

## **Amplificação do gene 16S rRNA de bactérias do líquido ruminal de bovinos**

Eliane Gasparino<sup>1</sup>, Stefania Caroline Claudino da Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Del Vesco<sup>1</sup>, Liege Alher Marques<sup>1</sup>,  
Débora Sommer Marques<sup>2</sup>, Lucia Maria Zeoula<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - UEM

<sup>2</sup>Laboratório São Camilo- Biotecnologia

**Resumo:** O rúmen contém várias espécies de bactérias habitando um sistema anaeróbico. Um método bastante utilizado na identificação de bactérias em diferentes ambientes é a amplificação do gene que codifica o 16S rRNA, entretanto para que seja possível o sucesso nas identificações e quantificações desses microrganismos, a extração do DNA total do líquido ruminal é uma etapa fundamental no processo, desta forma o objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência na identificação de bactérias do rúmen de bovinos utilizando DNA extraído diretamente do líquido ruminal fresco e conservado em metanol, e utilizando um sistema de amplificação multiplex. Foram avaliadas seis bactérias presentes no líquido ruminal de bovinos pelos métodos da PCR convencional e multiplex. O sistema de PCR convencional mostrou-se eficiente apresentando resultado positivo nas reações de amplificação para o DNA das bactérias estudadas. A mesma eficiência também foi observada utilizando o sistema multiplex. O armazenamento de líquido ruminal de bactérias no metanol mostrou-se eficiente, pois permitiu a extração e amplificação da região do DNA bacteriano tanto pelo sistema de PCR convencional quanto pelo sistema multiplex.

**Palavras-chave:** extração, metanol, multiplex

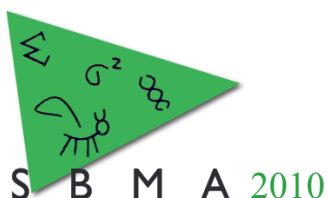
### **Amplification of the 16S rRNA of bactéria from bovine rúmen fluid**

**Abstract:** The rumen contains several species of bacteria inhabiting an anaerobic system. One method widely used in identification of bacteria in different environments is the PCR amplification of the gene encoding 16S rRNA, however to succeed in the identification and quantification of microorganisms to extract the total DNA of rumen fluid is a critical step in the thus the aim of this study was to evaluate the efficiency in the identification of bacteria from the rumen of bovine using DNA extracted directly from fresh rumen fluid and stored in methanol, using a multiplex system. We evaluated six bacteria in bovine rumen fluid by conventional methods of PCR and multiplex. The conventional PCR system was efficient in showing positive amplification reactions for DNA of the bacteria studied. The same efficiency was also observed using the multiplex. The storage of liquid ruminal bacteria in methanol was efficient because it allowed the extraction and amplification of the region of bacterial DNA by both conventional PCR system as the multiplex.

**Keywords:** extraction, methanol, multiplex

### **Introdução**

O rúmen contém várias espécies de bactérias, mais de 20, habitando um sistema anaeróbio com pH em torno da neutralidade. Mudança na dieta, a idade do animal, o estado geral de saúde, o uso de antibióticos entre outros fatores, podem alterar a atividade fermentativa favorecendo um determinado tipo de microrganismo. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de isolar e identificar linhagens bacterianas do rúmen de bovinos submetidos a diferentes condições ambientais (Bryant, 1959; Stewart et al, 1997). Contudo, considerando que apenas uma pequena fração do total da diversidade microbiana no ecossistema natural do rúmen pode ser recuperada por métodos de cultura (Amann et al,



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

1995), faz-se necessário o uso de métodos mais refinados e acurados na identificação de bactérias ruminais. Um método bastante utilizado na identificação de bactérias em diferentes ambientes é a amplificação via PCR do gene que codifica o 16S rRNA (Tajima et al, 1999). Os genes ribossomais apresentam regiões variáveis e essas variações de nucleotídeos observadas entre as espécies podem ser utilizadas na identificação de diferentes microrganismos. Estudos utilizando a seqüência do gene 16S rRNA tem sido desenvolvidos com bactérias do rúmen (Tajima et al, 1999; Tajima et al, 2000) entretanto para que seja possível o sucesso nas identificações e quantificações desses microrganismos a extração do DNA total do líquido ruminal é uma etapa fundamental no processo. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência na identificação de bactérias do rúmen de bovinos utilizando DNA extraído diretamente do líquido ruminal fresco e conservado em metanol e utilizando um sistema de amplificação multiplex.

### Material e Métodos

Foi coletado líquido ruminal de um bovino da raça Holandesa, e retirado uma alíquota de 14 mL do material ainda fresco a qual foi centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos. Logo após, o sobrenadante foi vertido e adicionou-se 50 uL de metanol. Em seguida, a amostra foi armazenada em freezer a -20°C.

A extração de DNA foi segundo o protocolo proposto por Boom et al. (1990). Inicialmente 50 µL de líquido ruminal foram lavados em 200 µL de TE, em seguida, centrifugados a 8000 rpm por 2 min. 20 µL da suspensão de bactérias foram retirados para a extração de DNA. Para lise celular foram utilizados 1.000 µl de tampão L6 (120g de Isoticianato, 100 mL de Tris HCl (0,1M e pH 6,4), 22 mL de EDTA (0,2M e pH 8,0) e 2,6 mL de Triton X100, juntamente com 20 µl de sílica e 20 µl de amostra. A amostra foi agitada no vórtex por 10 minutos e em seguida centrifugada a 14.000 rpm, por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado. O Pellet de sílica foi lavado com 500 µl de tampão L2 (120g de Isoticianato, 100mL de Tris HCl (0,1M e pH 6,4)), misturado no vórtex e centrifugado a 14.000 rpm, durante 30 segundos, a lavagem com L2 foi realizada 2X. Posteriormente foram realizadas duas lavagens com etanol 70% gelado. Para finalizar procedeu-se uma lavagem com acetona absoluta, no qual 1.000,0 µl de acetona gelada foram adicionadas a amostra, seguida de agitação vigorosa e centrifugação a 14.000 rpm, por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado. A amostra foi deixada em 37°C durante 10 min para secagem da sílica. Logo após foram adicionados 80 µl de água ultra-pura, agitou-se vigorosamente e deixou-se em banho-seco a 56°C, por 15 minutos. Logo após centrifugou-se as amostras a 14.000 rpm, por 2 minutos e recuperou-se 40,0 µl do sobrenadante.

Para a detecção das bactérias, foram utilizados primers proposto por Tajima et al. (2001). O volume total de reação foi de 15 µL, contendo concentrações variadas de MgCl<sub>2</sub> e Primers, para cada primer diferente (Tabela 1 e 2), o programa de amplificação foi o mesmo para todos os primers, mudando apenas a temperatura de anelamento. As condições da PCR foram de uma etapa inicial a 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos, de 95°C por 30 seg, anelamento por 30 seg, variando a temperatura de anelamento de cada primer e extensão de 72°C por 30 seg, seguido de uma extensão final de 72°C por 1 min.

Tabela 1- Primers utilizados para amplificação, com suas devidas temperaturas de anelamento e tamanho de fragmento.

Bactérias	Primer direto	Primer reverso	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCTGAACTATC	64	445
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	GGACGATAATGACGGTACTT	GCAATCYGAACTGGGACAAT	64	835
<i>Streptococcus bovis</i>	CTAATACCGCATAACAGCAT	CACTACTCATGGCAACAT	57	869
<i>Prevotella ruminicola</i>	GGTTATCTTGAGT GAGTT	CTGATGGCAACTAAAGAA	53	485
<i>Eubacterium ruminantium</i>	GCTTCTGAAGAATCATTGAAG	TCGTGCCTCAGTGTGAGTGT	63	671
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	TGGGTGTTAGAAATGGATTC	CTCTCCTGCACTCAAGAATT	63	597

As concentrações dos reagentes nas reações de PCR variaram para cada *primer* (tabela 2), sendo que os primers de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* foram utilizados em Sistema Multiplex, e os demais *primers* utilizados em sistema PCR convencional.

Tabela 2- Concentrações de reagentes utilizados nas reações de PCR, para cada primer utilizado.

	Primers					
	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Eubacterium ruminantium</i>	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
PCR buffer	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	2,33mM	2,33mM	2,33mM	1,66mM	1,66mM	1,66mM
Primer F	333nM	833nM	833nM	166nM	833nM	666mM
Primer R	333nM	833nM	833nM	166nM	833nM	666mM
dNTPs	0,33mM	0,33mM	0,33mM	0,33mM	0,33mM	0,33mM
Taq DNA Polimerase	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U	0,5 U
H2O Ultra pura	9,8uL	9,8uL	10,2uL	11,2uL	10,6uL	10,6uL
Amostra	1,0uL	1,0uL	1,0uL	1,0uL	1,0uL	1,0uL

Após as reações de de amplificações as amostras foram visualizadas em gel de agarose 2% e corado com Brometo de Etídeo.

### Resultados e Discussão

Foram encontradas seis bactérias presentes no líquido ruminal de bovinos, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium* e *Anaerovibrio lipolytica*. Os primers utilizados para amplificar uma região menos conservada do gene 16S rRNA em todas as bactérias se mostraram específicos para os estudos de identificação como encontrado por Tajima et al. (2001). O conjunto de primers produziu produtos de PCR de tamanho esperado para as bactérias em estudo, sendo respectivamente 445 pb para *F. succinogenes*, 835 pb para *R. flavefaciens*, 869 pb para *S. bovis*, 485 pb para *P. ruminicola*, 681 pb para *E. ruminantium* e 597 pb para *A. lipolytica*.

As bactérias foram utilizadas para avaliar a eficiência na identificação de DNA bacteriano extraído de amostras de líquido ruminal fresco e conservado em metanol utilizando um sistema multiplex. O sistema de PCR convencional mostrou-se eficiente apresentando resultado positivo nas reações de amplificação para o DNA das bactérias estudadas. A mesma eficiência também foi observada neste trabalho utilizando o sistema multiplex para as bactérias cujos fragmentos apresentavam tamanhos diferentes, e temperatura de anelamento semelhantes (Figura 1).

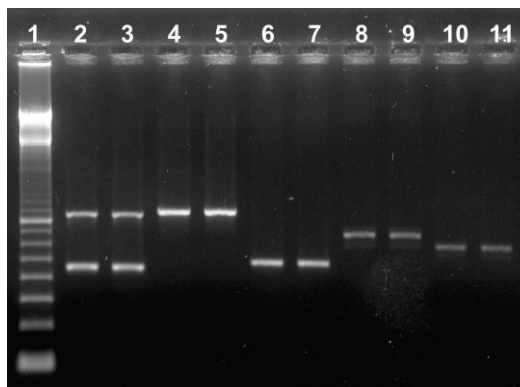
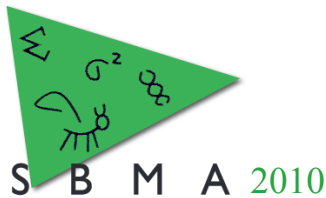


Figura 1. Gel de agarose. **Canaleta 1:** Padrão de 100 pb. **Canaleta 2 e 3:** Multiplex Primer (Primer *Fibrobacter succinogenes*, 445 pb e Primer *Ruminococcus flavefaciens*, 835 pb). **Canaleta 4 e 5:** Primer *Streptococcus bovis*, 869 pb. **Canaleta 6 e 7:** Primer *Prevotella ruminicola*, 485 pb. **Canaleta 8 e 9:** Primer *Eubacterium ruminantium*, 671 pb. **Canaleta 10 e 11:** Primer *Anaerovibrio lipolytica*, 597 pb.



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

### Conclusão

O armazenamento de líquido ruminal de bactérias no metanol mostrou-se eficiente pois permitiu a extração e amplificação da região do DNA bacteriano tanto pelo sistema de PCR convencional quanto pelo sistema multiplex. A amplificação via PCR do gene 16S rRNA foi capaz também de identificar as bactérias.

### Literatura Citada

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, vol.59, p.143–169, 1995.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):459-503.
- BRYANT, M.P. Bacterial Species of the Rumen. **Bacteriological Reviews**, vol,23, n.3, p.125-153, 1959.
- STEART, E.A.; MCKUSICK, K.B.; AGGARWAL, A., et al. An STS-based radiation hybrid map of the human genome. **Genome Research**, vol.7, p.422–433, 1997.
- TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T. et al. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, vol,29, p.159–169, 1999.
- TAJIMA, K.; ARAI, S.; OGATA, K. et al. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. **Anaerobe**, vol,6, p.273–284, 2000.
- TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T., et al. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, vol,67, n.6, p.2766-2774, 2001.