

CARACTERIZAÇÃO METAGENÔMICA DO MICROBIOMA INTESTINAL DE AVES DE CORTE ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S-rRNA

Igor Ricardo Savoldi¹, Mariane S. Dal Pizzol¹, Kamilla Bleil do Carmo¹,
Adriana M. Guaratini Ibelli², Beatris Kramer², Marcos A. Z. Morés²,
Jane de Oliveira Peixoto³, Maurício Egídio Cantão³, Fátima F.R. Jaenisch³,
Valdir S. Ávila³, Everton L. Krabbe³, Mônica Corrêa Ledur³ e José R. Pandolfi³

¹Graduando em Ciências Biológicas pela Universidade do Contestado, Campus Concórdia, estagiário da Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPQ/PIBIC, igorsavoldi154@hotmail.com.

²Analista na Embrapa Suínos e Aves

³Pesquisador na Embrapa Suínos e Aves.

Palavras-chave: 16S rRNA, frangos de corte, microbioma intestinal, Alistipes, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae

INTRODUÇÃO

Estudos genômicos do conteúdo intestinal tornaram possível descobrir a composição da microbiota, a identificação de novos microrganismos, mesmo aqueles não cultiváveis e sua relação com doenças e o meio ambiente. A compreensão do microbioma intestinal das aves pode fornecer pistas para o desenvolvimento de ferramentas para aumentar a produção de frangos de corte e ainda permitir a produção de aves livre de antibióticos (1, 2, 3). O objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota intestinal de frangos de corte saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

As aves foram criadas sob as mesmas condições de arraçãoamento, e bem estar animal, no mesmo galpão e no mesmo período de tempo. As amostras de DNA foram isoladas utilizando o *kit* de extração “QiAamp DNA Stool mini kit” do conteúdo cecal de 18 frangos machos com 42 dias de idade, alimentados com ração padrão de milho e soja. Foram quantificadas e então utilizadas na construção de bibliotecas de 16S rRNA (regiões V3-V4) (4, 5). Então foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq usando protocolo “Paired-end” (2x300bp). A análise do controle de qualidade foi feita pelo *software* Mothur versão 1.33.3. (6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que as bactérias mais prevalentes eram pertencentes às famílias Rikenellaceae (53,47%), Ruminococcaceae (24,57%), e Lachnospiraceae (7,41%), seguidas das famílias Porphyromonadaceae (3,27%), Lactobacillaceae (1,25%) e pelo grupo de famílias não classificadas (6,19%). O gênero *Alistipes* sp. (Rikenellaceae) apresentou a maior prevalência (52,63%) dentre todos os gêneros. As bactérias desse gênero (previamente classificado como *Bacteroides* sp) são cocos Gram-negativos anaeróbios estritos que assemelham-se ao grupo dos *Bacteroides fragilis*, no qual a maioria das espécies é bile-resistente e indol positiva. Elas são fracamente sacarolíticas e a maioria das espécies produz um pigmento marrom claro quando cultivadas em ágar sangue. Algumas espécies são de fontes humanas, tais como *Alistipes obesi* sp. nov., *Alistipes indistinctus* sp. nov., *Alistipes onderdonkii* sp. nov., e *Alistipes shahii* sp. nov. Recentemente foi reportado que *B. fragilis* é capaz de utilizar alguns exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bifidobactérias como substrato para seu crescimento. Isso resulta em um consumo parcial de polímero e a liberação concomitante de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), metabólitos finais da fermentação dos EPS. Extrapolando esses resultados para o trato intestinal dos humanos, pode-se sugerir que a relação de alimento entre o EPS microbiano e os *Bacteroides* poderia ter um impacto no balanço da produção de SCFA no intestino, o qual é relacionado com a saúde do indivíduo (7). Entretanto, relatos da ocorrência de cepas de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicas associadas a diarreias e câncer colo-retal indicam que estas variantes patogênicas não devem ser desprezadas e que estudos relacionados à sua pesquisa devem ser feitos (8). Bactérias do gênero *Bacteroides* também estão associadas à resistência a antimicrobianos. O primeiro levantamento nacional sobre a sensibilidade de *B. fragilis* a antimicrobianos, realizado na Argentina e publicado em dezembro de 2015 (9), mostrou que *B. fragilis* foi mais susceptível a agentes antimicrobianos do que outras espécies do gênero *Bacteroides*. O trabalho demonstrou que cepas de *B. vulgatus* foram as mais resistentes às associações de ampicilina com sulbactam e de piperacilina com tazobactam e cepas do gênero *B. thetaiotaomicron/ovatus* apresentaram os níveis mais altos de resistência a antibióticos carbapenêmicos, com mecanismo de resistência desconhecido. Cepas de *B. vulgatus* e das espécies “não-*Bacteroides fragilis*” foram as mais resistentes a moxifloxacinos. Dessa forma, dada a grande quantidade desses microrganismos no conteúdo cecal das aves, a hipótese de resistência a antimicrobianos neste microbioma não pode ser descartada. Ademais, por se tratar de antimicrobianos com mecanismos de ação distintos, essas bactérias podem desempenhar um papel importante como reservatório de genes de resistência antimicrobiana dentro dos microbiomas onde estão inseridas. As famílias Ruminococcaceae e Lachnospiraceae, membros da classe Clostridia, são compostas por microrganismos intestinais anaeróbios Gram-positivos. Membros da Ruminococcaceae podem ter um papel na biohidrogenação e também podem estimular a produção e a degradação de mucina, necessária para manter a integridade da

barreira intestinal. As bactérias da família Lachnospiraceae, abundantes no trato digestivo de mamíferos e relativamente raras em outros locais foram associadas à obesidade e à proteção contra o câncer de cólon em humanos, provavelmente devido à produção de ácido butírico por muitas espécies dessa família. Este ácido é importante tanto para o crescimento microbiano quanto das células epiteliais do hospedeiro. Assim, a composição do microbioma intestinal de aves de corte possui microrganismos que produzem efeitos benéficos para os animais como, por exemplo, probióticos ou inóculos para o tratamento fermentativo de cama de aviário, sugerindo trabalhos futuros nessa área. Entretanto, essa microbiota também pode ser composta por patógenos potenciais, como espécies do gênero *Bacteroides* que possuem cepas com características enterotoxigênicas, e outras já descritas como reservatório de genes de resistência a antimicrobianos.

CONCLUSÕES

O microbioma cecal das aves de corte, apesar de vasto, é composto majoritariamente por bactérias pertencentes às famílias Rikenellaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Porphyromonadaceae e Lactobacillaceae, sendo a família Rikenellaceae a mais abundante. O gênero *Alistipes* sp. (*Bacteroides* sp.) apresentou a maior prevalência dentre todos os gêneros. Alguns microrganismos destas famílias podem ser benéficos ao hospedeiro, agindo como probióticos, enquanto outros podem ser patógenos ou ainda albergarem genes de resistência a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

1. Lu, J., Santo Domingo, J., Shanks, O.C. Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomics approach. **Water Res.** v.41, n.16, p.3561-74, 2007.
2. Zsak, L., Day, J.M., Oakley, B.B., Seal, B.S. The complete genome sequence and genetic analysis of ΦCA82 a novel uncultured microphage from the turkey gastrointestinal system. **Virol J.** v.8, p.331, 2011.
3. Kim, T., Mundt, E. Metagenomic analysis of intestinal microbiomes in chickens. **Methods Mol Biol.** v. 733, p.185-94, 2011.
4. Klindworth, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Res.** v.41, p.1–11, 2012.
5. Illumina, 2013. **16S Metagenomic Sequencing Library Preparation guide.** Web: 10/2015 <https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf>
6. Schloss, P.D., et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol.** v.75, n.23, p.7537-41, 2009.
7. Rios-Covian, D., Cuesta, I., Alvarez-Buylla, J.R., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Reyes-Gavilán, C.G. *Bacteroides fragilis* metabolises exopolysaccharides produced by bifidobacteria. **BMC Microbiol.** v.16, p.150, 2016;
8. Keenan, J.I., Aitchison, A., Purcell, R.V., Greenlees, R., Pearson, J.F., Frizelle, F.A. Screening for enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples. **Anaerobe.** v.40, p.50-3, 2016.
9. Fernandez-Canigia, L., Litterio, M., Legaria, M.C., Castello, L., Predari, S.C., Di Martino, A., Rossetti, A., Rollet, R., Carloni, G., Bianchini, H., Cejas, D., Radice, M., Gutkind, G. First national survey of antibiotic susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group: emerging resistance to carbapenems in Argentina. **Antimicrob Agents Chemother** v.56, p.1309–14, 2012.

Apoio

Embrapa - projeto 01.11.07.002.05.07