; WHITE, B. A.; SHTERZER, N.; MIZRAHI, I. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal* (2016) 10, 2958–2972

UNIVERSITY OF MINNESOTA. The ruminant digestive system. 2018. Disponível em: <<https://extension.umn.edu/dairy-nutrition/ruminant-digestive-system-0>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

WLODARSKI, L.; MAEDA, E. M.; FLUCK, A. C.; GILIOLI, D. Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **REDVET - Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 11, p. 1-20, 2017.

XUE, C.; TADA, Y.; DONG, X.; HEITMAN, J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. **Cell host & microbiome**, v. 1, n. 4, p. 263-273, 2007.