

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal  
Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

**Identificação de bactérias ruminais via PCR - Multiplex utilizando DNA extraído diretamente do líquido ruminal em ovinos<sup>1</sup>**

Guilherme Pereira Schuroff<sup>2</sup>, Stefania Caroline Claudino da Silva<sup>3</sup>, Fernanda Tanamati<sup>3</sup>, André Luiz Seccatto Garcia<sup>2</sup>, Lucia Maria Zeola<sup>4</sup>, Eliane Gasparino<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte do projeto PIBITI do primeiro autor

<sup>2</sup>Graduandos do Curso de Zootecnia da UEM-PR Bolsista de Iniciação Científica do PIBITI. [chiko-schuroff@hotmail.com](mailto:chiko-schuroff@hotmail.com), [andreluizseccatto@gmail.com](mailto:andreluizseccatto@gmail.com)

<sup>3</sup> Discentes do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – UEM – Bolsistas CAPES. [stefania\\_caroline@hotmail.com](mailto:stefania_caroline@hotmail.com), [fertanamati@gmail.com](mailto:fertanamati@gmail.com)

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Zootecnia - UEM, PR. Professor pesquisador do CNPq. e-mail: [lmzeoula@uem.br](mailto:lmzeoula@uem.br), [egasparino@uem.br](mailto:egasparino@uem.br)

**Resumo:** O rumem contém várias espécies de bactérias habitando um sistema anaeróbico. Para tal, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência na identificação de bactérias do rúmen de ovinos utilizando DNA extraído diretamente do líquido ruminal e utilizando um sistema de amplificação simultâneo conhecido como multiplex em substituição a técnica tradicional. Foram avaliadas duas bactérias presentes no líquido ruminal de ovinos (*Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*) testadas separadamente e em sistema multiplex. A extração feita diretamente do líquido ruminal de ovinos apresentou DNA íntegro e em quantidade suficiente. Houve amplificação satisfatória para os dois primers testados, tanto individualmente quanto em sistema multiplex.

**Palavras-chave:** extração, ovinos, PCR

**Identification of rumen bacteria by PCR - Multiplex using DNA extracted directly from the rumen fluid in sheep**

**Abstract:** The rumen contains several species of bacteria inhabiting an anaerobic system. To this end, the aim of this work was to verify the efficiency to detect bacteria in the rumen of sheep using DNA extracted directly from ruminal fluid and using a system of simultaneous amplification known as multiplex, replacing the traditional technique. Were evaluated two bacteria present in the rumen fluid of sheep (*Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*) tested separately and in multiplex system. The extract made directly from the rumen of sheep showed intact DNA and in sufficient quantity. There was satisfactory amplification for both primers tested, in individually and multiplex system.

**Keywords:** extraction, sheep, PCR

**Introdução**

A ovinocultura brasileira encontra-se em expansão, havendo a necessidade de desenvolvimento de pesquisas que estimulem este processo. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de isolar e identificar linhagens bacterianas do rúmen, entretanto, apenas uma pequena fração do total da diversidade microbiana no ecossistema natural do rúmen pode ser recuperada por métodos de cultura (Amann et al., 1995), fazendo-se necessário o uso de métodos mais refinados e acurados na identificação de bactérias ruminais, como o uso de análises genéticas (Sullivan, 2000). Desta forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a eficiência na identificação de bactérias do rúmen de ovinos utilizando DNA extraído diretamente do líquido ruminal fresco, utilizando um sistema multiplex.

**Material e Métodos**

Foi coletado líquido ruminal de ovinos e retirado uma alíquota de 15 mL do material ainda fresco e centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos. Inicialmente, 50 uL de líquido ruminal foram lavados em 200 uL de TE e centrifugados a 8.000 rpm por 2 minutos. Da suspensão bacteriana formada foram armazenados 20 uL e usados posteriormente para a extração de DNA.

Para lise celular foram utilizados 1.000 ul 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 uL de sílica e 20 uL de amostra. A amostra foi agitada em 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 TL de tampão L2 (1 20g de Isoticianato, 1 00 mL de Tris HCl (0,1M e pH 6,4)), misturado em vórtex e centrifugado a 14.000 rpm, durante 30 segundos.

Teste de concentração de DNA foi realizado em gel de agarose a 2% e corado com Brometo de etídeo. Para a detecção das bactérias *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*, foram utilizados primers proposto por Tajima et al. (2001). O volume total de reação foi de 15 µL. O programa de amplificação foi o mesmo para os dois pares de primers, mudando apenas a temperatura de anelamento, exceto para o teste de multiplex, onde as temperaturas de anelamento também foi a mesma (Tabela 1). As condições da PCR foram de uma etapa inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos, de 95°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos, com extensão de 72°C por 30 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 1 minuto.

Após as reações de amplificação as amostras foram visualizadas em gel de poli-acrilamida a 8% e coradas com nitrato de prata.

### Resultados e Discussão

A PCR multiplex é uma variação da PCR convencional onde se utiliza mais de um par de primers na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA, promovendo uma análise mais ampla, rápida e barata quando comparada a PCR tradicional.

Neste trabalho, os primers utilizados para amplificar o gene 16S rRNA das bactérias *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* se mostraram específicos (Figura 1), sendo recomendados para os estudos de identificação como encontrado por Tajima et al, (2001).

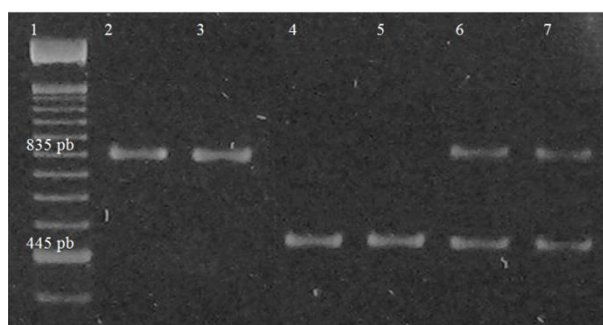


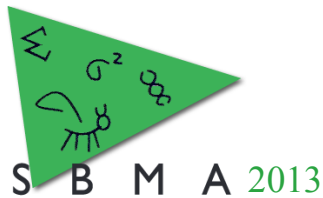
Figura 1. Gel de poli-acrilamida. Canaleta 1: Padrão de 100 pb. Canaleta 2 e 3: Primer *Ruminococcus flavefaciens*, 835 pb. Canaletas 4 e 5: Primer *Fibrobacter Succinogenes*, 445 pb. Canaletas 6 e 7: Multiplex Primer (primer *Fibrobacter Succinogenese* e *Ruminococcus flavefaciens*).

O sistema de PCR convencional mostrou-se eficiente, apresentando bons resultados nas reações de amplificação do DNA. Esta eficiência também foi observada para o sistema multiplex para as bactérias cujos fragmentos apresentavam tamanhos diferentes, e temperaturas de anelamento semelhantes (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação, temperaturas de anelamento e tamanho de fragmentos

Bactéria	Primer F	Primer R	Anelamento	Fragmento
<i>F. succinogenes</i>	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCTGAACTATC	64°C	445
<i>R. flavefaciens</i>	GGACGATAATGACGGTACTT	GCAATCYGAACTGGGACAAT	62°C	835
Multiplex	Ambos	Ambos	64°C	445 e 835

A PCR em formato multiplex usada neste estudo permitiu a detecção simultânea de genes das duas bactérias ruminais em estudo, provando ser um método de detecção rápido e eficiente. O uso deste método para detecção de bactérias em amostras de líquido ruminal de ovinos pode ser utilizado em uma



X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

variedade de estudos, inclusive nutricionais onde se espera a seleção de um nicho de bactérias específicas, produzindo respostas como presença ou ausência de determinada bactéria.

#### **Conclusões**

Apesar de haver uma pequena variação na temperatura de anelamento dos dois primers, é possível realizar a amplificação no sistema multiplex para as bactérias *Fibrobacter Succinogenese* e *Ruminococcus flavefaciens*, otimizando o tempo de trabalho e reduzindo custos.

#### **Agradecimentos**

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia-UEM, CNPq

#### **Literatura citada**

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

SULIVAN, D. J. Methods for Analysis of the Intestinal Microflora. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, Reading, v. 1, n. 2, p. 39-50, 2000.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, Reading, v. 29, p. 159-169, 1999.