

Padronização de *primers* para detecção de bactérias dos domínios *Archaea* e *Bacteria* em amostras de líquido ruminal de bovinos suplementados com *Ilex paraguariensis* St.Hill.

Larissa N. C. Gonçalves¹, Léa Chapaval², Tereza C. Alves³, Wilson M. Junior³, Flavia A. Bressani³, Márcio D. Rabelo², Cardoso, D.R.⁴

1. Estudante de IC do Centro Universitário Paulista – UNICEP ; *larissancgoncalves@live.com

2. Orientadora - Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos/SP

3. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos/SP

4. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP

Palavras Chave: *Bactérias Ruminais*, *Extração DNA Genômico*, *Amplificação da região 16S*

Introdução

O rúmen fornece um ambiente favorável ao crescimento e desenvolvimento contínuo de microrganismos, atuando como câmara de fermentação uma vez que tem a capacidade de utilizar grandes variedades de alimentos como fonte de nutrientes. Os métodos convencionais, com base no cultivo do líquido ruminal, para enumerar a população microbiana foram substituídos por técnicas moleculares fundamentadas no estudo da região 16S do rRNA, que fornece a classificação filogenética utilizada na identificação e quantificação desses microrganismos. O objetivo deste trabalho é padronizar *primers* para a detecção de microrganismos pertencentes aos domínios *Bactéria* e *Archaea* em amostras de líquido ruminal de bovinos alimentados com quatro concentrações diferentes de *Ilex paraguariensis* St.Hill (erva-mate), através do sequenciamento de DNA de fragmentos específicos correspondentes à região do rRNA 16s.

Resultados e Discussão

Foi obtido DNA de quatro grupos de bovinos da raça Canchim com 6 animais em cada grupo. Um grupo controle T1 (sem de erva mate) e 3 tratamentos: T2 com 0,5%, T3 com 1,0% e T4 com 1,5% de erva mate na massa final de ração fornecida. Os animais foram abatidos e o conteúdo ruminal de cada grupo foi misturado, dando origem a 4 amostras. As amostras foram processadas para a extração do DNA ruminal com utilização do kit *PowerMax® Soil DNA Isolation Kit*. Os DNAs foram então analisados por eletroforese em gel de agarose (Fig. 1). Em seguida foram feitos o desenho dos *primers* e a padronização das reações de PCR com base nos *primers* descritos por (Klindworth et al., 2012). Foram realizadas amplificações de fragmento do gene 16S rDNA dos microrganismos presentes nas amostras de rumem, por PCR, utilizando os *primers*: S-D-Arch-0519-a-S-15 (15), S-D-Arch-0349-a-S-17 (17), S-D-Bact-0785-b-A-18 (18), S-D-Bact-0785-a-A-21 (21) e S-D-Arch-0519-a-A-16 (16). Foram utilizadas 3 combinações de pares de primers: uma para amplificar exclusivamente 16s do domínio Archea (16/17) e duas para amplificar 16s de ambos os domínios, Bactéria e Archaea (15/21 e 15/18). As condições de PCR foram: Denaturação inicial de 95°C 4 minutos; 25 ciclos de 95°C 40 segundos; 52°C(15/18), 55,2°C (15/21) e 56°C (16/17) 45 segundos; 72°C 30 segundos e extensão final foi de 72°C 5 minutos. A reação foi montada em 50 µL com: 19µ de água, 25µ de Red Mix Kapa KK 2601, 2µl de cada primer a 10µM, e 2µl do gDNA a 6,25ng/µl. Houve amplificação para os pares de *primers* 15/18 e 15/21 ambos que amplificam domínios *Bactéria* e *Archaea* (Fig.2), mas não houve amplificação do par 17/16 que amplificaria exclusivamente o domínio *Archaea*. Estão sendo realizadas otimizações das reações de PCR e

desenho de novos *primers* para amplificar exclusivamente o domínio de *Archaea*. É necessário ter certeza de haver a presença de microrganismos do domínio de *Archaea* nos produtos de PCR para futuro sequenciamento. Paralelamente, os DNAs totais extraídos de rúmen de duas das amostras (0,5 % e 1,5% de mate) foram preparados para serem sequenciados diretamente no sequenciador MiSeq Illumina, seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente o material foi fragmentado em trechos de 350 a 500pb (Fig.3) e teve adaptadores adicionados às extremidades para poderem ser fixados na lâmina do sequenciador e abordados para leitura das sequencias. As sequencias foram obtidas e estão sendo analisadas.

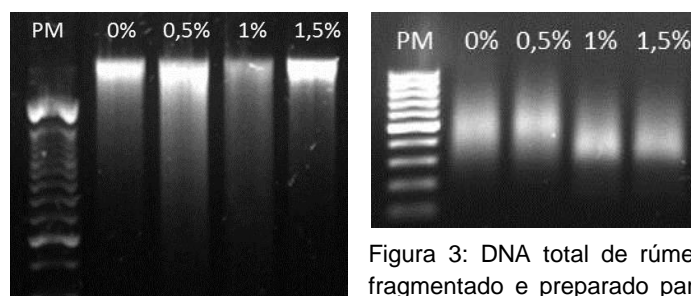


Figura 1: DNA total extraído de rúmen. PM: Marcador de peso molecular 100pb. 0; 0,5; 1 e 1,5%: DNAs obtidos de animais com diferentes concentrações de mate inserido nas dietas.

Figura 3: DNA total de rúmen fragmentado e preparado para sequenciamento. Marcador de peso molecular 100pb. 0; 0,5; 1 e 1,5%: fragmentos de DNA genômico obtidos de animais com diferentes concentrações de mate inserido nas dietas.

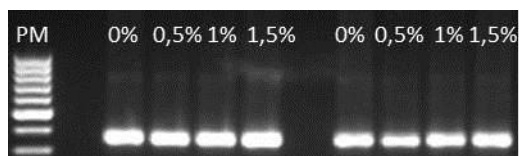


Figura 2: Produtos de PCR da amplificação de 16s a partir de DNA de rúmen para os pares de *primers* 15/21 e 15/18. PM: Marcador de peso molecular 100pb. Bco: Branco da reação. 0; 0,5; 1 e 1,5%: produtos de PCR obtidos de animais com diferentes concentrações de mate inserido nas dietas.

Conclusões

Os DNAs genômicos de microrganismos presentes no líquido ruminal foram obtidos com qualidade e quantidade satisfatórias.

Os produtos de PCR que abrangem os domínios *Archaea* e *Bactéria* foram obtidos com sucesso.

O sequenciamento de DNA total de rúmen vem sendo realizado com êxito.