

JULIANA SOARES DA SILVA

**ANÁLISE DA MICROBIOTA DO COLOSTRO DE
VACAS PLURÍPARAS E PRIMÍPARAS E DE FEZES DE
VACAS E BEZERROS LEITEIROS NO PÓS-PARTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca
central da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586
a

Silva, Juliana Soares da, 1987-

Análise da microbiota do colostro de vacas pluríparas e primíparas e de fezes de vacas e bezerros leiteiros no pós parto / Juliana Soares da Silva. – Viçosa, MG, 2018.

xi, 88 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia agrícola. 2. Colostro. 3. Bovinos.
4. Microbiota. 5. Sequenciamento de nucleotídeo.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed.

JULIANA SOARES DA SILVA

**ANÁLISE DA MICROBIOTA DO COLOSTRO DE
VACAS PLURÍPARAS E PRIMÍPARAS E DE FEZES DE
VACAS E BEZERROS LEITEIROS NO PÓS PARTO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 6 de dezembro de 2018.

Mateus Ferreira Santana

Camila Soares Cunha

Polyana Pizzi Rotta
(Coorientadora)

João Paulo Pacheco Rodrigues

Hilário Cuquetto Mantovani
(Orientador)

A Deus, aos meus pais, meus irmãos, meu esposo e ao maior presente que Deus
já me deu: Meu filho
Joaquim,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu refúgio e fortaleza em todos os momentos! E por nunca me deixar esquecer que “ Onde está o seu tesouro ali está seu coração”. A minha Nossa Senhora das Graças que me acompanha em todos os momentos.

Aos meus pais Marli e Sebastião por serem minha base e suporte em todos os momentos, meu exemplo maior de dedicação, amor e trabalho. Aos meus irmãos Marliane e Liovando por serem meu apoio e auxílio sempre que precisei e por cuidarem de mim com todo cuidado. Ao meu amor e companheiro Robson (Robinho) por todo amor, carinho, compreensão e incentivo, por entender cada ausência e por se dedicar a nossa família sempre. Ao meu grande e maior presente de Deus: Joaquim, por me dar inúmeras alegrias e me fazer nascer todo dia com cada sorriso e carinho, mesmo estando ausente muitas vezes. Você me fez mãe e uma nova pessoa!!!!

Aos meus sobrinhos, Davi, Miguel, Letícia e Bebê (rs), vocês trouxeram mais alegria pra minha vida. Aos meus cunhados Rosi, Ediney, Nalva e Fabiano por todo carinho e amizade. Á minha sogra e todos os tios, primos, avós e demais familiares.

Aos meus avós Sebastião, Rita e Terezinha que se foram nesse período do doutorado. Obrigada por todo carinho e ensinamentos, vocês serão sempre exemplos de vida!!!

A Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Microbiologia pela oportunidade.

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa e a Capes por contribuir com a pesquisa através da manutenção dos laboratórios.

Ao departamento de Zootecnia da UFV, em especial a Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de leite, por permitir utilizar os animais para as coletas do experimento. A todos os funcionários que me auxiliaram nesse período, muito obrigada!

Ao PDPL-RV pela disponibilidade em ajudar, quando os experimentos se iniciaram nas fazendas da região. Ao Sr. Antônio Maria por permitir as coletas em sua propriedade (Fazenda Nô da Silva) e agradecimento especial ao Sr. Mauricio pelo auxílio e boa vontade em ajudar nas coletas a Bianca Gallardo, por todas as inúmeras coletas e grande cuidado com meu experimento.

Ao Professor Hilário, por toda atenção, incentivo, ensinamentos e principalmente por investir nas minhas ideias. Obrigada por aceitar me orientar lá em 2007 na iniciação científica e novamente em 2014 para o doutorado! Obrigada por tudo!

À Prof^a Catarina, pelo incentivo e convite a vir fazer parte do departamento de Microbiologia.

À Prof^a Cláudia Bento, pela coorientação e todos os ensinamentos desde quando iniciei meus trabalhos no Lab de Anaeróbios em 2007. Sou muito grata!

À Prof^a Polyana Pizzi Rotta pela coorientação, por toda disponibilidade em ajudar em cada etapa do projeto, pela atenção e por confiar no meu trabalho.

Ao Prof^o Mateus pela disponibilidade em participar da banca.

Ao Prof^o João Paulo, pela disponibilidade em participar da banca e por todos os aprendizados durante os anos de graduação.

À Dra. Camila, pela disponibilidade em participar da banca e por toda amizade e auxílio quando estava colaborando com nossos trabalhos durante o pós doutorado.

Aos Professores da UFV e do Departamento de microbiologia, principalmente aqueles aos quais cursei as disciplinas durante o doutorado, obrigada pelos ensinamentos, atenção e paciência quando precisei me ausentar por motivos de saúde. Agradecimento especial aos colegas de turma Vanessa e Athus, por serem tão solidários e prestativos neste momento. Muito obrigada.

Aos funcionários e técnicos do departamento de Microbiologia e Zootecnia por todo auxílio durante as análises, em especial Aline, Raquel, José Carlos, Carlos e Plínio. Aos funcionários Leticia, Sandra, Gabriel, Sr. Cesário, Sr. Custódio e Dona Iraci pela atenção e disponibilidade.

Aos amigos do departamento de Microbiologia: Tomás, Rita, Tiago e Alan que mesmo estando em outro laboratório sempre auxiliavam em tudo que era possível.

A todos os estagiários da Prof. Polyanna que me auxiliaram em diversas coletas, em especial ao Leonardo, por todo cuidado, serviço e disponibilidade. Ao Bernardo, por sempre disponível e disposto a ajudar.

Agradecimento especial aos amigos do laboratório de Anaeróbios, aos antigos Fernanda, Aline, Mônica, Wemerson, Henrique, Analice, Claudia, Fábria,

Isabela, Bianca e Marcilio, obrigada pelos ensinamentos. Aos Atuais: Katialaine, Marlon, Letícia, Yasmim, Sofia, Raiane e Ana Julia. Em especial a Ana Júlia, por me acompanhar em quase todo o experimento e se dedicar a ele sempre. A Sofi, por ser minha amiga dos choros e dos pensamentos positivos, além de ter sempre um dedinho em cada gráfico dessa tese. A Deborah (Deborinha) por todos os ensinamentos e paciência em cada análise que me ensinou!! A Elsinha querida por cada palavra de amizade e força, você é exemplo pra mim. À Yasmim e Fers por todo apoio, colaboração e ensinamentos nessa reta final de preparo da tese. Agradeço a todos que mesmo em outros laboratórios estavam sempre comigo: Bruna, Cleonice, Felipe.

As minhas amigas Dani Botelho e Dani Pinheiro por serem como irmãs, Pri e Dias, Carol e Elder, Lu, Pati, Lidi, Aline, Pitty e todos os outros que sempre entenderam minha ausência ou cansaço, mas estavam sempre comigo. Muito obrigada! Amo vocês! Agradeço especialmente a Vanilda (Lidinha), que foi muito importante para que eu finalizasse o meu trabalho, cuidando com muito carinho do Joaquim durante a minha ausência nesses meses finais de trabalho.

BIOGRAFIA

JULIANA SOARES DA SILVA, filha de Sebastião Soares da Silva e Marli Maria da Silva, nasceu em 07 de dezembro de 1987, em Viçosa- Minas Gerais. Iniciou o curso de Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa em março de 2007, graduando-se em janeiro de 2012. Em Agosto de 2012 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa e obteve o título de mestre em julho de 2014. No mês seguinte ingressou no curso de doutorado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de viçosa.

RESUMO

SILVA, Juliana Soares da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2018. **Análise da microbiota do colostro de vacas pluríparas e primíparas e de fezes de vacas e bezerros leiteiros no pós-parto.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadoras: Cláudia Braga Pereira Bento e Polyana Pizzi Rotta.

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a composição da microbiota do colostro e fezes de vacas pluríparas e primíparas, assim como das fezes dos bezerros no pós-parto. As análises da microbiota não cultivada do colostro (1, 2 e 3 dias após o parto) e das fezes das vacas e dos bezerros foram realizadas um dia após o parto utilizando sequenciamento de nova geração do rRNA 16S. As análises dos índices de riqueza (Chao 1), diversidade (Shannon e Simpson) e beta diversidade indicaram que a comunidade bacteriana do colostro de pluríparas e primíparas não diferiram entre a categoria animal (teste t, $p < 0,05$). Os filos *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Kiritimatiellaeota* e *Fibrobacteres* foram significativamente mais abundantes ($p <$

0,05) em pluríparas quando comparado às primíparas, enquanto que *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cloacimonetes* e *Fusobacteria* foram mais abundantes (*White's nonparametric t-test*, $p < 0,05$) em primíparas quando comparados com as pluríparas. As famílias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* e *Christensenellaceae* foram mais abundantes nas pluríparas (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) quando comparada às primíparas. Enquanto que *Weeksellaceae* e *Burkholderiaceae* foram mais abundantes nas primíparas quando comparado às pluríparas (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$). Os gêneros mais abundantes ($>0,1\%$) foram *Pseudomonas* (1,2 e 0,64%), *Fibrobacter* (0,26 e 0,47%),

Stenotrophomonas (0,53 e 0,21%), *Sphingobacterium* (0,48 e 0,16%) e *Brevundimonas* (0,34 e 0,12%), nas primíparas e pluríparas, respectivamente. As OTUs que foram identificadas em pelo menos 50% dos animais de uma das categorias ($n \geq 4$) foram selecionadas para a análise de espécies indicadoras, resultando no total de 368 OTUs. As OTUs Otu01030 e Otu00891 foram classificadas como membros das famílias *Rikenellaceae* e *Christensenellaceae*, enquanto que a Otu00721 foi classificada como pertencente ao gênero *Butyrivibrio* e Otu00094 como do gênero *Prevotella*. Essas OTUs foram

identificadas como indicadoras nas amostras de colostro de vacas pluríparas, independentemente se foram ou não observadas nas amostras de primíparas. A Otu00101, identificada como *Brevundimonas*, foi considerada como indicadora das amostras de colostro de primíparas, sendo observada apenas nas amostras desses animais. A análise da betadiversidade das fezes indicou que bezerros de pluríparas e bezerros de primíparas foram significativamente semelhantes entre si, assim como as pluríparas e primíparas (ANOSIM, $p < 0,05$). Os índices de riqueza e diversidade (Chao 1, Shannon e Simpson) indicaram que a comunidade bacteriana das fezes de pluríparas e primíparas, assim como das fezes dos bezerros de pluríparas e primíparas não diferem significativamente entre si (teste t, $p > 0,05$). Foram identificadas 47 famílias compartilhadas nas fezes dos animais adultos e bezerros após o nascimento, sendo que *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* e *Christensenellaceae* foram mais abundantes nas pluríparas e primíparas, enquanto *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae_1* e *Ruminococcaceae* foram mais abundantes nos bezerros. Apenas a família *Lactobacillaceae* foi mais abundante em bezerros nascidos de primíparas quando comparado aos bezerros nascidos de pluríparas (*White's non-parametric ttest*, $p < 0,05$). O gênero *Ruminococcus_1* foi significativamente mais abundante (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) nas primíparas ($0,74 \pm 0,22\%$) quando comparado às pluríparas ($0,23 \pm 0,16\%$), enquanto *Lactobacillus* e *Faecalibacterium* apresentaram abundância relativa significativamente maior (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) nas fezes dos bezerros de primíparas quando comparado à microbiota fecal dos bezerros de múltiparas. Dessa forma, o colostro de pluríparas e primíparas diferem na abundância relativa dos filotipos e *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Prevotellaceae* foram os grupos mais abundantes no colostro de múltiparas. As fezes de bezerros originados de primíparas possuem microbiota com maior abundância de *Lactobacillus* e *Faecalibacterium*, os quais parecem estar relacionados com a saúde e desempenho dos bezerros.

ABSTRACT

SILVA, Juliana Soares da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2018. **Analysis of the microbiota of colostrum of multiparous and primiparous cows and feces of dairy cows and calves after calving.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-advisers: Cláudia Braga Pereira Bento and Polyana Pizzi Rotta.

In this work, the objective was to evaluate the composition of the microbiota of the colostrum and the feces of multiparous and primiparous cows, as well as the microbiota of the feces of calves in the postpartum period. Analyzes of the noncultured colostrum microbiota (1, 2 and 3 days postpartum) and the fecal microbiota of cows and deep sequencing of the 16S rRNA gene. Analyzes of the species richness indices (Chao 1), diversity (Shannon and Simpson) and beta diversity indicated that the bacterial colostrum community of multiparous and primiparous did not differ between the animal category (t-test, $p < 0.05$). Phyla *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Kiritimatiellaeota* and *Fibrobacteres* were significantly more abundant

($p < 0.05$) in multiparous than primiparous, while *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cloacimonetes* and *Fusobacteria* were more abundant (White's non-parametric t-test, $p < 0.05$) in primiparous when compared to multiparous. The families *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* and *Christensenellaceae* were more abundant in pluriparous cows (White's nonparametric t-test, $p < 0.05$) when compared to the primiparous. The families *Weeksellaceae* and *Burkholderiaceae* were more abundant in primiparous compared to multiparous cows (White's non-parametric t-test, $p < 0.05$). The most abundant genera ($> 0.1\%$) were *Pseudomonas* (1.2 and 0.64%), *Fibrobacter* (0.26 and 0.47%), *Stenotrophomonas* (0.53 and 0.21%), *Sphingobacterium* (0.48 and 0.16%) and *Brevundimonas* (0.34 and 0.12%) in the primiparous and multiparous cows, respectively. OTUs that were identified in at least 50% of the animals from one of the categories ($n \geq 4$) were selected for the analysis of indicator species, resulting in 368 OTUs. OTU01030 and OTU00891 were classified as members of the families *Rikenellaceae* and *Christensenellaceae*, while OTU00721 was classified as belonging to the genus *Butyrivibrio* and Otu00094 as from the genus

Prevotella. These OTUs were identified as indicators in colostrum samples from pluriparous cows, regardless if they were or not observed in samples from primiparous animals. OTU00101, identified as *Brevundimonas*, was considered as an indicator of the primiparous colostrum samples, being observed only in colostrum from these animals. Analysis of fecal beta diversity indicated that multiparous and primiparous calves were significantly similar to each other, as well as multiparous and primiparous (ANOSIM, $p < 0.05$). The richness and diversity indices (Chao 1, Shannon and Simpson) indicated that the bacterial community in the feces of multiparous and primiparous animals, as well as in feces of calves from multiparous and primiparous, did not differ significantly (test t , $p > 0.05$). A total of 47 bacterial families were found in the feces of adult animals and calves after birth. *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* and *Christensenellaceae* were more abundant in the multiparous and primiparous animals, whereas *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae* and *Ruminococcaceae* were more abundant in calves. Only the *Lactobacillaceae* family was more abundant in primiparous calves when compared to multiparous calves (White's non-parametric t -test, $p < 0.05$). The genus

Ruminococcus_1 was significantly more abundant (White's non-parametric t -test, $p < 0.05$) in primiparous animals ($0.74 \pm 0.22\%$) when compared to the multiparous cows ($0.23 \pm 0.16\%$), while *Lactobacillus* and *Faecalibacterium* showed greater relative abundance (White's non-parametric t -test, $p < 0.05$) in feces of primiparous calves when compared to the fecal microbiota of multiparous calves. Therefore, the colostrum of multiparous and primiparous differs in relative abundance of the phylotypes and the colostrum of multiparous cows is more diverse than the primiparous in the second day after calving. *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* and *Prevotellaceae* were the most abundant groups in the colostrum from multiparous cows. The feces of calves originated from primiparous animals harbor a microbiota with greater abundance of *Lactobacillus* and *Faecalibacterium*, which appears to be related with health and performance of the calves.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DE	
COLOSTRO DE PLURÍPARAS E PRIMÍPARAS APÓS O PARTO.....	12
APÊNDICES – CAPÍTULO 2	34
CAPÍTULO 3 - COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DA MICROBIOTA	
FECAL DE VACAS MULTÍPARAS, PRIMÍPARAS E BEZERROS	
RECÉM-NASCIDOS.....	45
APÊNDICES – CAPÍTULO 3	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88

INTRODUÇÃO GERAL

A colonização do trato gastrointestinal dos bezerros recém-nascidos ocorre logo após o nascimento, por meio dos primeiros contatos com o ambiente externo. A microbiota inicial do trato gastrointestinal desses animais pode ser oriunda de diversas origens, tais como a ingestão de colostro e leite das mães e contato com as fezes e o ambiente externo no momento do parto. A característica da microbiota inicial de ruminantes é diretamente relacionada às condições no momento do seu nascimento, ou seja, é influenciada pela microbiota da mãe no momento do parto e pelo ambiente. A microbiota das vacas leiteiras está relacionada diretamente com o manejo realizado nas fazendas, que varia de acordo com a categoria, eficiência e produção desses animais, além das dietas destinadas a cada grupo.

As vacas primíparas são animais que apresentam menor contaminação bacteriana do úbere ou do canal do teto, uma vez que ainda não foram submetidas a contaminação em um sistema de produção. Por outro lado, animais que possuem mais de uma cria ou parto (pluríparas) são animais que já estão no sistema de produção de leite em relação aos animais que entraram em seu primeiro período de lactação ou primeiro parto (primíparas). Além disso, vacas multíparas podem ser expostas a medicamentos utilizados no tratamento de mastite e de outras enfermidades que ocorrem após o animal entrar em lactação.

As formas de contaminação do canal do teto são diversas e variam conforme o nível de capacitação dos responsáveis pelo manejo dos animais no sistema de produção. Animais que já estão na segunda ou terceira lactação em diante, estão mais propensos a adquirir infecções no canal do teto, uma vez que este se mantém aberto por cerca de 30 minutos após o término da ordenha, e exposto à contaminação por bactérias do ambiente, da cama, das fezes e da própria pele dos animais. Além disso, animais que apresentam maiores níveis de produção de leite têm maior frequência de desenvolvimento de infecções como a mastite, levando a necessidade de utilização de medicamentos para o tratamento da doença. As diferenças no manejo e na alimentação de vacas primíparas e pluríparas irão refletir diretamente na microbiota do colostro e do úbere assim como de todo o trato gastrointestinal desses animais, que pode ser avaliada

por meio das amostras fecais. No entanto, estudos sobre a diversidade da microbiota de vacas leiteiras primíparas e pluríparas ainda são escassos. Nesse sentido, é necessário entender se a microbiota desses animais difere entre as categorias, e se essas eventuais diferenças podem resultar da exposição a outros microrganismos a partir do momento em que o animal passa a fazer parte do sistema de produção de leite. Além disso, não existe na literatura trabalhos onde foram avaliados a composição bacteriana de colostro de vacas mestiças, criadas em sistema de produção tropical como é o Brasil.

Neste trabalho foi investigada a composição da microbiota do colostro de vacas primíparas e pluríparas após o parto. Além disso, no capítulo 3, avaliamos a composição da microbiota fecal desses animais e de suas respectivas crias (bezerros) com um dia de vida, com o objetivo de identificar possíveis semelhanças na microbiota fecal da mãe com a sua cria.

CAPITULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Caracterização da microbiota de colostro e leite em animais ruminantes

Em estudo realizado com humanos, já foi observado que a composição da microbiota do colostro e do leite possui efeitos positivos na colonização gastrointestinal de recém-nascidos. Essa microbiota auxilia no processo de proteção contra patógenos, fato associado principalmente com a presença de *Bifidobacterium*, que possui características probióticas durante o processo de colonização primária, e que confere proteção intestinal aos bebês recém-nascidos (Hunt *et al.*, 2011).

O fornecimento de colostro também estimula a colonização de bactérias benéficas no intestino de bezerros. Malmuthuge *et al.* (2015) alimentaram bezerros holandeses machos recém-nascidos com colostro fresco ou tratado termicamente (60°C, 60 min). Amostras do intestino delgado (jejuno e íleo) foram coletados 6 e 12 h a partir do nascimento por meio da eutanásia dos animais. Análises de qPCR (PCR quantitativo) foram realizadas para quantificar bactérias totais, *Lactobacillus sp*, *Bifidobacterium sp*, e *E. coli* no intestino. Os resultados indicaram que o colostro tratado termicamente reduz a colonização por *E. coli* e aumenta a colonização de bactérias benéficas em relação aos animais controle (sem fornecimento de colostro). Animais que receberam o colostro tratado termicamente, apresentaram aproximadamente 2,3 vezes mais bactérias benéficas do gênero *Bifidobacterium* aderidas ao tecido intestinal do que os animais que receberam apenas o colostro fresco (Malmuthuge *et al.*, 2015).

Independente de sua origem (p. ex. vacas, ovelhas, cabras e humanos) o leite possui alta qualidade nutricional e assim suporta elevadas populações de microrganismos, que pode ser oriunda de várias fontes, podendo desempenhar funções importantes, tais como: facilitar o processo fermentativo de produtos lácteos (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) ou contribuir para a deterioração dos mesmos (*Pseudomonas*, *Clostridium* e *Bacillus*) assim como auxiliar na saúde intestinal (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), ou causar doenças (*Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* e alguns fungos produtores de micotoxinas) em animais e humanos (Quigley *et al.*, 2013).

Estudos que utilizam técnicas dependentes e independentes de cultivo têm contribuído para o entendimento da composição da microbiota presente no leite (Jiménez *et al.*, 2008; Maldonado-Barragán *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2011; Jeurink *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2014) e no colostro humano (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). Jiménez *et al.* (2008) avaliaram o colostro de mulheres saudáveis e observaram a presença de *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis* entre as espécies cultiváveis predominantes e verificaram que todos os isolados obtidos eram sensíveis a vancomicina, e não apresentavam genes de resistência a esse antibiótico. MaldonadoBarragán *et al.* (2009) avaliaram espécies de *Enterococcus faecalis* obtidos de amostras de colostro humano e observaram que essas espécies eram capazes de produzir uma nova bacteriocina (Enterocina C) e auxiliar no combate a bactérias patogênicas.

Os estudos recentes utilizando técnicas independentes de cultivo como sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S buscam caracterizar a microbiota do colostro e relacionar com a colonização intestinal dos bebês. Jost *et al.* (2014), buscaram relacionar a colonização intestinal microbiana dos bebês nas primeiras semanas de vida com o contato mãe e filho através da amamentação, por meio da análise da microbiota fecal das mães e dos bebês e do colostro ou leite fornecido. Esses autores observaram a presença de gêneros de bactérias anaeróbias obrigatórias associadas a microbiota intestinal como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* e membros do gênero *Clostridium* compartilhados entre as amostras de mãe e filho. Em trabalho semelhante, Ward *et al.* (2013) verificaram que o metagenoma do leite é menos diversificado em nível de filo do que o das fezes das mães e dos bebês e possui maior número de *open reading frames* (ORF's) relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, transporte de membrana e resposta ao estresse. Além disso, esses autores observaram a presença de motivos de DNA imunomoduladores no metagenoma do leite, semelhante ao metagenoma das fezes das mães e dos bebês. Hunt *et al.* (2011) caracterizaram a presença de uma microbiota “core”, ou microbiota presente no leite que se manteria conservada em todos os animais, com funções específicas dentro daquele habitat. Além disso, Lima *et al.* (2017) observaram que o desequilíbrio dessa microbiota “core” pode acarretar em distúrbios metabólicos e doenças nos animais.

Estudos da microbiota do leite de bovinos têm procurado estabelecer a relação desses microrganismos com a saúde da glândula mamária de animais afetados ou não por mastite bovina. Oikonomou *et al.* (2014) identificaram a presença de *Faecalibacterium* spp. *Lachnospiraceae unclassified*, *Propionibacterium* spp. e *Aeribacillus* spp. no úbere de animais sem presença de mastite. A presença de *Faecalibacterium* spp. sugerem possíveis benefícios, uma vez que a presença deste organismo em fezes de bezerros tem sido relacionada com o ganho de peso e saúde desses animais (Oikonomou *et al.*, 2013).

Influencia do número de partos sobre a microbiota de primíparas e pluríparas

A microbiota presente no colostro e leite nos animais de produção de leite está associada a diversos fatores, incluindo raça e grau de sangue, idade dos animais, número de partos (primíparas e pluríparas) e higiene no momento da ordenha (Blowey, R. e Edmondson, P., 2010) As condições climáticas ou locais de criação dos animais é fator de grande importância para a colonização bacteriana nas amostras animais, uma vez que as infecções por microrganismos ambientais são maiores no período chuvoso e quente e diminuem à medida que se inicia o período seco e frio (Riekerink *et al.*, 2007).

Em um sistema de produção de leite, a principal forma de contaminação do úbere por microrganismos está relacionada ao manejo na hora da ordenha (Souza, 2017). Durante o processo de produção de leite, desde a descida do leite até o momento de fechamento do esfíncter no teto do animal recém-ordenhado cada detalhe do manejo interfere no processo de contaminação do leite e também do úbere do animal ordenhado (Blowey, R. e Edmondson, P., 2010). No processo de produção e descida do leite a roseta de Fursenberg, que fica localizada no lado interno do canal da teta, é um anel de células linfocitárias que detectam bactérias invasoras e estimulam a resposta imune. Embora essas células auxiliem no controle da contaminação do úbere, é necessário pelo menos 20-30 minutos para que a extremidade da teta fique completamente fechada e protegida contra a contaminação bacteriana. Assim, recomenda-se frequentemente que os animais sejam impedidos de deitar até pelo menos 30 minutos após a ordenha (Blowey, R. W. e Edmondson, P., 2010).

Os animais que estão em lactação e gestação ao mesmo tempo (as pluríparas, por exemplo), necessitam de um período sem produção de leite antes do próximo parto, para que as células secretoras possam se recuperar e, dessa forma, produzir colostro de boa qualidade para o bezerro. O processo de secagem do úbere pode ser feito de forma brusca ou gradual, por meio da limitação de alimentos, modificações no horário de ordenha e aplicação de medicamentos para que o processo de produção de leite cesse gradualmente (Blowey, R. W. e Edmondson, P., 2010). A redução drástica na quantidade de alimentos para vacas com elevada produção de leite pode ocasionar grave estresse metabólico e induzir problemas clínicos como a mastite (Zanin *et al.*, 2016). Durante o período seco uma mistura de cera e queratina acumula-se no canal do teto para formar um tampão físico. Embora esse mecanismo seja importante na prevenção de novas infecções, nem sempre é eficaz. Por exemplo, as chamadas “leiteiras rápidas”, animais com extremidade do teto aberta, são vacas mais suscetíveis a contrair novas infecções durante o período seco (Blowey, R. W. e Edmondson, P., 2010).

A ação de descida do leite remove as camadas superficiais de queratina que revestem o canal do teto e, ao fazê-lo, remove as bactérias que estão aderidas à queratina, fato que é particularmente importante para a remoção de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, que invadem o canal do teto. Assim, as vacas ordenadas três vezes ao dia (pluríparas de alta produção) são geralmente menos suscetíveis à mastite do que as vacas ordenhadas duas vezes por dia (primíparas de menor produção) (Blowey, R. W. e Edmondson, P., 2010). Entretanto, quando as camadas de queratina não são removidas totalmente e se tornam rachaduras no teto do animal, esse fica predisposto a proliferações de microrganismo entre as rachaduras, que normalmente acumulam resíduos de leite (Blowey, R. W. e Edmondson, P., 2010).

Outro fator importante relacionado ao manejo de vacas leiteiras que pode causar a contaminação dos tetos e, conseqüentemente, do úbere são os frequentes danos sofridos pelo teto na máquina de ordenha quando a mesma é colocada sem os devidos cuidados, assim como a dilatação excessiva do canal, por exemplo, quando se administram antibióticos intramamários. Estes danos podem causar fissuras no revestimento de queratina e lipídeos, proporcionando oportunidade para a multiplicação bacteriana (Blowey, R. W. e Edmondson, P., 2010). Diante disso, a infecção da glândula

mamária dos bovinos e, conseqüentemente, a contaminação do leite produzido pode ser controlada com a utilização de substâncias germicidas nos tetos antes e após a ordenha, com o uso de antibiótico no período de secagem, eliminação dos casos crônicos de mastite, tratamento dos casos clínicos durante a lactação e o adequado funcionamento dos equipamentos de ordenha (Medeiros *et al.*, 2009).

Segundo Lima *et al.* (2017), as primíparas (novilhas) possuem maior diversidade microbiana no colostro quando comparada as vacas pluríparas. Isso pode ocorrer devido ao menor tempo de permanência das novilhas no sistema de produção, enquanto que as pluríparas já foram expostas a antibióticos para a secagem dos tetos pelo menos uma vez, o que pode resultar em diminuição da diversidade microbiana (Falentin *et al.*, 2016). As vacas pluríparas são mais susceptíveis e apresentam infecções com maior tempo de duração, o que resulta em maior destruição do sistema secretor e maior produção de CCS (contagem de células somáticas), com conseqüente redução da diversidade bacteriana quando comparada às novilhas e diminuição na produção de leite (Berry D. P. *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2015).

Além dos estudos sobre manejo de vacas primíparas e pluríparas, diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de identificar características relacionadas à qualidade do leite, incluindo a influência do genótipo (raças), o ECC (escore de condição corporal) ao parto e as curvas de lactação como forma de caracterizar primíparas e pluríparas no sistema de produção (Rennó *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2017). Lima *et al.* (2017) avaliaram o colostro de 70 vacas (26 primíparas e 44 pluríparas) diagnosticadas ou não com mastite clínica e criadas em sistemas de produção de clima temperado onde as vacas pluríparas receberam antibiótico intramamário 60 dias antes do parto para iniciarem o período de secagem do leite e renovação do epitélio intramamário. Esses autores observaram diferenças na composição taxonômica da comunidade bacteriana do colostro de primíparas e pluríparas, sendo que as primíparas apresentaram maior diversidade bacteriana independente do quadro clínico quando comparadas às vacas pluríparas. Além disso, as vacas primíparas que tiveram o diagnóstico precoce de mastite clínica apresentaram redução na diversidade da comunidade bacteriana do colostro e alterações

taxonômicas em nível de filo e gênero, fato não observado entre as vacas pluríparas com o mesmo quadro clínico (Lima *et al.*, 2017).

Diversos fatores podem influenciar a microbiota das vacas primíparas e pluríparas, incluindo dieta, raça, ambiente e utilização de antibióticos. O primeiro contato do bezerro com a microbiota do ambiente ocorre no momento do parto, durante a passagem pelo canal vaginal, pelo contato com as fezes e saliva da vaca após o nascimento, seguido pela ingestão do colostro (Rey *et al.*, 2014). Dessa forma, é de extrema importância caracterizar a microbiota das matrizes e a sua relação com a primeira colonização intestinal dos bezerros recém-nascidos.

Nesse sentido, estudos que visam investigar a composição microbiana do colostro de vacas primíparas e pluríparas, assim como das fezes das primíparas e pluríparas e de seus bezerros podem fornecer informações relevantes para o manejo dos animais em lactação e para o desenvolvimento de estratégias que garantam a colonização intestinal eficiente dos bezerros recém-nascidos, reduzindo a susceptibilidade a doenças (p. ex. diarreia) e melhorando o desempenho (ganho de peso) dos animais.

REFERÊNCIAS

BERRY D. P. et al. Associations among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 637–648, 2007.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Mastitis Control in Dairy Herds**. 2010.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. Cabi, 2010. ISBN 1845937511.

CABRERA-RUBIO, R. et al. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery–. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 3, p. 544-551, 2012. ISSN 0002-9165.

COSTA, H. et al. Estudo longitudinal da mastite subclínica e produção de leite em um rebanho mestiço Holandês-Zebu criado em sistema semi-intensivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 6, p. 1501-1509, 2015. ISSN 01020935.

COSTA, H. et al. Estimativa das perdas de produção leiteira em vacas mestiças Holandês x Zebu com mastite subclínica baseada em duas metodologias de análise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 579-586, 2017. ISSN 0102-0935.

FALENTIN, H. et al. Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 480, 2016. ISSN 1664-302X.

HUNT, K. M. et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e21313, 2011. ISSN 1932-6203.

JEURINK, P. et al. Human milk: a source of more life than we imagine. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 1, p. 17-30, 2012. ISSN 1876-2883.

JIMÉNEZ, E. et al. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. **Research in Microbiology**, v. 159, n. 9-10, p. 595-601, 2008. ISSN 0923-2508.

JOST, T. et al. Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2891-2904, 2014. ISSN 1462-2912.

LIMA, S. F. et al. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 3031-3042, Apr 2017. ISSN 1525-3198 (Electronic) 0022-0302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28161185> >.

MALDONADO-BARRAGÁN, A. et al. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 105-112, 2009. ISSN 0168-1605.

MALMUTHUGE, N. et al. Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 8044-8053, 2015. ISSN 0022-0302.

MEDEIROS, E. S. D. et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009. ISSN 0100-736X.

OIKONOMOU, G. et al. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, subclinically and clinically diseased quarters. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014. ISSN 1932-6203.

OIKONOMOU, G. et al. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e63157, 2013. ISSN 1932-6203.

QUIGLEY, L. et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013. ISSN 0168-6445.

RENNÓ, F. P. et al. Efeito da condição corporal ao parto sobre a produção e composição do leite, a curva de lactação e a mobilização de reservas corporais em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 220233, 2006.

REY, M. et al. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 245-257, 2014. ISSN 1364-5072.

RIBEIRO, A. B. et al. Produção e composição do leite de vacas Gir e Guzerá nas diferentes ordens de parto. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, 2009. ISSN 1983-2125.

RIEKERINK, R. O.; BARKEMA, H.; STRYHN, H. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1704-1715, 2007. ISSN 0022-0302.

SOUZA, L. M. D. Boas práticas agropecuárias voltadas ao manejo de ordenha e seu impacto na qualidade do leite: uma revisão de literatura. 2017.

WARD, T. L. et al. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 116, 2013. ISSN 1471-2180.

ZANIN, E.; FREGONESI, J. A.; MANGILLI, L. G. Comportamento e bem-estar de vacas leiteiras submetidas à secagem: Revisão. **PUBVET**, v. 10, p. 356-447, 2016.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DO COLOSTRO DE VACAS PRIMÍPARAS E PLURÍPARAS APÓS O PARTO

INTRODUÇÃO

Além de auxiliar na nutrição do hospedeiro e no desenvolvimento do sistema imunológico, o colostro também pode contribuir para o desenvolvimento intestinal do animal. O colostro possui bactérias com características probióticas como as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que protegem o intestino contra outras bactérias patogênicas e auxilia na colonização primária do trato gastrointestinal desses animais (Malmuthuge *et al.* 2015).

A qualidade do colostro pode variar de acordo com a raça, nutrição e número de partos (primíparas e pluríparas) dos animais (Godden 2008, Jaster 2005, Wang *et al.* 2015). Vacas primíparas são conhecidas por possuírem colostro de qualidade nutricional mais baixa (Uetake 2013), com menor conteúdo de gorduras e imunoglobulinas, fazendo com que suas crias apresentem maior susceptibilidade a doenças do que bezerros oriundos de vacas pluríparas. Entretanto, vacas primíparas ainda não entraram no sistema de produção, o que faz com que a microbiota do colostro ainda não tenha sido modificada devido ao uso de antibióticos para o tratamento de mastite ou para promoção do período seco, quando comparadas às vacas pluríparas (Falentin *et al.* 2016, Lima *et al.* 2017).

Alguns estudos demonstram a importância de isolar e caracterizar bactérias com potencial probiótico do colostro de vacas e avaliar a capacidade das mesmas de colonizar o trato gastrointestinal de bezerros e melhorar a saúde e desempenho dos animais (Lindner *et al.* 2011, Malmuthuge, *et al.* 2015). Entretanto, os estudos de caracterização da microbiota do colostro por técnicas independentes de cultivo por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S ainda são escassos. Além disso, estudos anteriores focaram principalmente na caracterização da microbiota do colostro de vacas primíparas e pluríparas susceptíveis ou não à mastite clínica em regiões de clima temperado (Lima, *et al.* 2017). No entanto, possíveis diferenças na composição da microbiota do colostro de vacas primíparas e pluríparas criadas em condições de clima tropical ainda não foram investigadas.

Diante disso, neste estudo avaliou-se a hipótese de que vacas primíparas e pluríparas possuem microbiota do colostro distintas, resultante das diferenças no manejo dos animais de primeira cria quando comparado aos animais que já estão inseridos no sistema de produção. Nosso objetivo, portanto, foi caracterizar a composição bacteriana do colostro obtido de animais mestiços (holandês/zebu) de vacas primíparas e pluríparas nos três dias subsequentes ao parto, por meio do sequenciamento de nova geração (NGS).

METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios - Departamento de Microbiologia – UFV. As amostras de colostro foram coletadas um, dois e três dias após o parto, formando uma amostra composta (*pool*), de vacas pluríparas (n = 8) e primíparas (n = 8) leiteiras pertencentes à Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite - Departamento de Zootecnia – UFV. Todos os procedimentos de manejo e coleta dos animais foram conduzidos conforme a legislação vigente e as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa/ CEUAP-UFV, onde o projeto foi protocolado e aprovado (Processo nº 062/2016).

As dietas dos animais possuíam a seguinte relação volumoso/concentrado no pré-parto: 84/16% e 72/28 para primíparas e pluríparas, respectivamente, e no pós-parto a relação foi de 72/28% e 63/37% para primíparas e pluríparas, respectivamente. Utilizou-se volumoso à base de silagem de milho e a composição do concentrado fornecido para cada grupo está descrita nas Tabelas S1 e S2 (Material Suplementar). Anteriormente à coleta do colostro foi realizada a limpeza dos tetos com iodo (*pré-dipping*) e os primeiros jatos foram dispensados em caneca de fundo telado para verificação da presença de mastite através da presença de grumos que ficaram retidos na tela. Foi realizada a amostragem do colostro por ordenha manual dos tetos saudáveis diretamente em tubos plásticos de 50 mL (*falcon*), resultando em uma amostra composta. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas e transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios para as análises microbiológicas.

Extração de DNA total do colostro e sequenciamento de *amplicons* (rRNA 16S) A extração de DNA total das amostras de colostro foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Cremonesi *et al.* (2006). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram mensuradas utilizando NanoDrop™ Plate (Thermo Scientific Multiskan GO, Wilmington, DE), sendo armazenados a -20°C até o uso.

O processamento e a análise dos dados foram realizados no programa Mothur v.1.39.0 (Schloss *et al.* 2009). Inicialmente, as sequências obtidas foram atribuídas às amostras de origem a partir da sequência *index* dos oligonucleotídeos utilizados na segunda PCR. As sequências R1 e R2 do sequenciamento *paired-end* (Illumina, San Diego, CA) foram ligadas nas extremidades, formando sequências de 150 a 300 pb. As sequências de tamanhos menores que 150 pb e maiores que 300 pb foram eliminadas, assim como homopolímeros de tamanho acima de 8 pb e sequências com pares de bases ambíguos. Após a remoção de quimeras usando o algoritmo Uchime (Edgar *et al.* 2011) as sequências foram alinhadas com o gene que codifica o rRNA 16S, utilizando o banco de dados Silva (Quast *et al.* 2012). Sequências com mais de 97% de similaridade foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic units* – OTU) utilizando o método *furthest neighbor* (Schloss *et al.* 2005). As OTUs foram normalizadas para o menor número de sequências observadas entre as amostras. Os índices de diversidade (Chao1, Shannon e Simpson), assim como a abundância relativa das OTUs foram analisados a partir da tabela de OTUs normalizada.

Análises estatísticas

O agrupamento das amostras de colostro de vacas primíparas e pluríparas foi feito por meio da análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis e teste de similaridade para dados não paramétricos (ANOSIM, numero de permutações =10000) utilizando o software Past (Hammer *et al.* 2001). As diferenças nos índices de diversidade de primíparas e pluríparas foram verificadas inicialmente por meio do teste de normalidade, considerando ($p < 0,05$) como significativo para os testes KolmogorovSmirnov e Shapiro-Wilk utilizando o software SPSS versão 22 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA) (Norušis 1990). Os dados que seguiam distribuição normal foram comparados pelo teste T, considerando $p < 0,05$ como significativo. Quando os conjuntos de dados não seguiram distribuição normal, as

médias foram comparadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes, considerando $p < 0,05$ como significativo.

Para verificar a existência de um fenótipo característico da microbiota de colostro de primíparas e pluríparas, foi realizado um filtro para detecção dos táxons e OTUs que apareceram em pelo menos 50% dos animais em uma das categorias antes da realização das análises estatísticas e da correção de falsos positivos. Para avaliar se a abundância relativa dos táxons e OTUs apresentava distribuição normal, foi aplicado os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, utilizando o software SPSS versão 22 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA) (Norusis 1990), considerando $p > 0,05$ como não significativo. Quando os dados não seguiram distribuição normal, as análises estatísticas foram realizadas com a utilização de teste não paramétrico (Mann-Whitney) para o nível hierárquico mais baixo identificado no sequenciamento (gênero). Para as demais análises de abundância foi utilizado o *White's non-parametric t-test*. Para a análise da abundância relativa dos táxons, foi realizada a correção FDR (*False Discovery Rate*) para detecção de falsos positivos no software R, utilizando os pacotes “ggplot2” “magrittr” “tidyr”. O pacote “indicspecies” no software R foi utilizado para identificação de espécies indicadoras através da análise das OTUs selecionadas após o filtro, utilizando a correção de Sidak (Šidák 1967). Diferenças significativas foram consideradas para p -valor menor que 0,05.

RESULTADOS

Composição da comunidade bacteriana do colostro de primíparas e pluríparas

O sequenciamento do gene rRNA 16S das amostras de colostro de primíparas e pluríparas gerou 1.207.628 sequências brutas, com tamanho máximo de 302 pb, tamanho médio de 240 pb e mínimo de 151 pb entre as amostras analisadas. Após a filtragem e limpeza das sequências, com a remoção de quimeras e homopolímeros, foram obtidas 645.280 sequências com boa qualidade. Foram obtidas 352.856 sequências das amostras de primíparas e 239.168 sequências das amostras de colostro de pluríparas. O Good's Coverage obtido nas amostras foi $> 99\%$, indicando que o esforço amostral foi suficiente para cobrir a diversidade existente (Tabela 1).

Tabela 1- Resumo dos dados de sequenciamento da comunidade bacteriana (rRNA 16S) das amostras de colostro de vacas primíparas e pluríparas, coletadas durante os três dias após o parto.

Category	n	Good's Coverage	After filtering and clean-up		After normalization		After filter*	
			Reads	OTUs	Reads	OTU's	Reads	OTUs
Primiparous	8	0.994 ± 0.002	44107 ±	2248 ±	1823 ±	543 ± 231	1309 ±	190 ± 65
			17034	1106	148		210	
Multiparous	8	0.993 ± 0.002	36553 ±	2500 ±	1454 ±	629 ± 273	1048 ±	220 ± 50
			13084	807	489		318	

Values represent mean and standart deviation. * Reads and OTUs that were detected in at least 50% of animals of each category (at least 4 animals).

A análise de beta diversidade inferida a partir do índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, não indicou diferenças (ANOSIM, $p=0,66$) no agrupamento da comunidade bacteriana do colostro de primíparas e pluríparas em função da categoria animal (Figura 1).

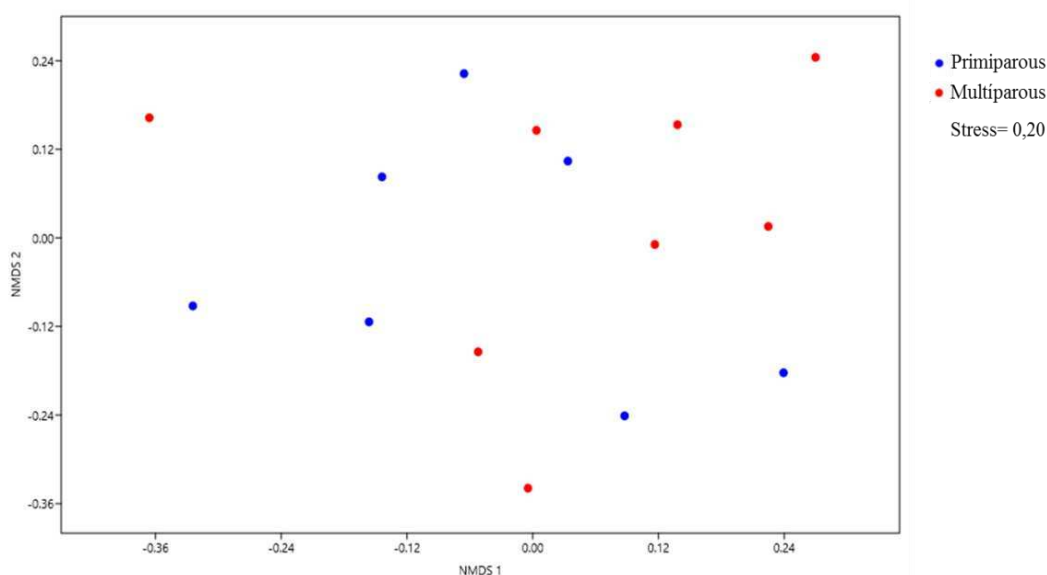


Figura 1 – Análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) realizada de acordo com o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis para comunidades microbianas presente no colostro de primíparas e pluríparas das 3 coletas de colostro (1, 2 e 3 dias após o parto). Os pontos individuais indicam as amostras (animais) e as cores indicam as categorias. Stress = 0,20.

A análise dos índices de riqueza (Chao 1) e diversidade (Shannon e Simpson) indicaram que a comunidade bacteriana do colostro de primíparas e pluríparas não diferiu entre a categoria animal. Os valores médios e o desvio padrão do índice de Chao1 foram $468,9 \pm 322,2$ e $716,7 \pm 188,1$, Shannon $4,025 \pm 0,955$ e $4,617 \pm 0,640$

e Simpson $0,075 \pm 0,077$ e $0,043 \pm 0,040$ para as primíparas e pluríparas, respectivamente.

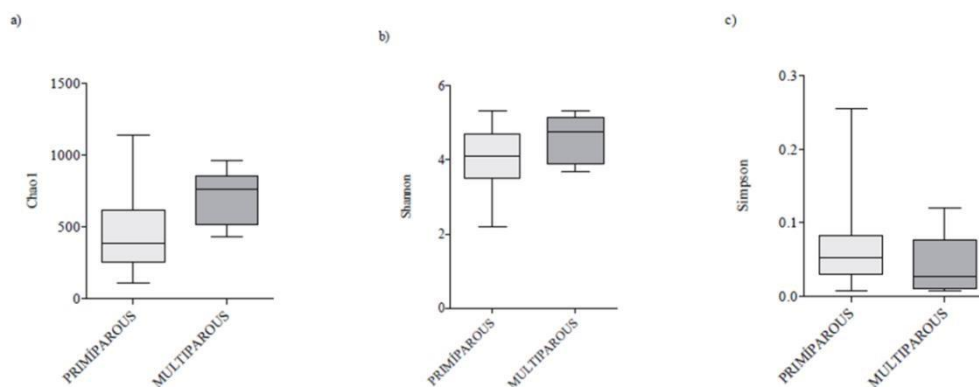


Figura 2 - Estimativas de Alfa diversidade da comunidade bacteriana do colostro de primíparas e pluríparas. **a)** Índice de riqueza de Chao1; **b)** Índice de diversidade de Shannon; **c)** Índice de diversidade de Simpson, de vacas primíparas e pluríparas.

Após a classificação taxonômica das OTUs de acordo com o banco de dados Silva, foram nomeados 35 filos, 90 classes, 227 ordens, 438 famílias e 1044 gêneros nas amostras de colostro de primíparas e pluríparas. Os filos mais abundantes nas amostras de colostro de primíparas foram *Firmicutes* ($32,97 \pm 9,10\%$), *Bacteroidetes* ($24,33 \pm 3,54\%$), *Proteobacteria* ($23,88 \pm 9,99\%$) e *Actinobacteria* ($7,65 \pm 2,84\%$). A comunidade bacteriana do colostro de pluríparas foi representada principalmente por *Firmicutes* ($40,0 \pm 7,23\%$), *Bacteroidetes* ($26,23 \pm 3,57\%$), *Proteobacteria* ($15,99 \pm 7,00\%$) e *Actinobacteria* ($5,84 \pm 2,56\%$). Esses grupos taxonômicos representaram 88,8 % e 88,1% da abundância relativa em nível de filo nas amostras de colostro de primíparas e pluríparas, respectivamente. Os filos *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Kiritimatiellaeota* e *Fibrobacteres* foram significativamente mais abundantes ($p < 0,05$) em pluríparas quando comparada às primíparas, enquanto que *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cloacimonetes* e *Fusobacteria* foram mais abundantes (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) em primíparas quando comparados às pluríparas (Figura 3 e Tabela S3 do material suplementar). Os filos mais abundantes ($\geq 0,5\%$) presentes em pelo menos uma amostra de cada animal, assim como os filos que não receberam nenhuma classificação taxonômica (*unclassified*) e os filos com abundância relativa $< 0,5\%$ (Outros) nas amostras de colostro de primíparas e pluríparas, estão representados na Figura 3.

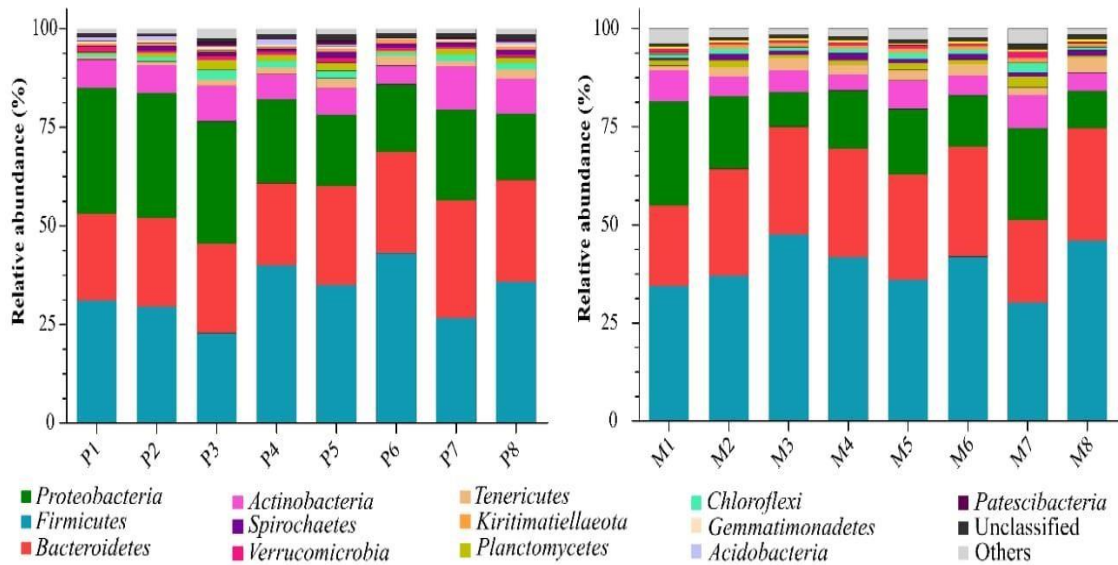


Figura 3 – Composição bacteriana em nível de filo do colostro de primíparas (**P**) e pluríparas (**M**). Cada barra representa a abundância relativa para cada categoria. “Outros” correspondem aos filios com abundância relativa < 0,5%.

Quando as amostras foram classificadas em nível de família, observou-se grande diversidade taxonômica na comunidade bacteriana do colostro de primíparas e pluríparas. Em média, grupos taxonômicos que representavam aproximadamente 5,8% e 5,4% da abundância relativa da comunidade bacteriana do colostro de primíparas e pluríparas não puderam ser classificados em nenhuma família (*unclassified*). No colostro de primíparas, 34 famílias apresentaram abundância relativa $\geq 0,5\%$ e as 10 famílias com maior abundância relativa foram *Lachnospiraceae* ($10,22 \pm 4,10\%$), *Ruminococcaceae* ($9,95 \pm 3,20\%$), *Prevotellaceae* ($7,07 \pm 4,13\%$), *Moraxellaceae* ($4,2 \pm 5,34\%$), *Weeksellaceae* ($2,48 \pm 2,98\%$), *Chritensenellaceae* ($2,48 \pm 1,04\%$), *Rikenellaceae* ($2,33 \pm 1,33\%$), *Burkholderiaceae* ($1,98 \pm 1,17\%$), *Flavobacteriaceae* ($1,96 \pm 1,27\%$) e *Pseudomonadaceae* ($1,63 \pm 1,70\%$). Essas famílias representaram aproximadamente 44% da abundância relativa nas amostras de colostro de primíparas, enquanto que no colostro de pluríparas, 32 famílias apresentaram abundância relativa $\geq 0,5\%$, sendo que as 10 famílias mais abundantes representavam aproximadamente 53% da abundância relativa da comunidade bacteriana, incluindo *Lachnospiraceae* ($14,00 \pm 3,65\%$), *Ruminococcaceae* ($12,23 \pm 2,70\%$), *Prevotellaceae* ($10,12 \pm 3,25\%$),

Rikenellaceae ($3,70 \pm 0,91\%$), *Christensenellaceae* ($3,59 \pm 1,10\%$), *Mollicutes_RF39_fa* ($2,26 \pm 0,88\%$), *F082* ($2,18 \pm 0,91\%$), *Moraxellaceae* ($2,18 \pm 2,51\%$), *Family_XIII* ($1,77 \pm 0,58\%$) e *Flavobacteriaceae* ($1,46 \pm 0,92\%$) (Figura 4).

Dentre as 10 famílias mais abundantes, as famílias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* e *Christensenellaceae* foram mais abundantes nas pluríparas (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) quando comparada às primíparas. Enquanto que *Weeksellaceae* e *Burkholderiaceae* foram mais abundantes nas primíparas quando comparado às pluríparas (*White's nonparametric t-test*, $p < 0,05$) (Tabela S4- material suplementar).

Em nível de gênero, a classificação taxonômica resultou em número elevado de sequências não-classificadas (*unclassified*), correspondendo a $21,9 \pm 4,66\%$ nas amostras obtidas de primíparas e $20,33 \pm 4,30\%$ nas amostras de pluríparas. Aproximadamente 34,5% da abundância relativa da comunidade bacteriana do colostro de pluríparas e 39,8% das primíparas, foram representados por grupos taxonômicos com abundância relativa $< 0,5\%$. Foram observados 18 gêneros que apresentaram diferença significativa entre primíparas e pluríparas após filtragem das sequências presentes em pelo menos de 50% dos animais dentro de cada categoria (*Mann-Withiney*, $p < 0,05$) (Figura 5).

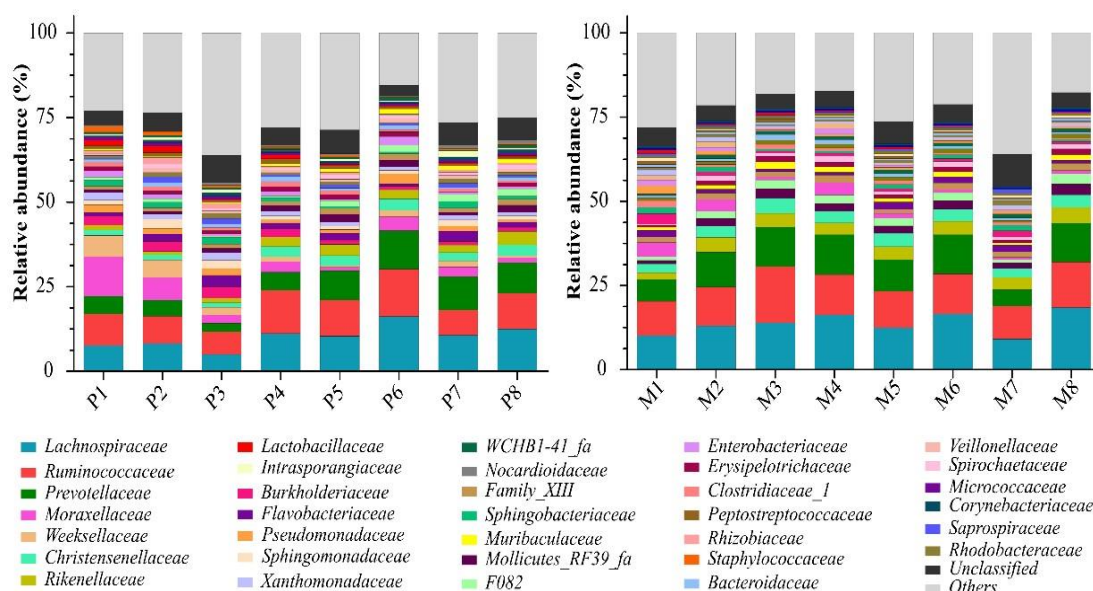


Figura 4 – Composição bacteriana em nível de família das amostras de colostro de primíparas e pluríparas. Cada barra representa a abundância relativa para cada categoria. “Outros” correspondem às famílias com abundância relativa $< 0,5$.

A abundância relativa desses gêneros variou de ausência a até 1,2%, caracterizando gêneros de baixa abundância. Dentre eles, o gênero *Aquicella* foi observado apenas em amostras de pluríparas, enquanto que os gêneros *Syntrophorhabdus*, *Caulobacter*, *Niabella* e *Faecalibaculum* foram observados apenas em amostras de primíparas (Figura 5). Os gêneros mais abundantes (> 0,1%) foram *Pseudomonas* (1,2 e 0,64 %), *Fibrobacter* (0,26 e 0,47%), *Stenotrophomonas* (0,53 e 0,21%), *Sphingobacterium* (0,48 e 0,16%) e *Brevundimonas* (0,34 e 0,12%), nas primíparas e pluríparas respectivamente. No entanto, após a correção da FDR, o *p*-valor foi maior que 0,05% para todos os gêneros identificados (Figura 5).

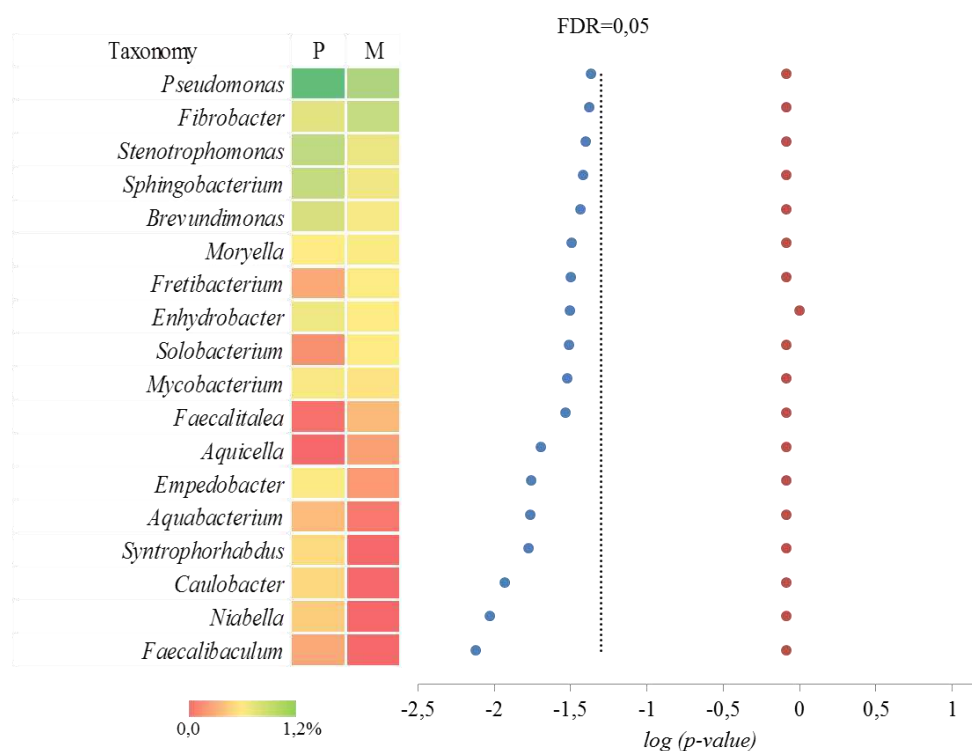


Figura 5 – Abundância relativa e *p*-valor observado antes e após a correção de falsos positivos (FDR) para o ultimo nível hierárquico identificado após o filtro de 50%. **P** = Primíparas; **M** =pluríparas. Diferenças foram consideradas significativas para *p*valor < 0,05 para o teste de Mann-Withiney.

Após a normalização dos dados, foram identificadas 2786 OTUs nas amostras de colostro de primíparas e pluríparas. As OTUs que foram identificadas em pelo menos 50% dos animais de uma das categorias ($n \geq 4$) foram selecionadas para a análise de espécies indicadoras, resultando em 368 OTUs no total, uma redução de aproximadamente 87% no total das OTUs. Dentro de cada categoria foram analisadas 246 OTUs para as primíparas e 301 OTUs na categoria das pluríparas. Das OTUs resultantes da filtragem de sequências foi observado que a Otu01236,

classificada como *Luteimonas*, estava presente apenas em primíparas enquanto 10 OTUs foram identificadas apenas em múltíparas (Tabela 2).

As dez OTUs mais abundantes no colostro de primíparas variaram entre 1,064% a 5,129%, enquanto a abundância relativa entre as amostras de colostro de pluríparas variou de 0,979% a 3,939% (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação Taxonômica e abundância relativa média (%) das 10 OTUs mais abundantes compartilhadas entre primíparas e pluríparas.

OTUs	Taxonomy	Primiparous (%)	Multiparous (%)
Otu00002	<i>Acinetobacter</i>	5.129	3.939
Otu00008	<i>Acinetobacter</i>	4.610	1.281
Otu00006	<i>Chryseobacterium</i>	4.528	3.256
Otu00010	<i>Saprospiraceae</i> (uncultured)	3.488	3.297
Otu00011	<i>Acinetobacter</i>	2.824	1.481
Otu00019	<i>Membranicola</i>	2.025	1.346
Otu00022	<i>Acinetobacter</i>	1.887	0.979
Otu00007	<i>Enterobacteriaceae</i> (unclassified)	1.131	1.224
Otu00031	<i>Actinomarinales</i> (uncultured)	1.085	1.139
Otu00001	<i>Escherichia-Shigella</i>	1.064	1.461

A análise de espécies indicadoras indicou diferenças significativas (Sidak, $p < 0,05$) entre as categorias de animais para cinco OTUs observadas nas amostras de primíparas e pluríparas (Tabela S5 – material suplementar). A Otu01030 e Otu00891 foram classificadas como pertencentes às famílias *Rikenellaceae* e *Christensenellaceae*, enquanto que a Otu00721 foi classificada como pertencente ao gênero *Butyrivibrio* e Otu00094 como pertencente ao gênero *Prevotella*. As OTUs citadas acima foram identificadas como indicadoras em amostras de colostro de animais pluríparas, independentemente se foram ou não observadas nas amostras de animais primíparas. A Otu00101, identificada como *Brevundimonas*, foi considerada como indicadora das amostras de colostro de primíparas, sendo detectada apenas nas amostras desses animais (Figura 6).

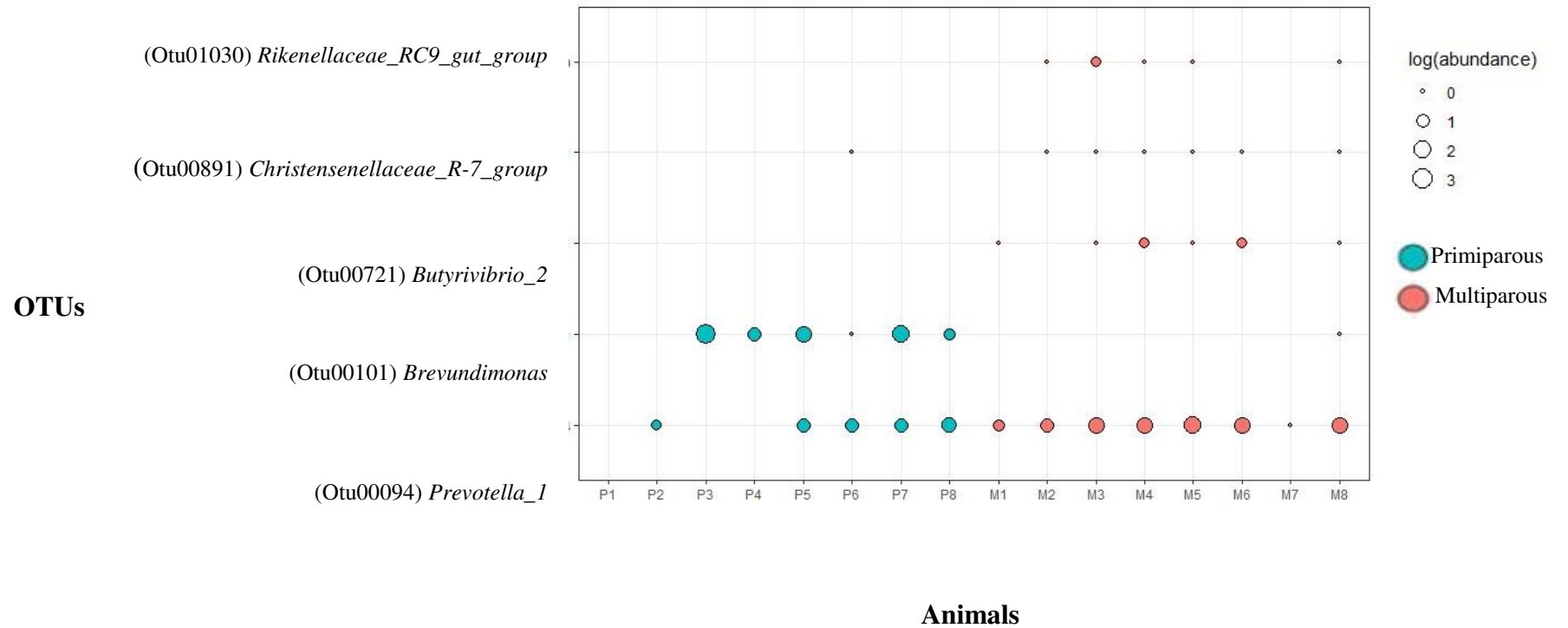


Figura 6 – Distribuição e abundância relativa das OTUs indicadoras identificadas nas amostras de primíparas e pluríparas. As cores representam as categorias e os diâmetros dos círculos equivalem ao log da abundância observada após a filtragem de sequências presentes em pelo menos 50% dos animais de cada categoria. Foi considerado p -valor $< 0,05$ como significativo para a correção de Sidak.

DISCUSSÃO

A caracterização da microbiota do colostro de vacas que diferem quanto ao número de parições pode ser útil para identificar diferenças associadas com fenótipos de saúde ou doença em suas crias, possibilitando dessa forma, intervir nos sistemas de manejo. Nesse sentido, a análise da microbiota por meio do sequenciamento de regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S possibilita a identificação de filotipos menos abundantes na microbiota, podendo fornecer informações robustas e mais detalhadas sobre a composição da comunidade microbiana em relação aos métodos dependentes de cultivo (Hunt *et al.* 2011, Schloss, *et al.* 2005). A partir da análise da microbiota presente no colostro dos animais adultos torna-se possível realizar previsões da microbiota inicial dos animais alimentados por pluríparas e primíparas no pós-parto.

Lima *et al.* (2017) realizaram o sequenciamento do gene rRNA 16S (região hipervariável -V4) da microbiota do colostro de vacas holandesas primíparas e pluríparas e demonstraram que a comunidade microbiana do colostro desses animais era diversa e que esses grupos apresentavam diferenças quanto a composição taxonômica. Naquele estudo, a análise dos índices de diversidade do colostro de primíparas e pluríparas indicou que os animais de primeira parição apresentavam maior riqueza de espécies bacterianas (Chao1) do que as vacas pluríparas (Lima, *et al.* 2017). No entanto, não foram observadas diferenças significativas para o índice de diversidade de Shannon entre primíparas e pluríparas, o que corrobora com as observações do presente trabalho, onde nenhum dos índices avaliados apresentou diferenças significativas no colostro de primíparas e pluríparas.

Os resultados do presente estudo indicaram que membros dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* são abundantes no colostro bovino, sendo que vacas primíparas apresentaram maior abundância dos filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, enquanto que pluríparas apresentaram maior abundância relativa de *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Esses resultados diferem das observações feitas por Lima *et al.* (2017), os quais relataram maior abundância relativa de *Firmicutes* em primíparas. Essas diferenças podem ser atribuídas a diversos fatores, incluindo diferenças genéticas dos animais, raça, ambiente, manejo e composição da dieta (Hunt, *et al.* 2011). Lima *et al.* (2017) conduziram o estudo em condições de clima temperado, utilizando animais da raça Holandês, submetendo as duas categorias animais a uma dieta de alta fibra no pré-parto, seguido por uma

dieta com baixo teor de fibra e alta capacidade energética no pós-parto. No presente trabalho, foi avaliado o colostro de animais mestiços (Holandês-zebu), criados em condições de clima temperado, sendo que apenas as primíparas recebiam dieta com alta fibra no pré-parto. Após o parto, as dietas foram modificadas, sendo que a dieta das primíparas continha apenas 16% de concentrado no pré-parto, foi substituída por uma dieta mais rica em proteínas e carboidratos, representados por 28% de concentrado. A dieta das pluríparas no pós-parto continha 9% a mais de concentrado e 21% a menos de volumoso do que a dieta inicial das primíparas. Todavia, não é possível inferir sobre quais grupos bacterianos sofreram modificações ou qual grupo foi beneficiado pela alteração da dieta, uma vez que não foi realizada a análise química do colostro, nem avaliado o perfil de metabólitos que foram excretados.

Em estudo anterior, foi sugerido que para uma espécie/grupo microbiano ser considerado representativo ou indicador da microbiota animal, o mesmo deve estar presente em pelo menos 50% dos animais/hospedeiros avaliados em um tratamento específico (Sasson *et al.* 2017). Utilizando esse critério para filtrar sequências representativas dos grupos de animais avaliados neste estudo, observou-se que as primíparas possuíam maior abundância (1,12%) de bactérias do gênero *Pseudomonas* enquanto que as vacas multíparas apresentaram apenas 0,64% desse gênero. O gênero *Pseudomonas* está entre os grupos mais abundantes identificados em leite cru de cabras das raças Saanen, Alpina, Toggenburg e LaMancha, sendo que a abundância desse gênero diminui ao longo da lactação (McInnis *et al.* 2015). Em estudo realizado por Zhang *et al.* (2017) em cabras da região de Guanzhong, na China, foi observado que *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Acinetobacter* estavam entre os gêneros mais abundantes (> 0,5%) e que diferiam entre as raças Saanen e Guanzhong. Essas diferenças foram associadas com variações na composição do leite desses animais, que diferia quanto aos teores de lactose e aminoácidos. Os gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Acinetobacter* também foram observados entre os grupos bacterianos mais abundantes do leite humano de mulheres saudáveis (McGuire *et al.* 2017, Murphy *et al.* 2017), indicando que estes grupos são comuns na microbiota do leite de humanos e animais.

A identificação da OTU00094 (*Prevotella_1*) como sendo uma espécie indicadora do colostro de multíparas apesar de também ter sido observada em menor abundância nas primíparas, sugere que a abundância dessas espécies aumenta na glândula mamária, à medida que aumenta o número de lactações nos animais (Figura

6). A OTU00721 classificada como *Butyrivibrio* também foi identificada como uma espécie indicadora do colostro das pluríparas, entretanto, se observa que elas só foram identificadas nessa categoria, não sendo observadas ainda em animais de primeira cria. Drago *et al.* (2017) identificaram aumento de bactérias anaeróbias no leite de mulheres de diferentes regiões geográficas (Burundi e Italia) quando comparado ao colostro dessas mulheres. Estes fatos corroboram com a hipótese de que bactérias anaeróbias pertencentes ao intestino ou rúmen (no caso de animais ruminantes) tem sua abundância aumentada no leite/colostro à medida que se decorre a lactação e o número de lactações, como foi observado no nosso estudo com colostro.

A origem das bactérias encontradas no leite e no colostro de bovinos ainda é desconhecida, uma vez que os estudos ainda são escassos. O gênero *Prevotella*, pertencente ao filo *Bacteroidetes*, da família *Prevotellaceae*, é comumente encontrado no rúmen e intestino dos animais. Anteriormente, Addis *et al.* (2016) relataram que pode existir uma via enteromamária endógena, que permitiria a translocação de bactérias do intestino para a glândula mamária, o que poderia explicar a presença de gêneros de bactérias anaeróbias como *Prevotella* e *Ruminococcus* no colostro. Essa afirmação também é relatada para alguns estudos realizados com o objetivo de identificar a origem da microbiota presente no leite de humanos (Fernández *et al.* 2013, Ramsay *et al.* 2004, Rodríguez 2014). Fernández *et al.* (2013) afirmaram que parte da microbiota residente no leite poderia ser oriunda da saliva dos bebês, através do fluxo retrógrado de saliva durante a alimentação. Esta explicação não se aplica ao presente trabalho, uma vez que os bezerros (crias) avaliados foram separados da mãe (primíparas e pluríparas) logo após o nascimento, sendo alimentados com colostro por meio de mamadeiras. Outra explicação para a maior abundância de bactérias do gênero *Prevotella* nas amostras de colostro de pluríparas se deve ao fato de que o colostro de pluríparas é caracterizado por uma maior quantidade de gorduras e proteínas (Uetake 2013). Estudo recente avaliou a microbiota presente no colostro e leite durante toda a lactação de porcas e foi observado que o gênero *Prevotella*, apresentou correlação positiva com o teor de gordura das amostras, sendo que sua abundância aumentava com o teor de gordura presente nas amostras de leite ao longo da lactação (Chen *et al.* 2018).

A abundância relativa da OTU00101, classificada como *Brevundimonas* foi estatisticamente superior em primíparas quando comparadas com as múltiparas,

tornando-a uma espécie indicadora do colostro de primíparas (Figura 6). O gênero *Brevundimonas*, assim como os gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* já foram identificados entre os 12 gêneros mais abundantes (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Elizabethkingia*, *Variovorax*, *Bifidobacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Chryseobacterium* e *Enterobacter*) e que representavam a microbiota *core* do leite de mulheres durante os 3 primeiros meses de lactação (Murphy, *et al.* 2017). Estes autores relatam que a microbiota *core* corresponde a 81% da abundância total nas seis primeiras semanas de lactação, incluindo o período de colostro, sendo observada redução de 8% dessa abundância quando se atinge a 12^a semana de lactação, indicando o papel dessa microbiota nos estágios iniciais da lactação (Murphy, *et al.* 2017). Os indícios de que esses grupos participariam da colonização inicial do colostro e leite explicaria o fato dos mesmos serem mais abundantes no colostro de primíparas quando comparadas às múltiparas. Contrastando com o que foi observado no presente trabalho, Zhang *et al.* (2015) identificaram maior abundância do gênero *Brevundimonas* no leite de bovinos que recebiam dietas com alto concentrado (70% MS) quando comparado aos animais que recebiam dieta com menores níveis de concentrado (40% MS). Além disso, esses autores observaram que o gênero *Prevotella* foi menos abundante em dietas de alto concentrado, contrário ao nosso trabalho, em que animais que consumiram dieta com maiores níveis de concentrado (pluríparas) apresentaram maior abundância desse gênero.

Animais ruminantes sofrem muitas modificações corporais durante o período de lactação para atender a sua demanda energética, o que acarreta inúmeras modificações na composição do leite e colostro, afetando diretamente a composição da microbiota. As alterações na microbiota do colostro ou leite podem ocorrer devido a alterações de dieta, raça e ambiente (Hunt, *et al.* 2011). Alguns autores relatam que a utilização de antibióticos nos animais é um fator que pode causar alterações na microbiota do leite e colostro (Lima, *et al.* 2017, McGuire, *et al.* 2017). Embora os animais primíparas e pluríparas utilizados no presente trabalho fossem animais saudáveis, as vacas pluríparas já foram expostas a antibióticos para a realização do período de secagem que antecede ao parto. Dessa forma, a microbiota do colostro e leite desses animais pode ter sido alterada, conforme reportado em outros estudos (Lima, *et al.* 2017).

CONCLUSÕES

O colostro de primíparas e pluríparas difere na abundância relativa dos filotipos observados e fatores como dieta e número de partos podem interferir na microbiota desses animais. As OTUs OTU00101 (*Brevundimonas*) e OTU00094 (*Prevotella_1*) podem ser utilizadas como espécies indicadoras do colostro de animais primíparas e pluríparas, respectivamente. Embora ocorra alta abundância de microrganismos anaeróbios nas amostras de colostro e sua abundância aumente à medida que aumenta o número de lactações, outros estudos serão necessários para confirmar se esses grupos tem origem por meio de uma via enteromamária ou se sua abundância é estritamente relacionada à composição do colostro e do leite desses animais ao longo da lactação.

REFERÊNCIAS

- Addis, M., Tanca, A., Uzzau, S. *et al.*, 2016. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from-omics studies, *Molecular BioSystems*, 12, 2359-2372
- Chen, W., Mi, J., Lv, N. *et al.*, 2018. Lactation stage-dependency of the sow milk microbiota, *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12
- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G. *et al.*, 2006. Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk, *Journal of Dairy Science*, 89, 163-169
- Drago, L., Toscano, M., De Grandi, R. *et al.*, 2017. Microbiota network and mathematic microbe mutualism in colostrum and mature milk collected in two different geographic areas: Italy versus Burundi, *The ISME journal*, 11, 875-884
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C. *et al.*, 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection, *Bioinformatics*, 27, 2194-2200
- Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A. *et al.*, 2016. Bovine teat microbiome analysis revealed reduced alpha diversity and significant changes in taxonomic profiles in quarters with a history of mastitis, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-14
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V. *et al.*, 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease, *Pharmacological Research*, 69, 1-10
- Godden, S., 2008. Colostrum management for dairy calves, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24, 19-39
- Hammer, Ø., Harper, D., and Ryan, P., 2001. PAST-Palaeontological statistics, www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf, acessado em, 25, 2009
- Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J. *et al.*, 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk, *PLoS One*, 6, 1-8
- Jaster, E., 2005. Evaluation of quality, quantity, and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G1 absorption in Jersey calves, *Journal of Dairy Science*, 88, 296302
- Lima, S.F., Teixeira, A.G.V., Lima, F.S. *et al.*, 2017. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis, *Journal of Dairy Science*, 100, 3031-3042
- Lindner, J.D.D., Santarelli, M., Yamaguishi, C.T. *et al.*, 2011. Recovery and identification of bovine colostrum microflora using traditional and molecular approaches, *Food Technology and Biotechnology*, 49, 364-368
- Malmuthuge, N., Chen, Y., Liang, G. *et al.*, 2015. Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves, *Journal of Dairy Science*, 98, 8044-8053

- McGuire, M.K., and McGuire, M.A., 2017. Got bacteria? The astounding, yet not-sosurprising, microbiome of human milk, *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 63-68
- McInnis, E.A., Kalanetra, K.M., Mills, D.A. *et al.*, 2015. Analysis of raw goat milk microbiota: impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity, *Food Microbiology*, 46, 121-131
- Murphy, K., Curley, D., O'Callaghan, T.F. *et al.*, 2017. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: a pilot study, *Scientific Reports*, 7, 1-10
- Norušis, M.J., 1990. *SPSS base system user's guide*, (Prentice Hall)
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P. *et al.*, 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Research*, 41, 590-596
- Ramsay, D.T., Kent, J.C., Owens, R.A. *et al.*, 2004. Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women, *Pediatrics*, 113, 361-367
- Rodríguez, J.M., 2014. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial enteromammary pathway during late pregnancy and lactation?, *Advances in Nutrition*, 5, 779-784
- Sasson, G., Ben-Shabat, S.K., Seroussi, E. *et al.*, 2017. Heritable bovine rumen bacteria are phylogenetically related and correlated with the cow's capacity to harvest energy from its feed, *MBio*, 8, 703-717
- Schloss, P.D., and Handelsman, J., 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1501-1506
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T. *et al.*, 2009. Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537-7541
- Šidák, Z., 1967. Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions, *Journal of the American Statistical Association*, 62, 626-633
- Uetake, K., 2013. Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates, *Animal Science Journal*, 84, 101-105
- Wang, M., Ikeda, S., Yoshioka, H. *et al.*, 2015. Relationships between immunoglobulin and fat-soluble vitamins in colostrum of Japanese Black multiparous cows, *Animal Science Journal*, 86, 673-678
- Zhang, F., Wang, Z., Lei, F. *et al.*, 2017. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China, *Journal of Dairy Science*, 100, 7812-7824

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W. *et al.*, 2015. Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1072-1079

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1- Composição do concentrado fornecido às vacas primíparas durante o pré e pós-parto.

Ingredients	Dietary	
	Prepartum (%)	Postpartum (%)
Soybean meal	0.000	70.300
Soybean corn	57.710	23.340
Limestone	2.720	1.900
Bicalcium phosphate	11.670	1.480
Salt	1.450	0.360
Urea	24.790	0.000
Copper sulphate	0.020	0.000
Sodium bicarbonate	0.000	1.330
Magnesium oxide	0.000	0.670
Vitamins	0.000	0.100
Zinc sulfate	0.060	0.000
Monensin	0.000	0.270
Sulfur flower	1.580	0.250
Total	100	100

Tabela S2 - Composição do concentrado fornecido às vacas pluríparas durante o pré e pós-parto

Ingredients	Dietary	
	Prepartum (%)	Prepartum (%)
Soybean meal	47.116	47.405
Soybean corn	33.654	43.938
Ammonium sulfate	1.912	0.847
Salt	0.622	1.624
Limestone	7.613	2.712
Bicalcium phosphate	3.049	1.465
Magnesium sulphate	1.313	0.914
Zinc sulfate	0.028	0.012
Copper sulphate	0.015	0.007
Calcium sulphate	1.313	0.677
Potassium iodate	0.001	0.000
Cobalt sulphate	0.000	0.000
Sodium selenite	0.000	0.000
Ammonium chloride	1.010	0.169
Calcium chloride	1.010	0.000
Potassium chloride	0.000	0.061
Magnesium oxide	0.169	0.000

Magnesium chloride	0.000	1.346
Total	100	100

Tabela S3 – Abundância relativa e *p*-valor de filos com diferenças significativas entre primíparas e pluríparas.

Taxonomy	Primiparous (%)	Multiparous (%)	<i>p</i>-value
<i>Fusobacteria</i>	0.076	0.014	0.002
<i>Fibrobacteres</i>	0.28	0.523	0.002
<i>Firmicutes</i>	32.968	40.028	0.006
<i>Proteobacteria</i>	23.876	15.992	0.007
<i>Kiritimatiellaeota</i>	0.655	0.962	0.008
<i>Tenericutes</i>	1.695	2.584	0.009
<i>Cloacimonetes</i>	0.094	0.038	0.024
<i>Actinobacteria</i>	7.651	5.838	0.032

Tabela S4 – Abundância relativa e *p*-valor de famílias com diferenças significativas entre primíparas e pluríparas.

Taxonomy	Primiparous (%)	Multiparous (%)	<i>p</i>-value
<i>Lachnospiraceae</i>	10.222	13.967	0.003
<i>Ruminococcaceae</i>	9.954	12.229	0.013
<i>Prevotellaceae</i>	7.072	10.117	0.014
<i>Weeksellaceae</i>	2.482	0.821	0.016
<i>Christensenellaceae</i>	2.478	3.593	0.004
<i>Rikenellaceae</i>	2.327	3.696	0.001
<i>Burkholderiaceae</i>	1.983	1.185	0.013

Tabela S5 – Abundância relativa, taxonomia e *p*-valor das OTUs indicadoras observadas em primíparas e pluríparas.

OTUs	Taxonomy	Primiparous (%)	Multiparous (%)	<i>p</i>-value (Sidak)
Otu00094	<i>Prevotella_1</i>	0.177	0.631	0.0199
Otu00101	<i>Brevundimonas</i>	0.612	0.011	0.0396
Otu00721	<i>Butyrivibrio_2</i>	0.000	0.062	0.0396
Otu00891	<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	0.007	0.051	0.0396
Otu01030	<i>Rikenellaceae_RC9_gut_group</i>	0.000	0.051	0.0199

APÊNDICES - CAPÍTULO 2

Tabela 1- Características fenotípicas de isolados obtidos de amostras de colostro de pluríparas e primíparas após o parto.

Isolado	Meio/Animal	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
C165	BHI/P3035	10-3R1	Grande, creme, fosca, borda irregular	Bacilo/ G-
C166	BHI/P3035	10-3R2	Média, branca, brilhante, borda irregular	Bacilo curto/ G-
C167	BHI/P3035	10-3R2	Média, branco leite, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C168	BHI/P3035	10-4R1	Pequena, creme, brilhante, circular	Bacilo/ G-
C170	BHI/P3035	10-4R1	Grande, translúcida, fosca, borda irregular	Cocos/ G+
C171	BHI/P3035	10-4R2	Média, amarela, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C173	BHI/P3035	10-4R2	Média, creme, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C173*	BHI/P3035	10-4R2	Média, creme, brilhante, circular	Cocos/ G+
C177	BHI/M2022	10-1R1	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C179	BHI/M2022	10-1R2	Pequena, amarelada, brilhante, circular	Bacilo/ G-
C181	BHI/P4009	Controle	Pequena, amarela, brilhante, circular	Cocos/ G+
C182	BHI/P4009	controle	Pequena, amarela, brilhante, circular	Cocos/ G+
C184	BHI/M2023	Controle	Pequena, creme translúcida, brilhante, circular	Cocos/ G+
C185	BHI/M2023	Controle	Média, creme leitosa, brilhante, circular	Cocos/ G+
C186	BHI/M2023	Controle	Pequena, amarela, fosca, circular	Cocos/ G+
C188	BHI/M2023	10-1R1	Média, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
C189	BHI/M2023	10-1R1	Média, branca, fosca, sem fosca	Cocos/ G+
C190	BHI/M2023	10-1R1	Média, creme, brilhante, circular	Cocos/ G+
C191	BHI/M2023	10-1R1	Pequena, branca, fosca, circular	Cocos/ G+
C192	BHI/M2023	10-3R1	Pequena, branca, fosca, circular	Cocos/ G+
C193	BHI/M2023	10-3R2	Pequena, amarela, fosca, circular	Cocos/ G+
C195	BHI/M2058	Controle	Pequena, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
C196	BHI/M2058	Controle	Pequena, creme, brilhante, circular	Cocos/ G+
C197	BHI/M2058	Controle	Pequena, amarela, brilhante, circular	Cocos/ G+
C198	BHI/M2058	10-1R1	Média, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
C199	BHI/M2058	10-1R1	Média, creme, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-

Isolado	Meio/Animal	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
C201	BHI/M2058	10-1R2	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo/G-
C202	BHI/M2058	10-1R2	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo / G-
C203	BHI/M1032	10-1R1	Grande, creme, brilhante, sem forma	Cocos/ G+
C204	BHI/M1032	10-1R1	Pequena, creme, brilhante, circular	Bacilo / G-
C205	BHI/M1032	10-1R1	Pequena, amarelada, brilhante, circular	Cocos/ G+
C206*	BHI/M1032	10-2R2	Média, creme, circular, com borda translúcida	Bacilo / G-
C208	BHI/M1032	10-2R2	Pequeninha, creme, brilhante, circular	Bacilo / G-
C210	BHI/M1028	10-1R1	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C211	BHI/M1028	10-1R1	Pequena, alaranjada, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C212*	BHI/M1028	10-2R2	Muito grande, creme, brilhante, forma irregular “flor”	Bacilo/ G+
C213	BHI/M1028	10-2R2	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C214	BHI/P4007	10-2R1	Grande, creme, brilhante, forma irregular	Bacilo/ G-
C215*	BHI/P4007	10-2R1	Média, creme, brilhante, circular	Bacilo / G-
C217	BHI/P4007	10-2R1	Pequena, amarelada, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
C218	BHI/P4007	10-2R2	Pequena, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
C219	BHI/P4007	10-2R2	Média, branca, fosca, circular	Cocos/ G+
C221	BHI/P4007	10-3R1	Pequena, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
C223	BHI/P4007	10-3R2	Pequena, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
C225	BHI/P4007	10-1R1	Pequena, creme c/ halo, forma irregular	Bacilo/ G-
C228*	BHI/P4007	10-2R1	Média, vermelha, brilhante, circular	Bacilo /G-

BHI; Meio Ágar Infusão Cérebro e Coração; **P**: Primíparas; **M**: Pluríparas.

Tabela 2- Classificação taxonômica e número de isolados bacterianos obtidos do colostro de Pluríparas e primíparas.

Família	Gênero	Isolados	Número de isolados											
			Pluríparas (n°)					Primíparas (n°)						
			2058	1032	2023	2022	1028	3023	3037	3035	4009	4007		
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	2	0	0	1	1	0	0	6	0	4	0	4
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella variicola</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	8	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1

Tabela 3 - Comparação das sequências do rRNA 16S das culturas dos isolados bacterianos obtidas do colostro de bovinos de leite pluríparas e primíparas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo BLAST (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
165CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	868	100	0.0	99
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	868	100	0.0	99

166CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	743	100	0.0	98
167CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 027549.1)	917	99	0.0	99
168CP	<i>Escherichia coli</i> NBRC 102203 (NR 114042.1)	619	100	0.0	98
170CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	650	100	0.0	98
171CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	665	99	0.0	98
173CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	439	98	0.0	95
	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR104901.1)	439	98	0.0	95
173*CP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	722	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel (NR 036904.1)	722	100	0.0	99
177CM	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	580	99	0.0	97
179CM	<i>Citrobacter koseri</i> LMG 5519 (NR 117751.1)	316	100	9.00E-161	99
	<i>Citrobacter koseri</i> CIP 82.87 (NR118588.1)	316	100	9.00E-161	99
	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR104901.1)	316	100	9.00E-161	99
	<i>Citrobacter koseri</i> CDC-8132-86 (NR 104890.1)	316	100	9.00E-161	99
181CP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	604	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel (NR 036904.1)	604	99	0.0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo BLAST (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
-----------	---	---------------------	----------------------	----------------	-----------------------

182CP	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	389	100	0.0	100
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	389	100	0.0	100
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	389	100	0.0	100
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	389	100	0.0	100
184CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	725	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	725	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	725	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	725	99	0.0	99
185CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	573	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	573	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	573	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	573	100	0.0	99
186CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	725	99	0.0	100
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	725	99	0.0	100
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	725	99	0.0	100
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	725	99	0.0	100
188CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	397	100	0.0	97
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	397	100	0.0	97
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	397	100	0.0	97
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	397	100	0.0	97
189CM	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007 (NR 117677.1)	590	100	0.0	97
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606 (NR 117620.1)	590	100	0.0	97

Acinetobacter baumannii JCM 6841 (NR 113237.1) 590 100 0.0 97

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo BLAST (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> CIP 70.34 (NR 116845.1)	590	100	0.0	97
	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007 (NR 026206.1)	590	100	0.0	97
190CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	619	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	619	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	619	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	619	99	0.0	99
191CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	639	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	639	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	639	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	639	100	0.0	99
192CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	816	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	816	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	816	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	816	100	0.0	99
193CM	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	733	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	733	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	733	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	733	99	0.0	99

195CM	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	783	99	0.0	99
196CM	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	743	100	0.0	99
197CM	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	525	100	0.0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo BLAST (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
198CM	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	534	100	0.0	99
199CM	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	505	100	0.0	98
201CM	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	470	100	0.0	97
202CM	<i>Serratia marcescens subs. Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)	416	99	0.0	98
203CM	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	358	100	0.0	98
204CM	<i>Providencia rettgeri</i> DSM 4542 (NR 042413.1)	489	100	0.0	97
205CM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	798	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel (NR 036904.1)	798	100	0.0	99
206*CM	<i>Serratia marcescens subs. Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)	566	100	0.0	99
208CM	<i>Klebsiella variicola</i> F2R9 (NR 025635.1)	450	100	0.0	99
210CM	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	355	100	0.0	99

211CM	<i>Citrobacter koseri</i> LMG 5519 (NR 117751.1)	361	99	0.0	99
	<i>Citrobacter koseri</i> CIP 82.87 (NR118588.1)	361	99	0.0	99
212*CM	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1)	348	99	3.00E-180	99
213CM	<i>Klebsiella variicola</i> F2R9 (NR 025635.1)	308	100	3.00E-155	99
214CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	473	99	0.0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo BLAST (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
215*CP	<i>Citrobacter koseri</i> CDC- 8132-86 (NR 104890.1)	307	97	3.00E-131	95
	<i>Enterobacter hormaechei</i> 0992-77 (NR 042154.1)	307	97	3.00E-131	95
	<i>Raoultella planticola</i> JCM 7251 (NR 112011.1)	307	97	3.00E-131	95
217CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	390	100	0.0	99
	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR104901.1)	390	100	0.0	99
	<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	390	100	0.0	99
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	390	100	0.0	99
218CP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	655	99	0.0	99
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel (NR 036904.1)	655	99	0.0	99
219CP	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	642	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	642	100	0.0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	642	100	0.0	99

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR115606.1)	642	100	0.0	99
221CP	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	641	100	0.0	99
223CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	490	94	0.0	97
	<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	490	94	0.0	97
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	490	94	0.0	97
225CP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	648	100	0.0	99
228*CP	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204 (NR 114043.1)	348	100	0.0	98
	<i>Serratia marcescens</i> JCM 1239 (NR 113236.1)	348	100	0.0	98
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZO503SBS1(NR 044385.1)	348	100	0.0	98

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo BLAST (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
	<i>Serratia marcescens</i> subs. <i>Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)	348	100	0.0	98
	<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 (NR 041980.1)	348	100	0.0	98

CM: colostro de múltipara; **CP:** colostro de primípara.

Tabela 4- Isolados bacterianos obtidos do colostro de pluríparas e primíparas.

Filo	Família	Gênero	Isolados (espécie)	Nº /Abundância relativa (%)		
				Pluríparas	Primíparas	Total
Proteobacteria	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (3,7)	0 (0)	1 (2,2)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	2 (7,4)	1 (5,3)	3 (6,5)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	1 (3,7)	0 (0)	1 (2,2)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	0 (0)	1 (5,3)	1 (2,2)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	4 (14,8)	10 (52,6)	14 (30,4)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella variicola</i>	2 (7,4)	0 (0)	2 (4,3)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Providencia</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	1 (3,7)	0 (0)	1 (2,2)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	2 (7,4)	1 (5,3)	3 (6,5)
Firmicutes	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	8 (29,6)	2 (10,5)	10 (21,7)
Firmicutes	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	5 (18,5)	1 (5,3)	6 (13)
Firmicutes	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 (3,7)	3 (15,8)	4 (8,7)

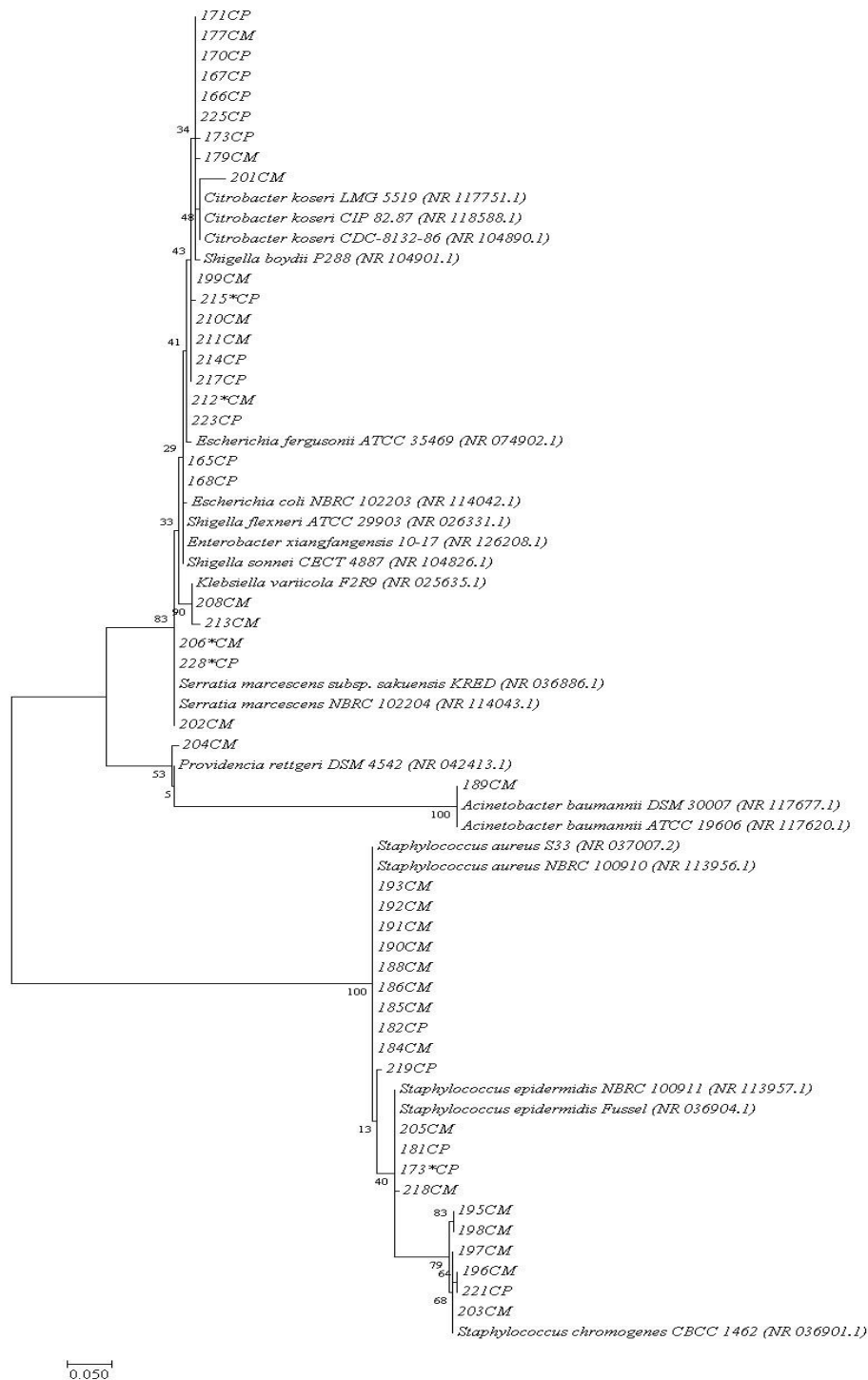


Figura 1- Arvore filogenética reconstruída com base nas sequências do gene rRNA 16S dos isolados obtidos das amostras de colostro de pluríparas e primíparas utilizando o método estatístico de Máxima Verossimilhança, baseado no modelo Tamura-Nei pelo método de Bootstrap (1000 interações). A porcentagem de similaridade entre as sequências agrupadas é mostrada ao lado das ramificações. **CM:** colostro de plurípara; **CP:** colostro de primípara.

CAPÍTULO 3

COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE VACAS PLURÍPARAS, PRIMÍPARAS E BEZERROS RECÉM-NASCIDOS

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) de mamíferos é considerado estéril ainda dentro do útero, mas é colonizado rapidamente por bactérias durante e após o nascimento (Malmuthuge *et al.*, 2015). As fontes desses microrganismos e as rotas de inoculação tem atraído atenção em função dos impactos da colonização inicial do TGI sobre a saúde e desenvolvimento do bezerro e seus efeitos no desempenho do animal adulto (Makino, 2018). O primeiro contato do bezerro com a microbiota do ambiente ocorre no momento do parto, durante a passagem pelo canal vaginal, pelo contato com as fezes e saliva da vaca após o nascimento, seguido pela ingestão do colostro (Rey *et al.*, 2014). Estudos que visem identificar as vias de inoculação da microbiota e os fatores que alteram a diversidade desses microrganismos ainda são escassos.

O colostro é umas das formas de inoculação de microrganismos para o TGI de ruminantes recém-nascidos e a sua diversidade varia de acordo com a dieta, ordem de parição e utilização de antibióticos (Lima *et al.*, 2017). Em trabalho anterior, foi observado que vacas primíparas apresentam maior diversidade microbiana no colostro em relação às vacas pluríparas, o que parece estar associado com a menor exposição desses animais a antibióticos usados no controle da mastite e no tratamento de outras enfermidades resultantes do manejo inadequado durante a ordenha (Lima *et al.*, 2017). O uso de antibióticos é uma prática comum durante a criação de animais de produção (monogástricos e ruminantes) com o objetivo de melhorar a eficiência alimentar e desempenho dos animais, prevenir doenças no rebanho e tratar infecções microbianas que acometem animais jovens e adultos (Ungemach *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2014). Vacas pluríparas (> um parto) são geralmente expostas a antibióticos intramamários durante o período final da gestação para promover a secagem do leite (terapia da vaca seca) 60 dias antes do parto, visando estimular a recuperação do úbere e propiciar boa produção de leite na lactação subsequente (Blowey e Edmondson, 2010).

A microbiota intestinal de ruminantes é um ecossistema complexo e dinâmico. Bactérias com potencial probiótico já foram encontradas nas fezes de animais e o seu uso contribui para diminuir a ocorrência de diarreia. Dessa forma, estudos que relacionam a microbiota intestinal à saúde e crescimento dos animais já vêm sendo realizados (Donovan *et al.*, 2002; Timmerman *et al.*, 2005; Oikonomou *et al.*, 2013). Gomez *et al.* (2017) observaram que a microbiota das fezes de bezerros com ou sem diarreia pertencentes a mesma fazenda compartilham comunidades microbianas semelhantes quando comparada a bezerros saudáveis e diarreicos pertencentes a outras fazendas. Entretanto, a avaliação da microbiota intestinal necessita muitas vezes de técnicas invasivas ou levam ao abate dos animais, acarretando em prejuízo ao sistema de produção. Alguns estudos sugerem o uso de amostras fecais para avaliar a microbiota do TGI e a relação dessa microbiota com o estado de saúde ou doença manifestado por esses animais (Nash *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2018)

Entretanto, pouco se sabe se a microbiota fecal da mãe possui alguma relação com a colonização intestinal dos bezerros logo após o parto. Considerando que as fezes são importantes vias de transmissão da microbiota para a colonização do TGI de bezerros, a análise da microbiota fecal representa um método não invasivo para acessar a microbiota do TGI dos animais recém-nascidos (Tapio *et al.*, 2017). Neste trabalho o objetivo foi comparar a composição da microbiota fecal de vacas pluríparas e primíparas e dos seus bezerros recém-nascidos por método independente de cultivo, por meio do sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios - Departamento de Microbiologia – UFV. As amostras de colostro foram coletadas um, dois e três dias após o parto de vacas leiteiras pluríparas (P) (n = 5) e primíparas (Pp) (n = 5) e suas respectivas crias: bezerros de primíparas (BP) (n= 5); bezerros de pluríparas (BPp) (n=5), pertencentes a Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite - Departamento de Zootecnia – UFV. Todos os procedimentos de manejo e coleta dos animais foram conduzidos conforme a legislação vigente e as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa/ CEUAP-UFV, onde o projeto foi protocolado e aprovado (Processo nº 062/2016).

As dietas dos animais possuíam a seguinte relação volumoso/concentrado no pré-parto: 84/16% e 72/28% para primíparas e pluríparas, respectivamente. No pós-parto a relação foi de 72/28% e 63/37% para primíparas e pluríparas, respectivamente. O volumoso era à base de silagem de milho e a composição do concentrado utilizado em cada categoria está descrita nas Tabelas S1 e S2 (Material Suplementar). Anteriormente à coleta do colostro para o fornecimento aos bezerros recém-nascidos, foi realizada a limpeza dos tetos com iodo (*pré-dipping*) e os primeiros jatos foram dispensados em caneca de fundo telado para avaliação de mastite pela presença de grumos retidos na tela. As fezes das vacas e dos bezerros foram coletadas um dia após o parto, por meio de estímulo retal e foram armazenadas em caixas térmicas e transportadas até o laboratório para as análises microbiológicas.

Extração de DNA total das fezes e sequenciamento de *amplicons* (16S)

A extração de DNA total das amostras de fezes foi realizada de acordo com metodologia proposta por Stevenson e Weimer (2007). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram mensuradas utilizando NanoDropTM Plate (Thermo Scientific Multiskan GO), sendo armazenados a -20°C até o uso.

O processamento e a análise dos dados foram realizados no programa Mothur v.1.39.0 (Schloss *et al.*, 2009). Inicialmente, as sequências obtidas foram atribuídas às amostras de origem a partir da sequência *index* dos oligonucleotídeos utilizados na segunda PCR. As sequências R1 e R2 do sequenciamento *paired-end* (Illumina, San Diego, CA) foram ligadas nas extremidades, formando sequências de 150 a 300 pb. As sequências de tamanhos menores que 150 pb e maiores que 300 pb foram eliminadas, assim como homopolímeros de tamanho acima de 8 pb e sequências com pares de bases ambíguos. Após a remoção de quimeras usando o algoritmo Uchime (Edgar *et al.*, 2011) as sequências foram alinhadas com sequências do gene rRNA 16S, utilizando o banco de dados Silva (Quast *et al.*, 2012). Sequências com mais de 97% de similaridade foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic units* – OTU) utilizando o método *furthest neighbor* (Schloss e Handelsman, 2005). As OTUs foram normalizadas para o menor número de sequências observadas entre as amostras. Os índices de diversidade (Chao1, Shannon e Simpson), assim como a abundância relativa das OTUs foram analisados a partir da tabela de OTUs normalizada.

Análises estatísticas

O agrupamento das amostras de fezes de vacas pluríparas e primíparas assim como das fezes dos bezerros foi feito por meio da análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis e teste de similaridade para dados não paramétricos (ANOSIM, número de permutações =10000) utilizando o software Past (Hammer *et al.*, 2001). As diferenças nos índices de diversidade de pluríparas e primíparas e dos bezerros de pluríparas e dos bezerros de primíparas foram verificadas inicialmente por meio do teste de normalidade, considerando ($p < 0,05$) como significativo para os testes Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, D'Alagostino e Pearson utilizando o software Graphpad Prism, v.5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) (Prism, 1994). Quando os conjuntos de dados não seguiram distribuição normal, as médias foram comparadas pelo teste t não paramétrico, considerando ($p < 0,05$) como significativo.

Para verificar se a abundância relativa das OTUs possuía distribuição normal (distribuição Gaussiana), foram realizados os seguintes testes de normalidade:

Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, D'Alagostino e Pearson utilizando o software Graphpad Prism, v.5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) (Prism, 1994), utilizando ($p > 0,05$) como não significativo. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados por meio do *White's nonparametric t-test*, utilizando o software STAMP v 2.1.3 (Statistical Analysis of Taxonomic and Funcional Profiles Statistical Analysis of Taxonomic and Funcional Profiles) (Parks *et al.*, 2014).

RESULTADOS

Caracterização da microbiota fecal de pluríparas, primíparas e bezerros recém-nascidos por meio de Sequenciamento de *amplicons* (NGS)

A análise da diversidade beta das fezes de vacas pluríparas, primíparas e bezerros indicou que a dissimilaridade de Bray-Curtis da comunidade bacteriana variou entre os grupos de animais analisados neste trabalho. Foi possível observar dois agrupamentos: Animais jovens (BP e BPp) e animais adultos (pluríparas e primíparas), sendo que BP e BPp foram semelhantes entre si, como acontece entre

pluríparas e primíparas (ANOSIM, $p > 0,05\%$), entretanto animais jovens apresentaram microbiota distinta dos animais adultos (ANOSIM, $p < 0,05\%$) (Figura 1).

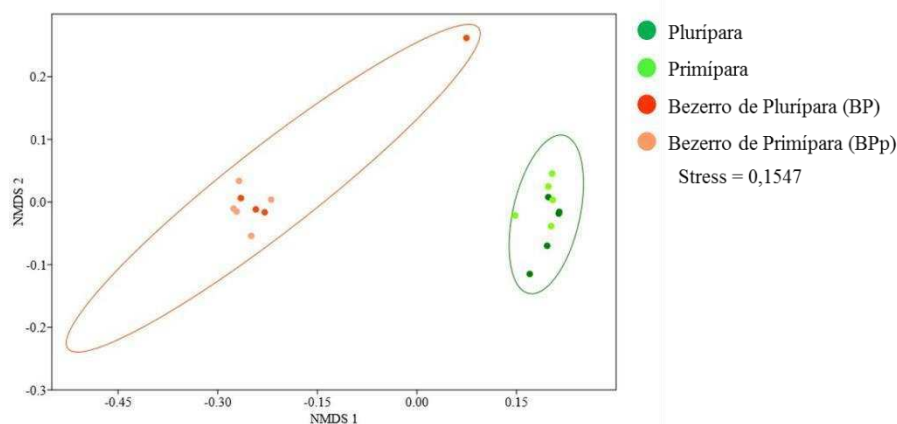


Figura 1 – Análise de escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) realizada de acordo com o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis para comunidades microbianas presente nas fezes de pluríparas, primíparas, bezerros de pluríparas (BP) e bezerros de primíparas (BPp). Os pontos individuais indicam as amostras e as cores indicam as categorias.

O sequenciamento do gene do rRNA 16S das amostras de fezes de pluríparas, primíparas, e bezerros gerou 711.678 sequências brutas, com tamanho máximo, médio e mínimo de 302 pb, 240 pb e 151 pb, respectivamente. Após a filtragem e limpeza das sequências, com a remoção de quimeras e homopolímeros, foram obtidas 529.665 sequências de boa qualidade. O Good's Coverage obtido nas amostras foi $> 99\%$, indicando boa cobertura do sequenciamento. O resumo dos dados de sequenciamento das amostras de fezes está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Resumo dos dados de sequenciamento da comunidade bacteriana (rRNA 16S) das amostras de fezes de pluríparas, primíparas e bezerros.

Categoria	n	Good's Coverage	Após a limpeza e filtragem		Após a normalização	
			Reads	OTU's	Reads	OTU's
Plurípara	5	0,992 ± 0,001	18222 ± 52,2	1027,2 ± 264,8	14308,8 ± 2439,9	1022,6 ± 264
Primípara	5	0,993 ± 0001	18256,8 ± 76,2	1113,2 ± 230,7	16537,6 ± 832,7	1109,6 ± 232
Bezerro plurípara (BP)	4*	0,998 ± 0,002	18177 ± 31,9	403,3 ± 408,9	13903,8 ± 5796,2	399,3 ± 407,7
Bezerro primípara (BPp)	5	0,999 ± 0,000	18153,6 ± 12,9	222,4 ± 21,5	14075,2 ± 4139,5	219,4 ± 21,2

* Não houve resultado do sequenciamento para essa amostra.

Os índices de riqueza (Chao 1) e diversidade (Shannon e Simpson) indicaram que as comunidades bacterianas das fezes de pluríparas e primíparas, assim como bezerros de pluríparas e bezerros de primíparas não diferem significativamente entre

si (teste t não paramétrico, $p > 0,05$). Entretanto, quando comparada às mães e suas respectivas crias, foi observada diferença significativa para todos os índices avaliados (Figura 2). O índice de Chao 1 variou de 402,8 (BPp) a 1073 (pluríparas), o índice de Shannon foi de 2,118 (BPp) a 4,862 (primíparas) e o índice de Simpson variou de 0,034 (primíparas) a 0,230 (BPp), tendo sido em geral maiores nas amostras obtidos de animais adultos do que nas amostras dos bezerros.

Ao todo, as sequências foram classificadas em 24 filos, 40 classes, 100 ordens, 201 famílias e 390 gêneros. Nas fezes de pluríparas e primíparas foram identificados 20 filos bacterianos, com predominância, em cada grupo, respectivamente, de membros dos filos: *Firmicutes* ($73,15 \pm 1,468\%$ e $71,61 \pm 3,258\%$), *Bacteroidetes* ($10,53 \pm 2,811\%$ e $12,91 \pm 2,992\%$), *Actinobacteria* ($5,96 \pm 2,599\%$ e $4,57 \pm 2,551\%$) e *Tenericutes* ($3,95 \pm 1,503\%$ e $4,15 \pm 1,440\%$). Nos bezerros de primíparas e pluríparas foram identificados 22 filos distintos, sendo os mais abundantes os filos *Firmicutes* ($58,80 \pm 4,09$ e $57,46 \pm 7,66$, respectivamente) e *Proteobacteria* ($29,51 \pm 4,54 \%$ e $29,35 \pm 13,29$, respectivamente), além da representatividade expressiva, em cada grupo de bezerros, dos filos *Bacteroidetes* ($5,82 \pm 1,03$ e $6,96 \pm 4,11$) e *Actinobacteria* ($3,17 \pm 1,75$ e $3,29 \pm 2,46$) (Figura 3).

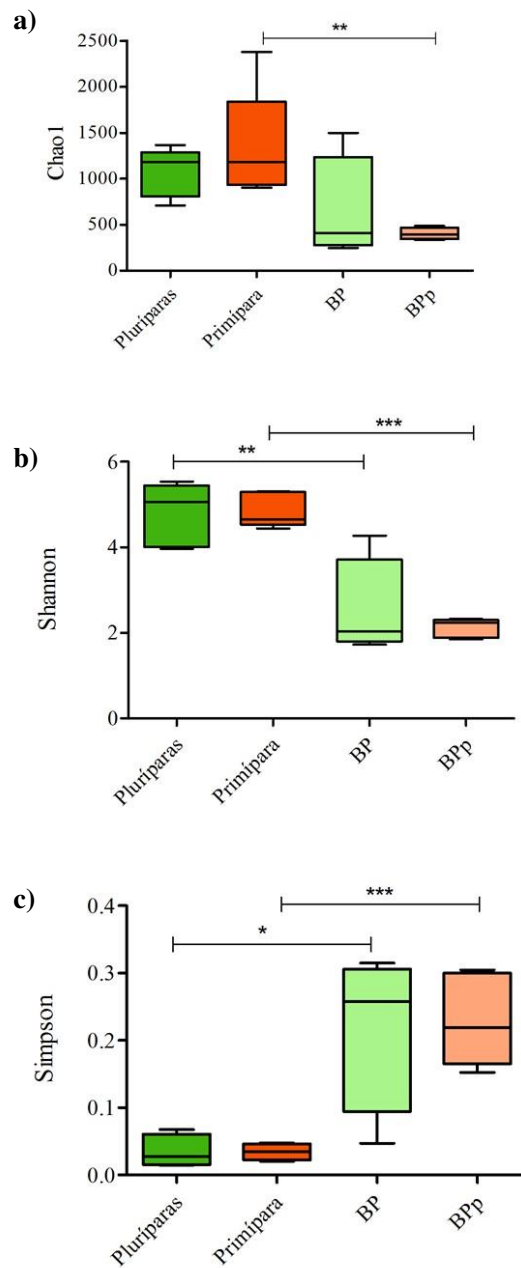


Figura 2 - Estimativas de Alfa diversidade das amostras de fezes de pluríparas, primíparas e bezerros. **a)** Índice de riqueza de Chao1; **b)** Índice de Shannon; **c)** Índice de diversidade de Simpson, para amostras de fezes de pluríparas, primíparas, bezerros nascidos de pluríparas (BP) e bezerros nascidos de primíparas (BPP) um dia após o parto. Não houve diferença significativa dentro de cada categoria analisadas pelo teste t não paramétrico ($p < 0,05$). * significativo $p < 0,05$; ** significativo $p < 0,01$; *** significativo $p < 0,001$.

A análise da relação Firmicutes/Bacteroidetes não indicou diferenças significativas entre os animais adultos e os bezerros de primíparas e pluríparas (teste t

não paramétrico, $p < 0,05$). No entanto, os resultados indicaram que essa relação diminui nos animais adultos em relação aos bezerros (Figura 4).

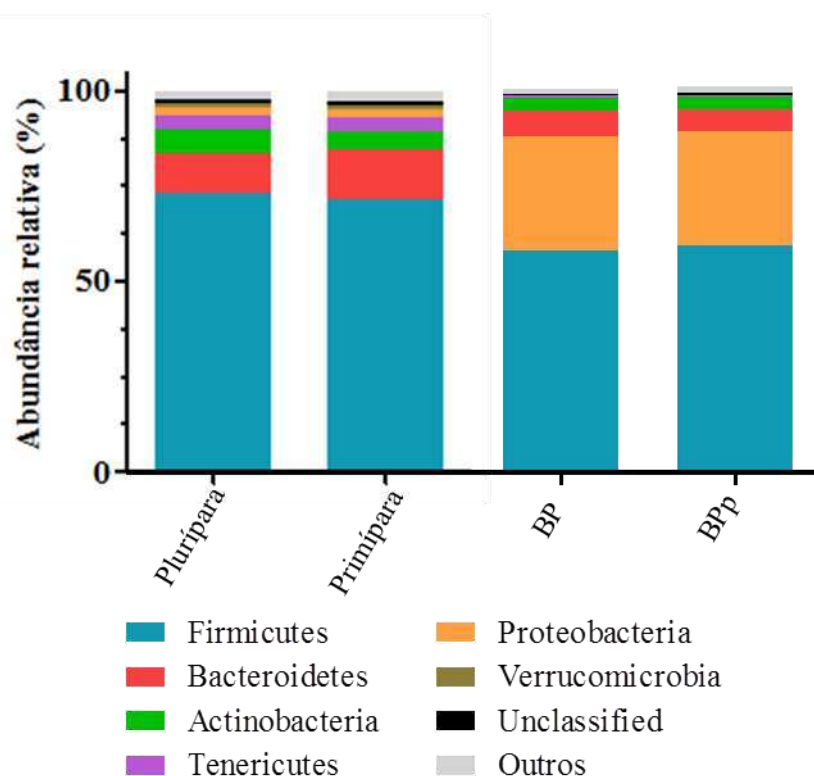


Figura 3 – Composição, em nível de filo, da comunidade bacteriana das fezes de pluríparas, primíparas e bezerros de pluríparas (BP) e primíparas (BPp) com abundância relativa > 0,5%; “Outros” representam filós com abundância relativa < 0,5%.

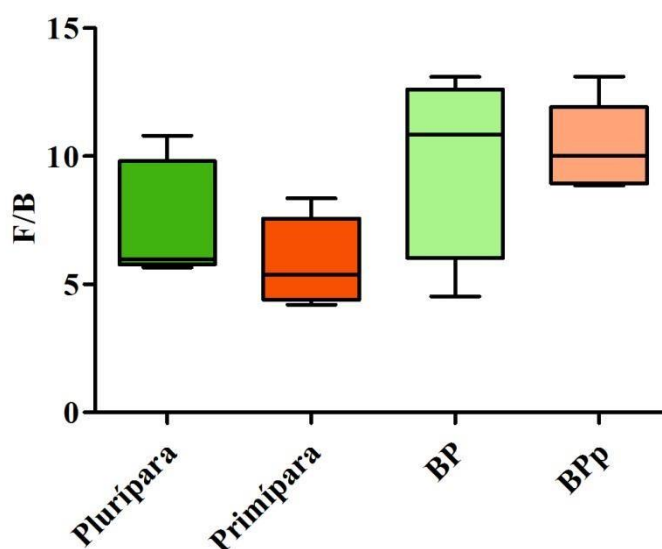


Figura 4 – Relação Firmicutes/Bacteroidetes da comunidade bacteriana de amostras fecais de pluríparas, primíparas, e bezerros de pluríparas (BP) e primíparas (BPp).

Foram identificadas 99 e 104 famílias bacterianas nas fezes de pluríparas e primíparas, respectivamente, enquanto nas amostras de bezerros de pluríparas e

primíparas foram observadas 109 e 75 famílias, respectivamente. Do total, 47 famílias foram compartilhadas entre os animais adultos e os bezerros logo após o nascimento (Tabela S3 - Material suplementar). Pluríparas e primíparas compartilharam 13 famílias de bactérias, incluindo *Thermoactinomycetaceae*, *Actinomycetaceae*, *Izimaplasmatales_fa*, *Paludibacteraceae*, *Victivallaceae*, *Elusimicrobiaceae*, *Streptomycetaceae*, *vadin BE97*, *Methyloligellageae*, *Pseudonocardiaceae*, *Puniceicoccaceae*, *Neisseriaceae* e *Porphyromonadaceae*. Nos bezerros de pluríparas e primíparas, foram observadas 11 famílias compartilhadas, sendo a maioria distinta dos animais adultos: *Sphingomonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Shewanellaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, *Synergistaceae*, *BRC1_fa*, *Subgroup_6_fa*, *Dermabacteraceae*, *Xanthobacteraceae*.

Quando foi avaliado o compartilhamento da microbiota das mães com os respectivos bezerros, observou-se que vacas pluríparas compartilhavam cinco famílias bacterianas com a microbiota fecal dos seus bezerros recém-nascidos, enquanto primíparas compartilhavam apenas duas famílias de bactérias nas fezes dos bezerros. Em todos os casos, a abundância relativa dos grupos microbianos compartilhados foi $\leq 0,1\%$ do total observado nas amostras de fezes.

A análise da composição da microbiota das fezes de pluríparas, primíparas e seus respectivos bezerros (BP e BPp) indicou que a estrutura da comunidade bacteriana em nível de família foi similar entre animais do mesmo grupo, à exceção da plurípara 2022 e do bezerro 6012 (cria da vaca 2022), cuja abundância relativa das famílias de bactérias diferiu em relação aos demais animais do grupo.

No grupo das pluríparas e primíparas foram observadas 18 famílias com abundância relativa $\geq 0,5\%$, representando aproximadamente 74% da microbiota fecal desses animais. No grupo das pluríparas, as 10 famílias mais abundantes foram representadas por *Ruminococcaceae* ($24,89 \pm 4,9\%$), *Lachnospiraceae* ($17,5 \pm 1,86\%$), *Christensenellaceae* ($9,45 \pm 0,44\%$), *Family_XIII* ($4,26 \pm 0,62\%$), *Rikenellaceae* ($3,80 \pm 1,19\%$), *Mollicutes_RF39_fa* ($3,75 \pm 1,34\%$), *Peptostreptococcaceae* ($3,32 \pm 1,46\%$), *Clostridiaceae_1* ($2,50 \pm 0,71\%$), *Eggerthellaceae* ($2,42 \pm 0,82\%$) e *Erysipelotrichaceae* ($2,40 \pm 0,93$). Nas primíparas, as 10 famílias com maior abundância foram *Ruminococcaceae* ($28,5 \pm 3,68\%$), *Lachnospiraceae* ($15,40 \pm 1,70\%$), *Chritensenellaceae* ($7,72 \pm 1,45\%$), *Rikenellaceae* ($5,44 \pm 1,38\%$), *Mollicutes_RF39_fa* ($4,1 \pm 1,3\%$), *Family_XIII* ($3,27$

$\pm 1,10\%$), *Peptostreptococcaceae* ($3,01 \pm 0,45\%$), *Clostridiaceae_1* ($2,92 \pm 0,87\%$), *Erysipelotrichaceae* ($2,15 \pm 0,83\%$) e *Prevotellaceae* ($1,91 \pm 0,45\%$). No entanto, a abundância relativa dessas taxa não diferiu entre as vacas pluríparas e primíparas (*White's non-parametric t-test*, $p > 0,05$), exceto para a família *Christensenellaceae*, que foi, em média, mais abundante em pluríparas do que em primíparas (Figura 5).

Nos bezerros recém-nascidos de pluríparas, as 10 famílias com maior abundância relativa foram *Enterobacteriaceae* ($22,72 \pm 14,74\%$), *Clostridiaceae_1* ($17,36 \pm 10,16\%$), *Ruminococcaceae* ($9,31 \pm 6,65\%$), *Lachnospiraceae* ($9,02 \pm 2,47\%$), *Peptostreptococcaceae* ($3,63 \pm 2,39\%$), *Streptococcaceae* ($3,15 \pm 2,35\%$), *Moraxellaceae* ($2,48 \pm 0,81\%$), *Enterococcaceae* ($2,45 \pm 1,49\%$), *Lactobacillaceae* ($2,26 \pm 0,99\%$) e *Prevotellaceae* ($2,20 \pm 0,66\%$), representando 74,6% da abundância relativa total. Nos bezerros recém-nascidos de primíparas, as 10 famílias mais abundantes foram *Enterobacteriaceae* ($22,96 \pm 2,79\%$), *Clostridiaceae_1* ($20,78 \pm 3,01\%$), *Lachnospiraceae* ($8,44 \pm 2,37\%$), *Ruminococcaceae* ($6,22 \pm 2,58\%$), *Lactobacillaceae* ($4,98 \pm 1,39\%$), *Peptostreptococcaceae* ($4,77 \pm 1,86\%$), *Streptococcaceae* ($3,04 \pm 1,20\%$), *Enterococcaceae* ($2,68 \pm 1,07\%$), *Erysipelotrichaceae* ($1,73 \pm 0,64$) e *Moraxellaceae* ($1,58 \pm 0,54\%$), o que representou aproximadamente 77% da microbiota fecal desses animais. Apenas a família *Lactobacillaceae* foi mais abundante em bezerros nascidos de primíparas quando comparado aos bezerros nascidos de pluríparas (*White's non-parametric ttest*, $p < 0,05$). As famílias com abundância relativa $>0,5\%$ observadas nas amostras de pluríparas, primíparas, BP e BPp estão representadas na Figura 5.

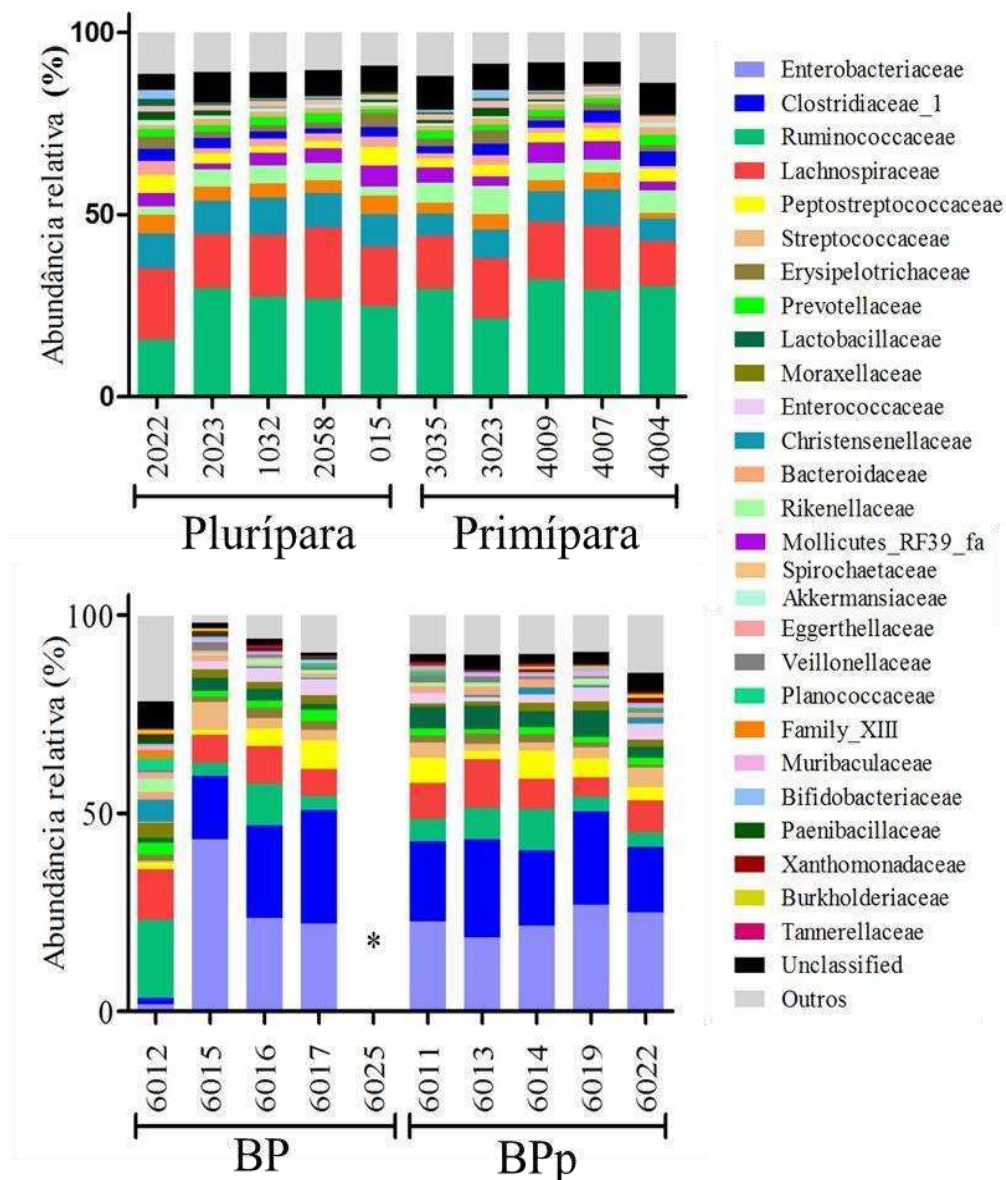


Figura 5 – Abundância relativa em nível de família da microbiota fecal de pluríparas primíparas e suas respectivas crias (BP e BPp). Famílias com abundância relativa < 0,5% foram classificadas em “Outros”. Amostras na mesma direção vertical são relativas a mãe e respectiva cria *Amostra que o sequenciamento não foi bem sucedido.

Foram identificados 15 gêneros diferentes nas amostras de fezes de pluríparas e primíparas, com abundância relativa $\geq 0,5\%$, sendo que apenas o gênero *Ruminococcus_1* foi significativamente mais abundante (*White's non-parametric ttest*, $p < 0,05$) nas primíparas ($0,74 \pm 0,22\%$) quando comparado às pluríparas ($0,23 \pm 0,16\%$) (Figura 6a). Apesar disso, mais de 70% das sequências da microbiota fecal de pluríparas e primíparas e 50% das sequências das fezes dos bezerros desses animais não foram classificados em nível de gênero. Na comunidade bacteriana das

amostras de fezes de bezerros de pluríparas foram identificados 26 gêneros distintos com abundância relativa $\geq 0,5\%$. Dentre esses, os gêneros *Lactobacillus* e *Faecalibacterium* apresentaram abundância relativa significativamente maior (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) nas fezes dos bezerros de primíparas quando comparado à microbiota fecal dos bezerros de pluríparas (Figura 6b).

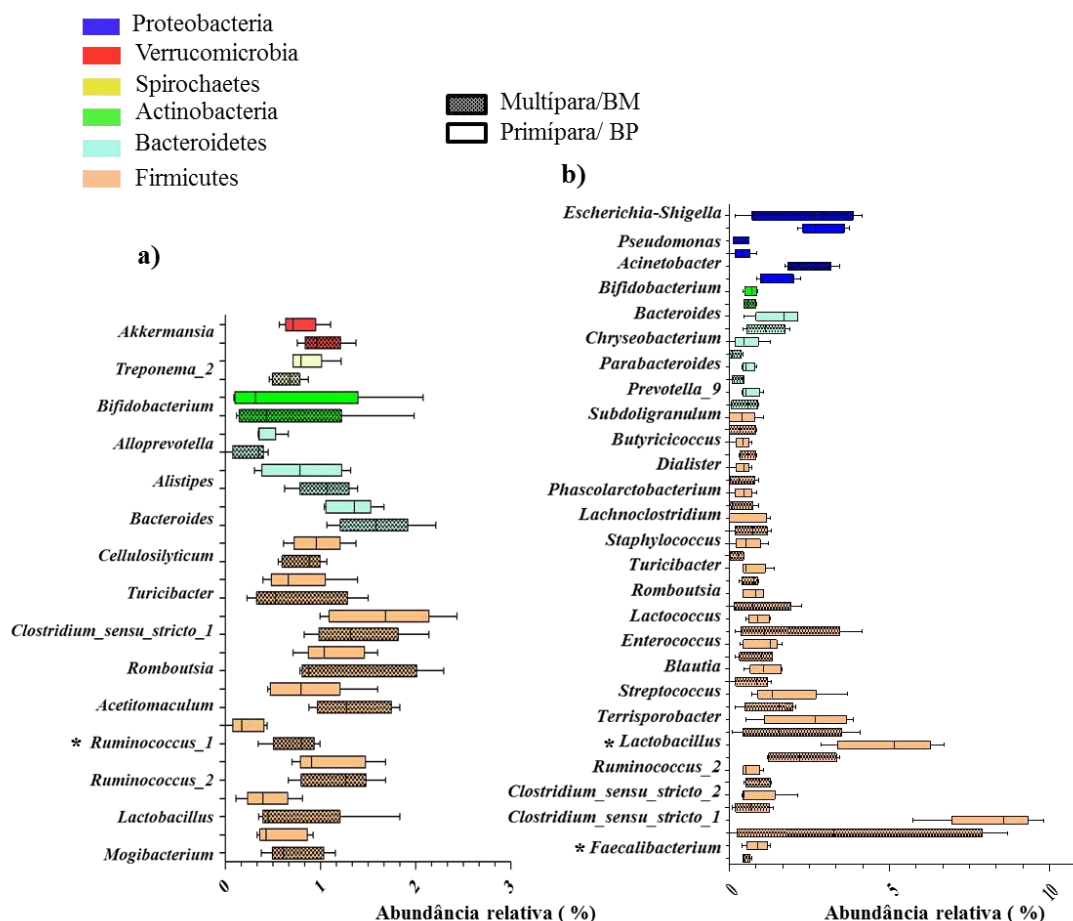


Figura 6 – a) Abundância relativa da microbiota das fezes de vacas pluríparas e primíparas; b) bezerros nascidos de pluríparas (BP) e bezerros nascidos de primíparas (BPP) com abundância relativa acima de 0,5% após a classificação taxonômica em nível de gênero. As barras representam a abundância relativa de cada gênero e as cores são os filos aos quais esses gêneros pertencem. * Significativo a 0,05% pelo *White's non-parametric t-test*.

Os dados do sequenciamento foram analisados separadamente e as *reads* foram classificadas em OTUs de acordo com a similaridade entre as sequências. Foram obtidos 2443 e 2649 OTUs em pluríparas e primíparas, respectivamente. Nos animais jovens foram classificadas 1271 OTUs em BP e 577 em BPP. Ao todo 99 OTUs foram compartilhadas por pluríparas, primíparas, BP e BPP, sendo que as OTUs mais abundantes ($>0,5\%$) nos animais adultos foram diferentes das mais abundantes nos animais jovens (Tabela 2). Acima de 0,5% de abundância relativa

entre as OTUs foram identificadas três OTUs compartilhadas por todos os animais analisados neste estudo, a saber, OTU 00037 (*Clostridium_sensu_stricto_1*); OTU 00001 (*Escherichia-Shigella*) e OTU 00026 (*Clostridium_sensu_stricto_1*).

Tabela 2 – Compartilhamento de OTUs identificadas na comunidade microbiana presente em fezes de pluríparas, primíparas, BP e BPp com abundância relativa $\geq 0,5\%$.

OTU's compartilhadas				
OTU	Taxonomia	Plurípara (%)	Primípara (%)	p-valor
Otu00004	<i>Romboutsia</i>	10,58	9,56	0,72
Otu00005	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	8,35	9,00	0,87
Otu00009	<i>Paeniclostridium</i>	6,13	6,82	0,73
Otu00014	<i>Peptostreptococcaceae_unclassified</i>	3,86	2,72	0,43
Otu00017	<i>Turicibacter</i>	2,45	2,35	0,93
Otu00066	<i>Bifidobacterium</i>	2,35	0,06	0,31
Otu00029	<i>Romboutsia</i>	1,87	1,49	0,42
Otu00037	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	0,91	0,97	0,84
Otu00041	<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>	0,70	0,23	0,03
OTU	Taxonomia	BP (%)	BPp (%)	p-valor
Otu00001	<i>Escherichia-Shigella</i>	35,72	39,35	0,93
Otu00003	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	12,65	12,96	0,99
Otu00007	<i>Enterobacteriaceae_unclassified</i>	4,90	8,05	0,89
Otu00013	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	3,52	4,78	0,85
Otu00012	<i>Terrisporobacter</i>	2,82	5,88	0,15
Otu00026	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	2,52	1,85	0,91
Otu00005	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	1,81	1,93	0,99
Otu00015	<i>Enterococcus</i>	1,53	5,57	0,05
Otu00050	<i>Streptococcus</i>	0,84	0,74	0,98

BP: Bezerro de plurípara; BPp: Bezerro de primípara. **Negrito:** OTUs que fazem parte da microbiota *Core* desses animais.

DISCUSSÃO

Imediatamente após o nascimento, bactérias associadas às mães e ao ambiente iniciam a colonização do TGI dos bezerros resultando no desenvolvimento de uma complexa microbiota. Fatores como microbiota presente na vagina, colostro e fezes das vacas (mães), assim como os microrganismos da dieta e do ambiente, além da utilização de prebióticos e probióticos e a administração de antimicrobianos no período neonatal, podem influenciar a composição da microbiota das matrizes e consequentemente interferir na colonização inicial do TGI dos bezerros (Minato *et al.*, 1992; Edrington *et al.*, 2012; Malmuthuge *et al.*, 2013; Meale *et al.*, 2016). Pluríparas e primíparas possuem diferenças no manejo (ordenha), na dieta (relação volumoso/concentrado) e na utilização de antibióticos (terapia da vaca seca), que podem resultar no estabelecimento de comunidades microbianas distintas entre esses animais e as suas crias (Uetake, 2013; Lima *et al.*, 2017).

No presente trabalho foi avaliada a diversidade da microbiota das fezes de bezerros nascidos de vacas pluríparas e primíparas e os perfis de diversidade e abundância da microbiota fecal desses animais foram comparadas. Analisando os índices de diversidade por grupo de animais, foi possível observar que os animais adultos (pluríparas e primíparas) possuem maior diversidade (índices de Shannon e Simpson) do que os animais jovens (BP e BPp), enquanto que dentro do mesmo grupo os índices foram similares (teste t não paramétrico, $p > 0,05$). Isso foi confirmado pela análise de agrupamento (NMDS), que separou as amostras de bezerros e das mães em dois grupos distintos. Estes resultados confirmam que a diversidade ruminal/intestinal nos bovinos aumenta com a idade (Jami *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 2014). Bezerros com um dia de vida ainda não possuem o rúmen desenvolvido (Van Soest, 1994) e a dieta influencia diretamente na composição da microbiota intestinal dos animais nos primeiros dias de vida. O colostro é a principal fonte de nutrientes para o bezerro, o qual possui alto valor nutritivo, sendo rico em proteínas, açúcares e gorduras metabolizados primariamente no abomaso e intestino. Por outro lado, a dieta das vacas pluríparas e primíparas consiste basicamente de compostos fibrosos que são digeridos no rúmen (Kehoe *et al.*, 2007; Jami *et al.*, 2013).

Independente da categoria ou origem de nascimento, as fezes analisadas apresentaram alta diversidade bacteriana (>20 filos distintos), representada nas

pluríparas e primíparas principalmente por bactérias dos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Tenericutes*, enquanto que bezerros apresentaram maior abundância de *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*. A predominância desses filos já foi observada em diversos estudos com recém-nascidos incluindo crianças, potros, suínos e bezerros (Malmuthuge *et al.*, 2013; Oikonomou *et al.*, 2013; Mackenzie *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016). Jami *et al.* (2013) também observaram maiores níveis de *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em bezerros pré-ruminantes com idade de 1-3 dias em amostras de conteúdo ruminal e observaram estabilização da microbiota em animais com 2 anos de idade (adultos), sendo a mesma composta basicamente por *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, como observado para as vacas pluríparas e primíparas no presente trabalho.

Pluríparas e primíparas apresentaram maior abundância de *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* nas amostras de fezes, com abundância relativa semelhante entre as categorias. *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* pertencem à ordem *Clostridiales*, sendo comumente encontradas no intestino de mamíferos com abundâncias de até 30% e 50%, respectivamente. Essas famílias de bactérias estão ligadas diretamente à digestão de alimentos fibrosos e à saúde intestinal, por meio da produção de butirato (Russell e Rychlik, 2001; Biddle *et al.*, 2013). O gênero *Ruminococcus_1*, foi mais abundante (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) em primíparas e pode estar relacionado com o fornecimento de uma dieta mais fibrosa no pré e pós-parto, a qual continha, em média, 10% a mais de volumoso (silagem de milho), quando comparada à dieta fornecida para as vacas pluríparas. O gênero *Ruminococcus* inclui as duas espécies celulolíticas mais importantes observadas no rúmen de animais adultos: a saber, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* (Flint e Bayer, 2008). Além disso, a espécie *Ruminococcus flavefaciens* foi detectada no rúmen dos bezerros com um dia de vida, e sua abundância relativa aumentou até o terceiro dia, o que corrobora com os resultados observados no nosso trabalho. Além disso, o gênero *Ruminococcus* foi observado nas amostras de fezes de bezerro ao primeiro dia, quando o rúmen não é funcional e o animal ainda não ingere alimentos sólidos (Jami *et al.*, 2013).

No presente trabalho, a família *Enterobacteriaceae* foi a mais abundante entre os bezerros de pluríparas e bezerros de primíparas. Os membros da família *Enterobacteriaceae* foram detectados em alta abundância em bezerros saudáveis e em bezerros com diarreia, de fazendas distintas, e embora esse grupo de bactérias esteja relacionado a disbioses intestinais, o manejo realizado na fazenda pode

interferir no aparecimento ou não de diarreia (Gomez *et al.*, 2017). Este fato foi observado no presente trabalho, uma vez que apenas um bezerro (6016) filho da plurípara 1032 foi diagnosticado com diarreia, o que culminou na morte do animal. Portanto, a presença de membros da família *Enterobacteriaceae* pode estar relacionada com a colonização primária do TGI, uma vez que esse grupo é autóctone no intestino de animais adultos e pode ser transmitido aos animais durante o parto.

Dentre os gêneros com abundância relativa > 0,5% em bezerros de pluríparas e primíparas, dois gêneros (*Faecalibacterium* e *Lactobacillus*) apresentaram maior abundância (*White's non-parametric t-test*, $p < 0,05$) nas amostras de bezerros de primíparas quando comparados às pluríparas. Em um estudo realizado com amostras de fezes de bezerros holandeses na época do desmame foi observada maior abundância relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* (única espécie conhecida pertencente a esse gênero) nas duas primeiras semanas de vida dos bezerros, tendo sido relacionada com a diminuição nos índices de diarreia nos animais (Oikonomou *et al.*, 2013). Outros estudos destacam que o uso de *Faecalibacterium* como probiótico para bezerros recém-nascidos é seguro e propiciam melhora na saúde intestinal, no ganho de peso e no crescimentos dos bezerros (Oikonomou *et al.*, 2013; Foditsch *et al.*, 2015).

O gênero *Lactobacillus* possui várias espécies com características probióticas, e a presença desses microrganismos no rúmen também foi relacionada ao maior rendimento de gordura do leite de vacas holandesas (Jami *et al.*, 2014). Estudos anteriores também indicaram que *Lactobacillus* estão entre as espécies que colonizam primariamente o mecônio de bezerros, e que o mecônio possui microbiota semelhante à microbiota fecal desses animais 6 a 12 horas após o nascimento (Mayer *et al.*, 2012). A semelhança entre a microbiota do mecônio e a microbiota fecal diminui nas próximas 24 horas, como reflexo do estabelecimento rápido da microbiota que será semelhante a microbiota do animal adulto. Diante dos resultados observados neste trabalho, os bezerros oriundos de primíparas possuem microbiota diversa e contém microrganismos relacionados à saúde intestinal dos bezerros recém-nascidos. Apesar das vacas primíparas apresentarem colostro de baixa qualidade nutricional (Uetake, 2013), a avaliação da microbiota presente nos BPP sugere que a microbiota presente no colostro das primíparas podem ter efeitos benéficos nos bezerros após o parto, por meio da colonização inicial do TGI contribuindo para o desenvolvimento saudável dos mesmos.

As OTUs compartilhadas por todos os animais avaliados neste estudo, foram classificadas taxonomicamente como *Escherichia-Shigella* (OTU 00001) e *Clostridium_sensu_stricto_1* (OTU 00037 e OTU 00026). A OTU 00001 foi observada em todas as vacas e bezerros, sendo a mais abundante em BP e BPP. Embora as OTUs 00037 e OTU 00026 sejam ambas classificadas como *Clostridium_sensu_stricto_1*, as abundâncias diferem entre vacas e bezerros, e pode estar relacionadas ao período de colonização de bactérias anaeróbias em bezerros, que demanda alguns dias para se estabelecer. O fato dessas OTUs estarem presentes em todos os animais, mesmo em baixa abundância, sugere que possam exercer funções importantes no ambiente intestinal desses animais (Jami e Mizrahi, 2012), sendo alvos potenciais para estudos futuros desse ecossistema.

CONCLUSÕES

A predominância do gênero *Ruminococcus_1* em primíparas, pode estar relacionado ao fornecimento de uma dieta mais fibrosa no período que antecede ao parto, quando comparada à dieta das pluríparas. Pluríparas e primíparas possuem microbiota fecal mais diversa do que bezerros com um dia de vida. As fezes de bezerros originados de primíparas possuem microbiota com maior abundância de *Lactobacillus* e *Faecalibacterium*, as quais estão relacionadas a saúde e ganho de peso dos bezerros.

REFERÊNCIAS

- BIDDLE, A. et al. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in diverse gut communities. **Diversity**, v. 5, n. 3, p. 627-640, 2013.
- BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis Control in Dairy Herds**. Cabi, 2010. ISBN 1845937511.
- COSTA, M. et al. Development of the faecal microbiota in foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, n. 6, p. 681-688, 2016. ISSN 0425-1644.
- DONOVAN, D. et al. Growth and Health of holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or enteroguard1, 2. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 4, p. 947-950, 2002. ISSN 0022-0302.
- EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011. ISSN 1460-2059.
- EDRINGTON, T. et al. Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4519-4525, 2012. ISSN 0022-0302.
- FLINT, H. J.; BAYER, E. A. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 280-288, 2008. ISSN 1749-6632.
- FODITSCH, C. et al. Oral administration of *Faecalibacterium prausnitzii* decreased the incidence of severe diarrhea and related mortality rate and increased weight gain in preweaned dairy heifers. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145485, 2015. ISSN 19326203.
- GOMEZ, D. et al. Characterization of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic dairy calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 31, n. 3, p. 928939, 2017. ISSN 0891-6640.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.; RYAN, P. PAST-Palaeontological statistics. **www.uv.es/~pardomv/pe/2001_1/past/pastprog/past.pdf, acessado em**, v. 25, n. 07, p. 2009, 2001.
- JAMI, E. et al. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME Journal**, v. 7, n. 6, p. 1069, 2013. ISSN 1751-7370.
- JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PloS One**, v. 7, n. 3, p. e33306, 2012. ISSN 1932-6203.
- 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, n.

1, p. e85423, 2014. ISSN 1932-6203.

KEHOE, S.; JAYARAO, B.; HEINRICHS, A. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4108-4116, 2007. ISSN 0022-0302.

LIMA, S. F. et al. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 3031-3042, Apr 2017. ISSN 1525-3198 (Electronic) 0022-0302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28161185> >.

MACKENZIE, J. S.; FRIENDSHIP, R. M.; WEESE, J. S. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. **BMC Microbiology**, v. 15, 2015. ISSN 1471-2180.

MAKINO, H. Bifidobacterial strains in the intestines of newborns originate from their mothers. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, p. 18-011, 2018. ISSN 2186-3342.

MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, p. 36, 2015. ISSN 2297-1769.

MALMUTHUGE, N. et al. Effect of calf starter feeding on gut microbial diversity and expression of genes involved in host immune responses and tight junctions in dairy calves during weaning transition. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 3189-3200, 2013. ISSN 0022-0302.

MAYER, M. et al. Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 1-2, p. 179-185, 2012. ISSN 0378-1135.

MEALE, S. J. et al. Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 582, 2016. ISSN 1664-302X.

MINATO, H. et al. Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 447-456, 1992. ISSN 0022-1260.

NASH, A. K. et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 153, 2017. ISSN 2049-2618.

OIKONOMOU, G. et al. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e63157, 2013. ISSN 1932-6203.

PARKS, D. H. et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014. ISSN 1460-2059.

PENG, M.; SALAHEEN, S.; BISWAS, D. Animal Health: Global Antibiotic Issues. **Encyclopedia of Agriculture & Food Systems**, v. 6, p. 346-357, 2014.

PRISM, G. Graphpad software. **San Diego, CA, USA**, 1994.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 590-596, 2012. ISSN 0305-1048.

REY, M. et al. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 245-257, 2014. ISSN 1364-5072.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001. ISSN 0036-8075.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing MOTHUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1501-6, Mar 2005. ISSN 0099-2240 (Print) 0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746353> >.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009. ISSN 0099-2240.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 75, n. 1, p. 165-74, May 2007. ISSN 0175-7598 (Print) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17235560> >.

TANG, R. et al. 16S rRNA gene sequencing reveals altered composition of gut microbiota in individuals with kidney stones. **Urolithiasis**, n. 46, p. 503-514, 2018. ISSN 2194-7228.

TAPIO, I. et al. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 7, 2017. ISSN 2049-1891.

TIMMERMAN, H. et al. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 6, p. 2154-2165, 2005. ISSN 0022-0302.

UETAKE, K. Newborn calf welfare: A review focusing on mortality rates. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 2, p. 101-105, 2013. ISSN 1344-3941.

UNGEMACH, F. R.; MÜLLER-BAHRDT, D.; ABRAHAM, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 33-38, 2006. ISSN 1438-4221.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 1994. ISSN 080142772X.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1- Composição do concentrado fornecido às vacas primíparas durante o pré e pós-parto.

Ingredientes	Dieta	
	Pré-parto (%)	Pós-parto (%)
Farelo de Soja	0,000	70,300
Milho Fubá	57,710	23,340
Calcário	2,720	1,900
Fosfato bicálcio	11,670	1,480
Sal	1,450	0,360
Uréia	24,790	0,000
Sulfato de cobre	0,020	0,000
Bicarbonato de sódio	0,000	1,330
Óxido de magnésio	0,000	0,670
Vitaminas	0,000	0,100
Sulfato de zinco	0,060	0,000
Monensina	0,000	0,270
Flor de enxofre	1,580	0,250
Total	100	100

Tabela S2 - Composição do concentrado fornecido às vacas pluríparas durante o pré e pós-parto

Ingredientes	Dieta	
	Pré-parto (%)	Pós-parto (%)
Farelo de Soja	47,116	47,405
Fubá de Milho	33,654	43,938
Sulfato de Amônio	1,912	0,847
Sal	0,622	1,624
Calcário	7,613	2,712
Fosfato bicálcio	3,049	1,465
Sulfato de magnésio	1,313	0,914
Sulfato de zinco	0,028	0,012
Sulfato de cobre	0,015	0,007
Sulfato de cálcio	1,313	0,677
Iodato de potássio	0,001	0,000
Sulfato de cobalto	0,000	0,000
Selenito de sódio	0,000	0,000
Cloreto de amônio	1,010	0,169
Cloreto de cálcio	1,010	0,000
Cloreto de potássio	0,000	0,061

Óxido de magnésio	0,169	0,000
Cloreto de Magnésio	0,000	1,346
Total	100	100

Tabela S3 – Compartilhamento da microbiota de fezes entre pluríparas, primíparas, BP e BPp após a classificação taxonômica em nível de família.

	Abundância relativa (%)			
	Pluríparas	Primíparas BP	BPp	
<i>Ruminococcaceae</i>	24,887	28,500	9,312	6,222
<i>Lachnospiraceae</i>	17,463	15,402	9,021	8,439
<i>Christensenellaceae</i>	9,448	7,721	1,629	0,877
<i>Family_XIII</i>	4,269	3,271	0,543	0,086
<i>Rikenellaceae</i>	3,804	5,441	1,539	0,653
<i>Mollicutes_RF39_fa</i>	3,750	4,083	0,617	0,303
<i>Peptostreptococcaceae</i>	3,323	3,010	3,637	4,767
<i>Clostridiaceae_1</i>	2,505	2,923	17,357	20,781
<i>Erysipelotrichaceae</i>	2,406	2,150	1,982	1,734
<i>Prevotellaceae</i>	1,961	1,914	2,199	1,506
<i>Bacteroidaceae</i>	1,306	1,567	1,149	1,530
<i>Akkermansiaceae</i>	1,013	0,775	0,468	0,160
<i>Muribaculaceae</i>	0,757	0,758	0,532	0,527
<i>Lactobacillaceae</i>	0,784	0,448	2,258	4,983
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0,758	0,734	0,651	0,762
<i>Atopobiaceae</i>	0,510	0,305	0,429	0,089
<i>Veillonellaceae</i>	0,541	0,275	1,134	0,977
<i>Planococcaceae</i>	0,532	0,554	0,967	0,336
<i>F082</i>	0,360	0,262	0,074	0,071
<i>WCHB1-41_fa</i>	0,364	0,383	0,025	0,086
<i>Corynebacteriaceae</i>	0,340	0,411	0,306	0,464
<i>Eubacteriaceae</i>	0,252	0,219	0,049	0,153
<i>Rhizobiaceae</i>	0,307	0,211	0,286	0,672
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,318	0,182	0,271	0,298
<i>Bacteroidales_RF16_group</i>	0,227	0,274	0,074	0,071

<i>Enterobacteriaceae</i>	0,236	0,288	22,719	22,961
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,169	0,154	0,138	0,456
<i>Acidaminococcaceae</i>	0,154	0,147	0,300	0,524
<i>Nocardiaceae</i>	0,117	0,054	0,074	0,082
<i>JG30-KF-CM45</i>	0,099	0,300	0,049	0,235
<i>Xanthomonadaceae</i>	0,086	0,045	0,538	0,387
<i>Mycobacteriaceae</i>	0,106	0,066	0,049	0,000
<i>Tannerellaceae</i>	0,106	0,145	0,321	0,591

Taxonomia em nível de família

Abundância relativa (%)		
Pluríparas	Primíparas BP	BPp

<i>Streptococcaceae</i>	0,098	0,175	3,154	3,037
<i>Rubinisphaeraceae</i>	0,089	0,014	0,049	0,086
<i>Burkholderiaceae</i>	0,076	0,150	0,444	0,480
<i>Micrococcaceae</i>	0,058	0,085	0,207	0,350
<i>Enterococcaceae</i>	0,071	0,022	2,454	2,687
<i>Devosiaceae</i>	0,079	0,060	0,025	0,342
<i>Moraxellaceae</i>	0,031	0,018	2,480	1,584
<i>Leuconostocaceae</i>	0,041	0,014	0,025	0,086
<i>Weeksellaceae</i>	0,054	0,014	0,158	0,524
<i>Microbacteriaceae</i>	0,023	0,119	0,074	0,082
<i>Rhodobacteraceae</i>	0,041	0,089	0,247	0,082
<i>Glycomycetaceae</i>	0,023	0,054	0,025	0,082
<i>Dietziaceae</i>	0,018	0,014	0,025	0,360
<i>Staphylococcaceae</i>	0,015	0,023	0,271	0,751
Taxonomia em nível de família				

BP: Bezerra de plurípara; **BPp:** Bezerra de primípara

APÊNDICES – CAPÍTULO 3

Tabela 1- Histórico de uso de antibióticos para o tratamento de mastite bovina e de outras doenças nas vacas Pluríparas e primíparas utilizadas neste estudo.

Animal	Data do parto	Mastite	Tratamento (Antibióticos)	Outros	Tratamento
3035(P)	26-04-16	-	-	-	-
2022(M)	27-04-16	20 a 24/04	-	Queda na produção de leite, mastite, febre, respiração abdominal (04/08)	(L) - (CF)
	28-04-16	26/08 a 23/10	(V) - (S) - (C)	-	-
3023(P) 2023(M)	09-05-16			Retenção de placenta (11/05)	(O)
4009(P)	09-05-16	08/07 a 23/08	(B) - (S) - (V) - (B) - (S) - (S) - (V) - (C) - (M)	-	-
1032(M)	15-05-16	10/07 a 15/10	(V) - (S) - (S) - (M) - (V)	Retenção de placenta (15/05), úlcera de sola (13/06)	(O) - (L)
2058(M)	15-05-16	-	-	-	-
4007(P)	18-05-16	29/08 a 07/08	(B) - (S)	Queda na produção de leite, queda no consumo, desidratação severa, apático (09/09),diarreia com sangue (27/09)	(F) - (Ch) - (F)
4004(P)	26-05-16		-	Metrite (29/05),diarreia com sangue (20/09)	(O) - (F)
15(M)	29-06-16	01 a 04/08	(S)	Metrite (11/07)	(L)

Animal **(M)**: plurípara; animal **(P)**: primípara; Tratamentos: **(V)**: Vetmast; **(S)**: Spectramast; **(C)**: Cobactam; **(B)**: Bovigan; **(M)**: Mastijet fort; **(L)**: Lactiofur; **(O)**: Oxitrat; **(F)**: Fortigal; **(Ch)**:Chemiflor; **(CF)**: Ceftiofur.

Tabela 2- Histórico de diagnóstico de doenças e o respectivo tratamento em bezerros.

Animal (Mãe)	Data do parto	Cria	Sintoma e Tratamento
3035(M)			
	26-04-16	6011(M)	-
2022(P)	27-04-16	6012(M)	-
3023(P)	28-04-16	6013(F)	-
2023(M)	09-05-16	6015(M)	-
4009(P)	09-05-16	6014(F)	Pneumonia (29/05) Ceftiofur
1032(M)	15-05-16	6016(M)	Diarreia (†)
2058(M)	15-05-16	6017(F)	-
4007(P)	18-05-16	6019(M)	-
4004(P)	26-05-16	6022(F)	Onfaloflebite (10/06) Florken
15(M)	29-06-16	6025	-

Animal **(M)**: plurípara; animal **(P)**: primípara. Cria **(M)**: macho; cria **(F)**: fêmea. (†) bezerro que veio a óbito.

Tabela 3– Classificação taxonômica de isolados de saliva de Pluríparas, primíparas, BP e BPp após sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S.

Filo	Família	Isolados (gênero)	Nº /Abundância relativa (%)				
			Pluríparas	Primíparas	BP	BPp	Total
Actinobacteria	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	0 (0)	1(3,4)	0 (0)	0 (0)	1 (1,0)
Actinobacteria	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia</i>	0 (0)	1(3,4)	0 (0)	0 (0)	1 (1,0)
Firmicutes	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	1 (6,7)	0 (0)	1(3,4)	0 (0)	2 (1,9)
Firmicutes	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	0 (0)	2 (6,9)	5(17,2)	3 (9,1)	10 (9,5)
Firmicutes	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	7 (46,7)	8 (27,6)	2 (6,9)	8 (9,1)	25 (23,8)
Proteobacteria	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3,0)	1 (1,0)
Proteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	0 (0)	1(3,4)	1(3,4)	1 (3,0)	3 (2,9)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	0 (0)	1(3,4)	1(3,4)	0 (0)	2 (1,9)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	2 (13,3)	2 (6,9)	1(3,4)	3 (9,1)	8 (7,6)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	1 (6,7)	2 (6,9)	10 (34,5)	11 (33,3)	24 (22,9)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiela</i>	1 (6,7)	3 (10,3)	2 (6,9)	1 (3,0)	7 (6,7)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea</i>	0 (0)	1(3,4)	0 (0)	0 (0)	1 (1,0)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i>	0 (0)	5 (17,2)	2 (6,9)	2 (6,1)	9 (8,6)
Proteobacteria	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Shigella</i>	3 (20)	2 (6,9)	3 (10,3)	3 (9,1)	11 (10,5)
		Nº total de isolados	15	29	28	33	105 (100)

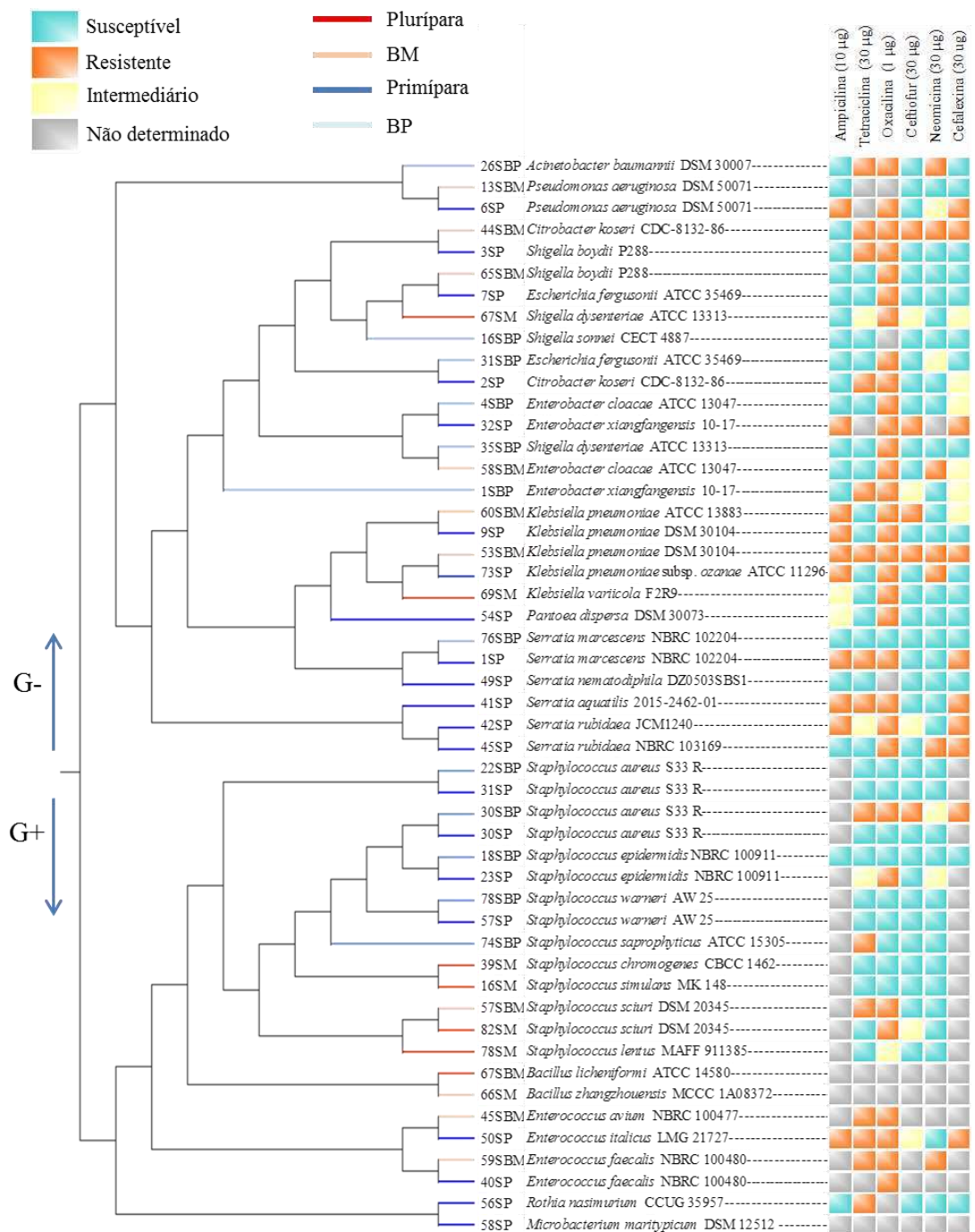


Figura 1 – Árvore filogenética reconstruída com base nas sequências de rRNA 16S dos isolados obtidos das amostras de saliva de Pluríparas (M), primíparas (P), bezerros filhos de Pluríparas (BM) e de bezerros filhos de primíparas (BP), utilizando o método estatístico de Máxima Verossimilhança, baseado no modelo Tamura-Nei pelo método de Bootstrap (10000 interações).

Tabela 4 - Características fenotípicas de isolados obtidos de amostras de saliva de pluríparas e primíparas.

Isolado	Origem	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
SP1	BHI/P3037	Controle	Rosa, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP2	BHI/P3037	Controle	Branca, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP3	M17/M3037	Controle	Branca, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP5	BHI/P3035	10 ⁻³ R ₁	Grande, branca, fosca c/ miolo, borda irregular	Bacilo/G-
SP6	BHI/P3035	10 ⁻³ R ₁	Média, amarelada, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP7	BHI/P3035	10 ⁻³ R ₂	Pequena, translúcida, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP9	BHI/P3035	10 ⁻³ R ₂	Grande, creme, brilhante, circular	Bacilo/G-
SM13	BHI/M2022	10 ⁻³ R ₁	Pequeninha, amarelada, brilhante, circular	Bacilo/G-
SM14	BHI/M2022	10 ⁻³ R ₁	Grande, amarela, brilhante, circular	Bacilo curto/G-
SM15	BHI/M2022	10 ⁻³ R ₂	Muito grande, clara, fosca, sem forma, gelatinosa	Bacilo/G-
SM16	BHI/M2022	10 ⁻³ R ₂	Média, branco leite, brilhante, circular	Cocos/G+
SM18	BHI/M2022	10 ⁻³ R ₂	Pequena, amarelada, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP21	BHI/P3023	10 ⁻³ R ₂	Pequena, translúcida c/ miolo, brilhante, circular	Cocos/G+
SP23	BHI/P3023	10 ⁻³ R ₂	Média, amarelo ouro, brilhante, circular	Cocos/G+
SP26	BHI/P3023	10 ⁻⁴ R ₁	Grande, rosada, brilhante, circular	Bacilo/G-

SP28	BHI/P3023	10 ⁻⁴ R ₂	Pequena, translúcida c/ miolo branco, brilhante, circular	Cocos/G+
SP30	BHI/P3023	10 ⁻⁴ R ₂	Media, branca, fosca, circular	Cocos/G+
SP31	BHI/P3023	10 ⁻⁴ R ₂	Média, Branca c/ miolo, brilhante, borda irregular	Cocos/G+
Isolado	Origem	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
SP32	BHI/P3023	10 ⁻⁵ R ₁	Muito grande, branca, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP34	BHI/P3023	10 ⁻⁵ R ₁	Muito grande, branca, brilhante, circular	Bacilo/G-
SM37	BHI/M2023	10 ⁻² R ₁	Grande, amarelada c/ miolo, brilhante, circular	Bacilo/G-
SM38	BHI/M2023	10 ⁻⁴ R ₁	Média branca, brilhante, circular	Cocos peq./G+
SM39	BHI/M2023	10 ⁻⁴ R ₁	Média branca, brilhante, circular	Cocos/G+
SP40	BHI/P4009	10 ⁻² R ₁	Pequena, branco leite, brilhante, circular	Cocos/G+
SP41	BHI/P4009	10 ⁻² R ₁	Média, rosada c/ borda clara, brilhante, circular	Bacilo curto/G-
SP42	BHI/P4009	10 ⁻² R ₁	Pequeninha, amarelada, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP45	BHI/P4009	10 ⁻² R ₁	Média, rosada c/ borda clara, brilhante, circular	Bacilo/G-
SP48	BHI/P4009	10 ⁻⁴ R ₂	Média, amarela, brilhante, circular	Cocos/G+
SP49	BHI/P4009	10 ⁻⁴ R ₂	branca c/ miolo, fosca, borda irregular	estrep. Cocos/G+
SP50	BHI/P4009	10 ⁻⁴ R ₂	Media, amarelada, brilhante, circular	Cocos/G+
SP53	BHI/P4009	10 ⁻⁴ R ₂	Média, branca, brilhante, circular	Cocos/G+
SP54	BHI/P4009	10 ⁻³ R ₂	Muito grande, rosada, fosca, borda irregular, gelat.	Cocos/G+

SP56	BHI/P2023	10 ⁻³ R ₁	Média, branca c/ miolo “sol”, fosca, borda irregular	Cocos/G+
SP57	BHI/P2023	10 ⁻³ R ₁	Média, alaranjada, brilhante, borda irregular	Cocos/G+
SP58	BHI/P2023	10 ⁻³ R ₁	Pequena, amarelada, brilhante, circular	Cocos/G+
SM62	BHI/M2058	10 ⁻² R ₁	Pequena, amarela, brilhante, circular	Cocos/G+
SM64.1	BHI/M2058	10 ⁻³ R ₁	Grande, creme, fosca, circular	Cocos/ G+
Isolado	Origem	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
SM66	BHI/M2058	10 ⁻³ R ₂	Pequena, branca, fosca, circular	Bacilo/ G+
SM67	BHI/M1032	10 ⁻² R ₁	Média, branca, brilhante, forma irregular	Bacilo/G-
SM69	BHI/M1032	10 ⁻² R ₂	Grande, translúcida, brilhante, forma irregular	Bacilo curto/ G-
SP70	BHI/P4007	10 ⁻³ R ₁	Muito grande, translúcida, fosca, sem forma, gelat.	Bacilo/G-
SP73	BHI/P4007	10 ⁻³ R ₂	Grande, translúcida, fosca, sem forma, gelatinosa	Bacilo curto/G-
SM78	BHI/M015	10 ⁻³ R ₁	Pequena, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
SM79	BHI/M015	10 ⁻³ R ₁	Grande, branca, fosca, forma irregular	Bacilo/G+
SM82	BHI/M015	10 ⁻³ R ₂	Media, creme/amarelada, brilhante, circular	Cocos/G+

Tabela 5 - Características fenotípicas de isolados obtidos de amostras de saliva de bezerros de pluríparas e de bezerros de primíparas.

Isolado	Meio/Animal	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
SBPp1	BHI/BPp6008	Controle	Média, rosa, circular, brilhante	Bacilo/ G-
SBPp2	M17/BPp6008	Controle	Média, rosa, circular, brilhante	Bacilo/ G-
SBPp4	BHI/BPp6011	10-3R1	Média, branca, borda irregular	Bacilo/ G-
SBPp6	BHI/BPp6011	10-3R2	Média, branca, com miolo “sol”, fosca, borda irregular	Bacilo/ G-
SBPp7	BHI/BPp6011	10-3R2	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBPp8	BHI/BPp6011	10-3R2	Pequena, creme, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBP10	BHI/BP6012	10-3R1	Pequena, amarelada, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBP11	BHI/BP6012	10-3R1	Grande, creme, fosca, borda irregular	Bacilo/ G-
SBP13	BHI/BP6012	10-3R2	Grande, creme, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBPP15	BHI/BPp6013	10-3R1	Grande, rosada c/borda translúcida, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBPp16	BHI/BPp6013	10-3R1	Pequena, amarela, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp17	BHI/BPp6013	10-3R2	Média, amarela, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBPp18	BHI/BPp6013	10-3R2	Média, branca, fosca, brilhante	Cocos /G+
SBPp19	BHI/BPp6013	10-3R2	Média, amarela, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp21	BHI/BPp6013	10-3R1	Grande, rosada c/borda translúcida, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp22	BHI/BPp6013	10-3R1	Média, rosada c/borda translúcida, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp23	BHI/BPp6013	10-3R1	Pequeninha, rosada, fosca, circular	Cocos /G+
SBPp24	BHI/BPp6013	10-4R1	Pequena, amarela, fosca, circular	Cocos /G+

SBPp25	BHI/BPp6013	10-4R1	Pequena, amarela,brilhante , circular	Bacilo/ G+
Isolado	Meio/Animal	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
SBPp26	BHI/BPp6013	10-4R1	Pequena, rosada, brilhante, circular	Cocobacilo/ G-
SBPp29	BHI/BPp6013	10-4R2	Media, rosada, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp30	BHI/BPp6013	10-4R2	Pequena, translúcida, fosca, circular	Cocos /G+
SBPp31	BHI/BPp6013	10-4R2	Grande, branca c/ miolo, fosca, circular	Cocos /G+
SBPp32	BHI/BPp6013	10-4R2	Grande, rosada, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp33	BHI/BPp6013	10-5R1	Grande, translúcida em espiral, brilhante, circular	Descartada
SBPp34	BHI/BPp6013	10-5R1	Pequena, rosada, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp35	BHI/BPp6013	10-5R2	Pequena, alaranjada, brilhante, circular	Cocos /G+
SBPp37	BHI/BPp6014	10-5R1	Grande, amarelada c/ halo no meio, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBPp38	BHI/BPp6014	10-5R2	Média, branca, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBPp39	BHI/BPp6014	10-5R2	Média, branca, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBP40	BHI/BP6015	10-2R1	Grande, amarelada, fosca, borda irregular	Bacilo/ G-
SBP43	BHI/BP6015	10-2R1	Média, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
SBP44	BHI/BP6015	10-2R1	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBP45	BHI/BP6015	10-2R1	Média, amarela, brilhante, circular	Cocos /G+
SBP49	BHI/BP6015	10-2R2	Média, branca, brilhante, circular	Cocos/ G+
SBP50	BHI/BP6015	10-2R2	Grande, creme em espiral, brilhante, circular	Bacilo curto/G-

SBP53	BHI/BP6015	10-3R1	Grande, branco leite, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBP54	BHI/BP6015	10-3R1	Media, branca, fosca, circular	Cocos/ G+
SBP56	BHI/BP6015	10-3R2	Pequeninha, branca, brilhante, circular	Bacilo/ G+
SBP57	BHI/BP6016	10-4R2	Pequena, branca, fosca, circular	Cocos grandes/ G+

Isolado	Meio/Animal	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
SBP58	BHI/BP6016	10-4R2	Pequena, creme, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
SBP59	BHI/BP6016	10-3R1	Pequena, branca, fosca, circular	Cocos/ G+
SBP60	BHI/BP6016	10-3R1	Pequena, creme, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
SBP63	BHI/BP6017	10-2R1	Pequena, branca, brilhante, forma irregular	Bacilo curto/ G-
SBP65	BHI/BP6017	10-2R2	Media, creme, brilhante, circular	Bacilo / G-
SBP67	BHI/BP6017	10-3R1	Pequena, branca, fosca, circular	Bacilo/ G+
SBP68	BHI/BP6017	10-3R1	Pequena, branca, fosca, circular	Bacilo/ G-
SBP69	BHI/BP6017	10-3R2	Pequena, branca, fosca, circular	Bacilo/ G-
SBPp71	BHI/BPp6019	10-2R1	Pequena, branca, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
SBPp72	BHI/BPp6019	10-2R2	Pequena, branca, fosca, formato de flor	Bacilo curto/ G-
SBPp73	BHI/BPp6019	10-2R2	Media, translúcida c/ miolo rosa, brilhante, circular	Bacilo curto/ G+
SBPp74	BHI/BPp6019	10-3R1	Muito grande, creme, fosca, forma irregular	Cocos/ G+
SBPp76	BHI/BPp6019	10-3R1	Pequena, amarelada, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBPp77	BHI/BPp6019	10-3R1	Média, branca, brilhante, circular	Bacilo/ G-

SBPp78	BHI/BPp6019	10-3R1	Pequena, branca, fosca, borda irregular	Cocos/ G+
SBP79	BHI/BP6025	10-3R1	Pequena, branca, fosca, circular	Bacilo curto/ G-
SBP80	BHI/BP6025	10-3R1	Pequena, branca, fosca, irregular “flor”	Bacilo curto/ G-
SBP81	BHI/BP6025	10-3R1	Pequena, creme, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
SBP81*	BHI/BP6025	10-3R1	Média, rosada, brilhante, circular	Bacilo/ G+
SBP82	BHI/BP6025	10-3R2	Media, creme, brilhante, circular	Bacilo/ G-
SBP83	BHI/BP6025	10-3R2	Media, amarelada, brilhante, circular	Bacilo curto/ G-
Isolado	Meio/Animal	Diluição	Características culturais	Forma/Gram
SBP84	BHI/BP6025	10-3R2	Media, amarelada, brilhante, circular	Cocos/ G+

BHI; Meio Ágar Infusão Cérebro e Coração; P: primíparas; M: Pluríparas; BP; bezerros nascidos de Pluríparas; BPp: bezerros nascidos de primíparas

Tabela 6 - Características fenotípicas de isolados obtidos de amostras de saliva de Pluríparas e primíparas.

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
1SP	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204 (NR 114043.1)	268 268	99 99	3.00E-131	98
	<i>Serratia marcescens</i> JCM 1239 (NR 113236.1)	268	99	3.00E-131	98
	<i>Serratia marcescens</i> subs. <i>Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)			3.00E-131	98
	<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 (NR 041980.1)	268	99	3.00E-131	98
2SP	<i>Citrobacter koseri</i> CDC-8132-86 (NR 104890.1)	370	100	0	99
3SP	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	616	100	0	99
5SP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	464	100	0	99
6SP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 (NR 117678.1) <i>Pseudomonas</i>	490	100	0	99
	<i>aeruginosa</i> NBRC 12689 (NR 3599.1)	490	100	0	99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 (NR 14471.1)	490	100	0	99
7SP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	454	100	0	99
9SP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104 (NR	627	100	0	99
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinosclenomatis</i> ATCC 13884 (NR	627	100	0	99
	114507.1)	627	100	0	99
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (NR 114506.1)	627	100	0	99
13SM	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinosclenomatis</i> R-70 (NR 037084.1)	627	100	0	99
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1) <i>Shigella</i>	634	100	0	98
	<i>sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	634	100	0	98
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	634	100	0	98
14SM	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1)	336	100	3.00E-166	98
	<i>Citrobacter koseri</i> CDC-8132-86 (NR 104890.1)	336 336	100 100	3.00E-166	98
	<i>Enterobacter hormaechei</i> 0992-77 (NR 042154.1)			3.00E-166	98

	<i>Raoutella planticola</i> JCM 7251 (NR 112011.1)	336	100	3.00E-166	98
15SM	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1) <i>Citrobacter koseri</i> CDC-8132-86 (NR 104890.1)	374 374	99 99	0 0	99 99
	<i>Raoutella planticola</i> JCM 7251 (NR 112011.1)	374	99	0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
16SM	<i>Staphylococcus simulans</i> MK 148 (NR 036906.1)	574	99	0	98
18SM	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	404	100	0	99
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1) <i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel (NR 036904.1)	575	99	0	98
21SP	<i>Staphylococcus hominis</i> DM 122 (NR 036956.1)	575	99	0	98
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1) <i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel (NR 036904.1)	848	100	0	99
23SP		848	100	0	99
26SP	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	310	85	2.00E-127	98
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1) <i>Staphylococcus epidermidis</i> Fussel (NR 036904.1)	748	99	0	99
28SP		748	99	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	731 731	100 100	0 0	99 99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	731	100	0	99
30SP	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	731	100	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	501 501	100 100	0 0	96 96
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	501	100	0	96
31SP	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)				
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	501	100	0	96
32SP	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1)	529	100	0	100

34SP	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1)	498	100	0	99
37SM	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	312	98	2.00E-153	98
38SM	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	376	100	0	98
39SM	<i>Staphylococcus chromogenes</i> CBCC 1462 (NR 036901.1)	660	100	0	99
40SP	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480 (NR 113901.1)	625	99	0	100
40SP	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (NR 115765.1) <i>Serratia</i>	625 839	99	0 0	100 97
41SP	<i>aquatilis</i> 2015-2462-01 (NR 147771.1)		100		
42SP	<i>Serratia rubidaea</i> JCM 1240 (NR 024644.1)	735	100	0	99
45SP	<i>Serratia rubidaea</i> NBRC 103169 (NR 114232.1)	379	100	0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
45SP	<i>Serratia rubidaea</i> DSM 4480 (NR 114716.1)	379	100	0	99
	<i>Serratia rubidaea</i> JCM 1240 (NR 024644.1)	379	100	0	99
48SP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	604	99	0	98
48SP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Füssel (NR 036904.1)	604	99	0	98
49SP	<i>Serratia nematodiphila</i> DZO503SBS1(NR 044385.1)	564	100	0	98
50SP	<i>Enterococcus italicus</i> LMG 21727 (NR 025625.1)	829	99	0	99
53SP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	426	100	0	98
53SP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Füssel (NR 036904.1)	426	100	0	98
54SP	<i>Pantoea dispersa</i> DSM 30073 (NR 116797.1)	455	100	0	96
56SM	<i>Rothia nasimurium</i> CCUG 35957 (NR 02530.1)	475	100	0	98
57SM	<i>Staphylococcus warneri</i> AW25 (NR 025922.1)	805	100	0	99
58SM	<i>Micobacterium maritypicum</i> DSM 12512 (NR 114986.1)	672	100	0	97
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	796	100	0	99
62SM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Füssel (NR 036904.1)	796	100	0	99
64.1SM	<i>Staphylococcus warneri</i> AW 25 (NR 025922.1)	605	100	0	98

66SM	<i>Bacillus zhanghouensis</i> MCCC 1AO8372 (NR 148786.1)	601	100	0	99
	<i>Bacillus pumilus</i> NBRC 12092 (NR 112637.1)	601	100	0	99
67SM	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313 (NR 026332.1)	474	99	0	99
69SM	<i>Klebsiella variicola</i> F2R9 (NR 025635.1)	430	100	0	99
70SP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104 (NR	648	100	0	99
70SP	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinosclenomatis</i> ATCC 13884 (NR 114507.1)	648	100	0	99
	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Rhinosclenomatis</i> R-70 (NR 037084.1)	648	100	0	99
73SP	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae</i> ATCC 11296 (NR	627	99	0	99
78SM	<i>Sthaphylococcus lentus</i> MAFF 911385 (NR 043418.1)	535	100	0	96
82SM	<i>Sthaphylococcus sciuri</i> DSM 20345 (NR 025520.1)	485	100	0	96

Tabela 7 - Comparação das sequências do rRNA 16S das culturas dos isolados bacterianos obtidas de amostras de saliva de bezerros de Pluríparas e de bezerros de primíparas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
	<i>Enterobacter Xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1)	373	99	1,00E-175	97
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	373	100	1,00E-175	96
1SBPp	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	373	100	1,00E-175	96
	<i>Citrobacter Koseri</i> CDC-8132-86 (NR 104890.1)	373	99	1,00E-175	97
	<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	373	100	1,00E-175	96
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1) <i>Shigella</i>	587	100	0	98
2SBPp	<i>sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	587	100	0	98
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	587	100	0	98
	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 (NR 118568.1)	300	100	2,00E-154	99
	<i>Enterobacter Xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1)	300	100	2,00E-154	99
4SBPp	<i>Enterobacter hormaechei</i> 0992-77 (NR 042154.1)	300	100	2,00E-154	99

	<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	300	100	2,00E-154	99
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 027549.1)	300	100	2,00E-154	99
6SBPp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 (NR 117678.1) <i>Pseudomonas</i>	290	100	1,00E-141	98
	<i>aeruginosa</i> NBRC 12689 (NR 3599.1)	290	100	1,00E-141	98
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 (NR 14471.1)	290	100	1,00E-141	98
7SBPp	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	592	100	0	98
8SBPp	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313 (NR 026332.1)	503	99	0	98
10SBp	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	769	99	0	99
11SBPM	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1) <i>Shigella</i>	642	100	0	98
	<i>sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	642	100	0	98
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	642	100	0	98
13SB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 (NR 117678.1) <i>Pseudomonas</i>	530	100	0	99
	<i>aeruginosa</i> NBRC 12689 (NR 3599.1)	530	100	0	99
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 (NR 14471.1)	530	100	0	99
15SBPP	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480 (NR 113901.1)	431	100	0	97
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (NR 115765.1)	431	100	0	97
16SBPP	<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	725	100	0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 027549.1)	725	100	0	99
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	725	100	0	99
17SBPP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 027549.1) <i>Shigella</i>	661	100	0	99
	<i>dysenteriae</i> ATCC 13313 (NR 026332.1)	661	100	0	99

18SBPP	<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC 100911 (NR 3958.1)	753	99	0	99
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Füssel (NR 036904.1)	753	99	0	99
19SBPP	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480 (NR 113901.1)	618	100	0	99
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (NR 115765.1)	618	100	0	99
21SBPP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	477	98	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	765	99	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	765	99	0	99
22SBPP	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	765	99	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	765	99	0	99
23SBPP	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	489	100	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	489	100	0	98
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	489	100	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	489	100	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	489	100	0	98
24SBPP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (NR 114506.1)	636	100	0	97
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1) <i>Shigella</i>	723	99	0	98
25SBPP	<i>sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	723	99	0	98
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	723	99	0	98
26SBPP	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007 (NR 117677.1) <i>Acinetobacter</i>	608	100	0	99
	<i>baumannii</i> ATCC 19606 (NR 117620.1)	608	100	0	99
	<i>Acinetobacter baumannii</i> JCM 6841 (NR 113237.1)	608	100	0	99
	<i>Acinetobacter baumannii</i> CIP 70.34 (NR 116845.1)	608	100	0	99
	<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007 (NR 026206.1)	608	100	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	419	99	0	98
29SBPP	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	419	99	0	98
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	419	99	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	419	99	0	98

ID	30SBPP Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	663	100	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	663	100	0	99
	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	663	100	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	663	100	0	99
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	802	100	0	99
31SBPP	<i>Shigella sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	802	100	0	99
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	802	100	0	99
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1) <i>Shigella</i>	557	100	0	97
32SBPP	<i>sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	557	100	0	97
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	557	100	0	97
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	442	100	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	442	100	0	98
34SBPP	<i>Staphylococcus aureus subs.anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	442	100	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	442	100	0	98
35SBPP	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313 (NR 026332.1)	652	99	0	99
	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480 (NR 113901.1)	651	100	0	99
37SBPP	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (NR 115765.1)	651	100	0	99
38SBPP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	820	99	0	98
39SBPP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	397	100	0	96
40SBP	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	654	100	0	98
	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480 (NR 113901.1)	651	100	0	99
43SBP	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (NR 115765.1)	651	100	0	99
	<i>Citrobacter koseri</i> CDC-8132-86 (NR 104890.1) <i>Raoutella</i>	314	92	5,00E-150	99
44SBP	<i>planticola</i> JCM 7251 (NR 112011.1)	314	92	5,00E-150	99
	<i>Enterococcus avium</i> NBRC 100477 (NR 113899.1) <i>Enterococcus</i>	656	100	0	99
45SBP	<i>avium</i> ATCC 14025 (NR 115763.1)	656	100	0	99
	<i>Enterococcus avium</i> E6844 (NR 028748.1)	656	100	0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Idetidade (%)
50SB	<i>Escherichia faroutonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	466	98	98	0
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	466	98	98	0
53SB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104 (NR 026331.1)	657	100	100	0

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. rhinosclenomatis</i> ATCC 13884 (NR	657	100	0	98
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (NR114506.1)	657	100	0	97
	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. Rhinosclenomatis</i> R-70 (NR	657	100	0	97
54SBP	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480 (NR 113901.1)	582	100	0	99
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (NR 115765.1)	582	100	0	99
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1) <i>Shigella</i>	578	100	0	98
56SBP	<i>sonnei</i> CECT 4887 (NR 104826.1)	578	100	0	98
	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903 (NR 026331.1)	578	100	0	98
57SBP	<i>Staphylococcus sciuri</i> DSM 20345 (NR 025520.1)	606	100	0	99
58SBP	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 (NR 118568.1)	356	92	5,00E-170	99
	<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC 100480 (NR 113901.1)	648	100	0	99
59SBP	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 (NR 115765.1)	648	100	0	99
60SBP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (NR 114506.1)	581	100	0	98
63SBP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	422	100	0	99
65SBP	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	624	99	0	99
67SBP	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 (NR 074923.1)	534	99	0	99
68SBP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR074902.1)	673	100	0	99
69SBP	<i>Shigella boydii</i> P288 (NR 104901.1)	504	99	0	99
71SBPP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	438	100	0	99
72SBPP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	627	100	0	99
	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204 (NR 114043.1)	598	100	0	96
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZO503SBS1(NR 044385.1)	598	100	0	96
73SBPP	<i>Serratia marcescens subs. Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)	598	100	0	96
	<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 (NR 041980.1)	598	100	0	96

77SBPP	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> 10-17 (NR 126208.1)	326	100	3,00E-152	96
78SBPP	<i>Staphylococcus warneri</i> AW25 (NR 025922.1)	822	99	0	99
79SBP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	499	100	0	99
80SBP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	524	100	0	99
81SBP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	374	100	0	99
ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	e-value	Identidade (%)
	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204 (NR 114043.1)	657	100	0	98
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZO503SBS1(NR 044385.1)	657	100	0	98
81*SBP	<i>Serratia marcescens</i> subs. <i>Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)	657	100	0	98
	<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 (NR 041980.1)	657	100	0	98
	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204 (NR 114043.1)	527	100	0	99
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZO503SBS1(NR 044385.1)	527	100	0	99
82SBP	<i>Serratia marcescens</i> subs. <i>Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)	527	100	0	99
	<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 (NR 041980.1)	527	100	0	99
83SBP	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 (NR 074902.1)	493	100	0	99
	<i>Staphylococcus aureus</i> S33 (NR 037007.2)	814	99	0	98
84SBP	<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 (NR 113956.1)	814	99	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> subs. <i>anaerobius</i> MVF-7 (NR 036828.1)	814	99	0	98
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600 (NR 115606.1)	814	99	0	98
74SBPP	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i> ATCC 15305 (NR 074999.2)	823	100	0	99
	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204 (NR 114043.1)	617	100	0	99
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZO503SBS1(NR 044385.1)	617	100	0	99
76SBPP	<i>Serratia marcescens</i> subs. <i>Sakuenses</i> KRED (NR 036886.1)	617	100	0	99
	<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121 (NR 041980.1)	617	100	0	99

ID	Descrição do correspondente mais próximo pelo Blast (NCBI)	Tamanho (pb)	Cobertura (%) <i>e-value</i>	Identidade (%)
----	--	--------------	------------------------------	----------------

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O colostro de primíparas e pluríparas difere na abundância relativa dos filotipos observados e fatores como dieta e número de partos podem interferir na microbiota desses animais, além de fatores como manejo e utilização de antibióticos. As OTUs OTU00101 (*Brevundimonas*) e OTU00094 (*Prevotella_1*) podem ser utilizadas como espécies indicadoras do colostro de animais primíparas e pluríparas, respectivamente. Embora ocorra alta abundância de microrganismos anaeróbios nas amostras de colostro e sua abundância aumente à medida que aumenta o número de lactações, outros estudos serão necessários para confirmar se esses grupos tem origem por meio de uma via enteromamária ou se sua abundância é estritamente relacionada à composição do colostro e do leite desses animais ao longo da lactação.

A microbiota das fezes dos animais adultos (Pluríparas e primíparas) são distintas da microbiota fecal dos animais recém-nascidos (Bezerros de Multíparas e Bezerros de Primíparas) com um dia de vida, entretanto, possuem microbiota fecal muito semelhantes entre si. A principal diferença na microbiota fecal dos animais adultos se deve a maior abundância do gênero *Ruminococcus_1* em primíparas, que pode estar relacionado ao fornecimento de uma dieta com teores mais elevados de fibra quando comparado às Pluríparas. Os bezerros filhos de primíparas possuem maior abundância (teste t, $p < 0,05$) de *Lactobacillus* e *Faecalibacterium*, que são relacionados com o melhor desenvolvimento do TGI e maior desempenho dos bezerros. Estes resultados sugerem que a variação existente na microbiota fecal e do colostro de Pluríparas e primíparas podem influenciar diretamente na colonização do TGI de bezerros após o parto, afetando o desempenho e estado de saúde desses animais.

