MARCELO NAGEM VALÉRIO DE OLIVEIRA

MICROBIOMA NO TRATO GASTROINTESTINAL DE BOVINO DA RAÇA NELORE

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
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T
O48m
2013

Oliveira, Marcelo Nagem Valério de, 1984-
Microbioma no trato gastrointestinal de bovino da raça Nelore / Marcelo Nagem Valério de Oliveira. – Viçosa, MG, 2013.
ix, 80f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Texto em português e inglês
Orientador: Célia Alencar de Moraes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Nelore (Zebu). 2. Sistema gastrointestinal. 3. Microorganismos - Ecologia. 4. Sequenciamento de nucleotídeo. 5. Bactéria. 6. Fungos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 636.291

MARCELO NAGEM VALÉRIO DE OLIVEIRA

MICROBIOMA NO TRATO GASTROINTESTINAL DE BOVINO DA RAÇA NELORE

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: 14 de março de 2013.

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Coorientador)

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)

Prof. Helson Mário Martins do Vale

Dr. João Cruz Reis Filho

Prof[a]. Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

A Deus.

À minha esposa, Lívia.

Aos meus amados pais, Paulo e Rita.

BIOGRAFIA

MARCELO NAGEM VALÉRIO DE OLIVEIRA, filho de Paulo Valério de Oliveira e Rita de Cássia Nagem Oliveira, nasceu na cidade de Manhumirim – MG, no dia 06 de novembro de 1984.

Em março de 2003, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa – MG, e, em agosto de 2007, graduou-se em Ciências Biológicas. Em julho de 2009 obteve o título *Magister Scientiae* em Microbiologia Agrícola. Em agosto de 2009 ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da tese de doutorado em março de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma maneira, estiveram ao meu lado durante esses quatro anos de doutorado, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço a todos pelas orientações, pelas amizades, pelo companheirismo, pela ajuda nos experimentos e na redação de artigos, bem como pelos conselhos críticos construtivos, que muito ajudaram em minha formação. Sou especialmente grato a Deus, à minha esposa Lívia e à minha família, por me apoiarem sempre, principalmente nos momentos de dificuldades.

Agradeço às agências governamentais CAPES e CNPq pelo apoio financeiro, em forma de bolsas, concedido durante o meu doutorado.

ÍNDICE

RESUMO

OLIVEIRA, Marcelo Nagem Valério de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Microbioma no trato gastrointestinal de bovino da raça Nelore**. Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Coorientadores: Arnaldo Chaer Borges e Marcos Rogério Tótola.

O avanço no desenvolvimento de tecnologias moleculares tem sustentado o surgimento de novas linhas de pesquisas, dentre as quais o estudo de microbiomas associados ao trato gastrointestinal (TGI) de animais. Este trabalho representa o primeiro estudo da microbiota associada ao TGI de um bovino da raça Nelore (*Bos indicus*), a qual representa até 70 % do rebanho no Brasil. No presente trabalho foi desenvolvida e testada uma estratégia de amostragem do TGI que possibilitou a identificação da existência de variações nas comunidades microbianas das regiões anatômicas ao longo do mesmo, as quais podem ser detectadas até entre segmentos adjacentes, como nas amostras do intestino delgado e intestino grosso. Tais diferenças residem na estrutura e densidade das comunidades microbianas presentes no lúmen e naquelas associadas à mucosa do epitélio do trato gastrointestinal. Utilizando-se de metodologias moleculares como PCR-DGGE, sequenciamento e RT-PCR para a caracterização das populações de Archaea, Bacteria e Fungi, em amostras do lúmen e da mucosa das nove regiões anatômicas dos quatro segmentos, demonstrou-se que a segregação das populações entre as amostras ocorre para todos os grupos microbianos. Os dados do sequenciamento em grande escala do rRNA 16S bacteriano propiciaram a caracterização das comunidades bacterianas do lúmen e a demonstração da dominância de sequências relacionadas aos filos Firmicutes e Bacteroidetes em todas as amostras, constatando-se grande variação em nível de família dentro desses filos. Ao mesmo tempo, com o pirossequenciamento comprovou-se que as predições sobre microbiotas de outras regiões anatômicas dos segmentos do TGI não devem ser realizadas somente com base em dados oriundos das amostras de rúmen ou de fezes, elas induzem a erros . Esses resultados são da maior relevância quando se considera que a diversidade microbiana, sua funcionalidade e as interações estão diretamente associadas à saúde do animal e não têm sido investigadas nos estudos de microbiologia do TGI em bovinos. Os resultados obtidos neste trabalho representam a primeira caracterização do microbioma associado ao TGI de bovino. Com base nos trabalhos que se seguiram aos da caracterização de microbiomas em humanos, antecipa-se a relevância dos dados para os estudos da nutrição e dos distintos sistemas de manejo, considerando as interações genoma-microbioma

do TGI em distintos sistemas de manejo do rebanho de Nelore com o objetivo de se obter maior produtividade do animal e a necessidade de reduzir a pressão por incorporação de novas áreas para a produção animal no Brasil.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Marcelo Nagem Valério de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013. **The Nelore cattle gastrointestinal tract microbiome**. Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-advisers: Arnaldo Chaer Borges and Marcos Rogério Tótola.

The development of new molecular technologies has supported new researches on microbiome of the gastrointestinal tract (GIT) in animals. This work is the first study of associated-microbiota in the GIT of a Brazilian Nelore steer (*Bos indicus*), which represents over 70 % of the bovine herds in Brazil. A new sampling strategy was developed and allowed the identification of differences in microbial communities along anatomic regions of the GIT, which can be detected even among adjacent segments, as in samples from small and large intestines, and these differences reside in density and structure of communities in the lumen and those mucosa-associated. The characterization of luminal and mucosa-associated microbial populations by PCR-DGGE, sequencing, and RT-PCR demonstrated a segregation of bacterial, archaeal, and fungal populations among sample locations. Pyrosequencing of the bacterial 16S rRNA in the lumen showed the dominance of sequences related to the phyla Firmicutes and Bacteroidetes in all samples, but a remarkable variation at the family level. Pyrosequencing also suggested that ruminal and fecal microbial communities are not effective proxies for documenting the microbiota found in other sections of the GIT. These results are relevant considering that the microbial diversity and its functionality are involved in host health, but they have not been assessed in microbiological studies of the GIT in bovines. Based in human microbiome studies it is possible to anticipate the relevance of data here presented to studies of animal nutrition, by associating microbiome data with management systems in order to increase animal yield and concomitantly to reduce the pressure for incorporation of new areas for beef production systems in Brazil.

INTRODUÇÃO GERAL

O início do século 21 foi marcado pela divulgação simultânea das sequências completas dos dois primeiros genomas humanos sequenciados, em 2001. Mais do que fornecer informações sobre a sequência de nucleotídeos mostraram que a complexidade de processos que acontecem no corpo do ser humano não poderia ser explicada somente pelo conhecimento do seu genoma, conclusão que culminou com o redirecionamento dos estudos para os micro-organismos associados, especialmente, aos do trato gastrointestinal.

As tecnologias de sequenciamento em grande escala, que começaram a ser desenvolvidas durante os projetos de sequenciamento do genoma humano, são amplamente utilizadas em estudos de ecologia microbiana para a caracterização estrutural e funcional da microbiota em vários ambientes. A possibilidade de acessar comunidades microbianas de maneira rápida e completa, a custo relativamente baixo, alavancaram os estudos de microbiomas de animais com a ênfase no estabelecimento de relações positivas ou negativas entre micro-organismo e hospedeiro.

Grande parte dos estudos de microbiomas em animais utiliza a caracterização da microbiota em fezes como estratégia de avaliação do trato gastrointestinal (TGI). Em bovinos, particularmente, além de amostras de fezes existe grande interesse no conhecimento das comunidades microbianas presentes no rúmen desses animais, onde as diversidades microbianas e metabólicas resultam na conversão do material celulósico ingerido em ácidos orgânicos voláteis. Referidos ácidos são absorvidos pelo epitélio ruminal e metabolizados como fonte de carbono e energia no organismo do animal.

As interações que ocorrem no TGI de vertebrados são, do ponto de vista da evolução biológica, consideradas como conservadas e resultantes de diversificação no curso da evolução. Elas moldaram os hábitos alimentares e também a anatomia dos animais. Desse modo, a evolução de regiões anatomicamente distintas do TGI, com funções específicas e o dinamismo das interações biológicas existentes, resultou em implicações diretas nos fenótipos dos animais. A compreensão dessas interações requer, primariamente, o conhecimento da composição da microbiota ao longo de todo o TGI, em cada uma das regiões anatomicamente distintas, bem como as suas funcionalidades. A extrapolação de informações obtidas pela caracterização da microbiota em fezes e rumem, como estratégia de avaliação do TGI de ruminantes, deve ser revisitada e reavaliada, pelo que já se conhece dos estudos do TGI de humanos, principalmente.

Em bovinos, o TGI é composto por nove segmentos anatômicos em quatro regiões distintas, a saber: 1. pré-estômago, constituído por rúmen, retículo e omaso; 2. estômago, pelo abomaso; 3. intestino delgado, integrado por duodeno, jejuno e íleo; 4. intestino grosso, composto por ceco e cólon. As fezes normalmente são consideradas como amostras do trato intestinal distal desses animais.

Os dados sobre o microbioma dos segmentos do TGI de humanos estão disponíveis em bancos de dados de acesso livre e estão sendo analisados quanto às interações, funcionalidades metabólicas no hospedeiro e relacionamento com a saúde do homem. Já com ruminantes, especialmente com bovinos, a pesquisa em bancos de dados sobre a microbiota do TGI mostra a concentração de trabalhos sobre a microbiota em rúmen e em amostras do trato intestinal distal desses animais, as fezes. Assim, o teste da hipótese de que a composição da comunidade microbiana é também variável nas nove regiões anatômicas do TGI de bovinos da raça Nelore deverá contribuir para avanços científicos na área de saúde do animal e também na eficiência dos sistemas de manejo dos animais.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as comunidades microbianas ao longo de todo o trato gastrointestinal de um bovino da raça Nelore (*Bos indicus*) e estabelecer a estratégia de amostragem que permita identificar as variações entre as diferentes regiões anatômicas do TGI. O objeto de estudo foi um animal da raça Nelore com (48 meses) de idade, cedido por uma fazenda comercial do município de Uberaba, Minas Gerais, local tradicionalmente reconhecido pela excelência em programas de melhoramento dessa raça. A escolha da raça Nelore deveu-se à sua importância para a agropecuária brasileira e mundial, uma vez que representa até 70 % do rebanho de bovinos no Brasil. Os resultados ampliam os conhecimentos de ecologia microbiana no TGI de bovinos bem como ressaltam a importância do procedimento de amostragem para abranger toda a microbiota associada às segmentos anatômicos das regiões do TGI do nelore.

O primeiro capítulo desta tese é uma revisão de literatura abordando as tecnologias de sequenciamento em grande escala em estudos de microbiomas. O segundo capítulo é um artigo da caracterização da comunidade microbioma no trato gastrointestinal de um bovino da raça Nelore usando a técnica de pirossequenciamento. O terceiro e último capítulo da tese é a caracterização das comunidades de Archaea, Bacteria e Fungi em amostras do lúmen e da mucosa do TGI do animal.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SEQUENCIAMENTO EM GRANDE ESCALA

E O ESTUDO DE MICROBIOMAS

Sequenciamento em grande escala e o estudo de Microbiomas

Metagenômica e tecnologias de sequenciamento em grande escala

O surgimento de tecnologias analíticas moleculares e de novas ferramentas de análise de dados tem propiciado o estudo de antigos problemas de natureza biológica com abordagens inovadoras e reveladoras das novas dimensões do conhecimento dos sistemas biológicos na Terra. De certa forma, pode ser feita a analogia com o significado atribuído ao termo “future shock” em 1970 pelo sociólogo e futurista Alvin Toffler em seu livro “Future Shock”, ou seja, “muita mudança em pouco tempo”. Esse termo aplica-se perfeitamente à Ecologia Microbiana, uma área da ciência que começou a sofrer profundas modificações com os trabalhos de Carl Woese e seus orientados a partir também da década de 70, com a descoberta de novas formas de vida e do uso do rRNA 16S em estudos de diversidade microbiana, especialmente de micro-organismos ainda não cultivados (Woese & Fox, 1977, DeLong, 1992).

Estudos metagenômicos, iniciados no final da década de 80, consistem em acessar as populações microbianas nos diferentes ecossistemas por meio da extração de DNA diretamente da amostra ambiental, sem a necessidade de se cultivarem os micro-organismos. A possibilidade de se estudarem todos os genomas, eliminando a etapa prévia de cultivo microbiano em laboratório, é a grande vantagem desta abordagem, que começou a ser usada para investigar a diversidade microbiana a partir do sequenciamento de cópias do rRNA 16S extraídas e amplificadas de amostras do solo (Pace et al., 1985) e oceano (DeLong, 1992). O desenvolvimento de vetores específicos (Rondon et al., 2000) para clonagem de DNA metagenômico facilitou a caracterização funcional dos genes presentes em uma amostra por meio da construção de grandes bibliotecas metagenômicas e associação a métodos adequados de *screening* dos produtos de interesse.

Bibliotecas metagenômicas podem ser estudadas utilizando-se de duas estratégias distintas, a análise baseada na função ou baseada em sequências de nucleotídeos. A primeira consiste na identificação de clones que expressam um fenótipo desejado, ela permite rápida identificação de produtos de interesse biotecnológico, mas é limitada pela necessidade de que todo o conjunto gênico necessário à expressão da função de interesse esteja presente em um único clone, além da susceptibilidade da expressão gênica às condições experimentais (Schloss & Handelsman, 2003). O método de *screening* baseado em sequências de nucleotídeos envolve o desenho de sondas de DNA ou *primers*, os quais são derivados de regiões conservadas de genes ou famílias de proteínas conhecidas (Simon & Daniel, 2011).

A metagenômica surgiu como uma maneira de se buscar na natureza genes de interesse biotecnológico, especialmente os genes codificadores de enzimas com aplicações industriais, como celulases (Ferrer et al., 2005, Kim et al., 2011, Nacke et al., 2012), lipases (Henne et al., 2000,) e quitinases (Cottrell et al., 1999) dentre outras (Lorenz & Eck, 2005, Kennedy et al., 2011). Entretanto, os estudos metagenômicos transformaram os estudos pontuais de ecologia microbiana em trabalhos complexos e de investigação simultânea das funções e dos indivíduos presentes no ambiente (Handelsman et al., 1998, Tyson et al., 2004, Dinsdale et al., 2008, Jones et al., 2008, Culligan et al., 2012).

O desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento em grande escala, como as das plataformas 454/Roche (Margulies et al., 2005), Life/APG (Valouev et al., 2008), Illumina/Solexa(Bentley et al., 2008), Helicos Bioscience (Harris et al., 2008), Pacific Bioscience (Eid et al., 2009) e o IonTorrent (www.iontorrent.com) revolucionou a metagenômica e os estudos de diversidade em sistemas complexos (DeLong, 2009, Delmont et al., 2011, Rademacher et al., 2012, Steven et al., 2012), por gerar grande quantidade de dados e induzir o desenvolvimento acelerado da bioinformática para a integração e interpretação dos dados (Raes & Bork, 2008). Independentemente da plataforma, milhões de reações de sequenciamento são conduzidas simultaneamente em uma única placa de sequenciamento, gerando enorme quantidade de dados. Cada tecnologia possui vantagens e desvantagens, e a escolha é dependente da aplicação.

A transição entre o método de sequenciamento de Sanger, considerado de primeira geração, e os utilizados nas novas gerações de sequenciadores começou em 2005, com o lançamento do sequenciador 454 pela empresa Roche, que em sua primeira versão era capaz de sequenciar até 25 milhões de pares de base com 99 % de acurácia em uma corrida de 4 horas (Margulies et al., 2005). O mecanismo de sequenciamento do 454/Roche foi desenvolvido a partir da adaptação de protocolo de pirossequenciamento (Nyren et al., 1993) para ser utilizado em escala de picolitros, que é a escala de volume de cada poço no qual acontece uma das milhões de reações simultâneas de sequenciamento em uma lâmina construída a partir de bloco de fibra ótica (Margulies et al., 2005).

As novas tecnologias de sequenciamento são compostas por etapas de preparação do DNA molde, sequenciamento, visualização e análise dos dados. A química de sequenciamento do 454/Roche (Margulies et al., 2005) inicia-se com a ligação de adaptadores às extremidades das moléculas de DNA molde, as quais podem ser produtos de PCR, quando o rRNA 16S é usado, ou pequenos fragmentos de DNA metagenômico. Após a ligação dos adaptadores, o DNA é separado em fitas simples e incorporado em pequenas esferas de sepharose, chamadas *beads*, em condições que favoreçam a ligação de apenas uma molécula de DNA por *bead*. Cada *bead* possui adaptadores complementares aos ligados às moléculas de DNA, e cria um ambiente único, no qual o DNA presente será amplificado por PCR em Emulsão (emPCR) na presença de óleo, polimerases, dNTPs e oligonucleotídeos, constituindo um microrreator. Após a emPCR, cada *bead* estará enriquecida com várias cópias da molécula inicial e estas serão removidas da emulsão por meio de lavagens consecutivas com álcool. A montagem da placa de sequenciamento é feita pela deposição sucessiva de quatro camadas de *beads*, na seguinte ordem de cima para baixo: *beads* contendo enzimas do pirossequenciamento (luciferase e sulfurilase), *beads* contendo o DNA amplificado, beads contendo enzimas do pirossequenciamento, e *beads* contendo a enzima pirofosfatase (PPiase).

Os ciclos de sequenciamento são iniciados com a adição de um nucleotídeo conhecido, por exemplo, citosina. Se este nucleotídeo for incorporado à molécula de DNA em extensão, será liberado o fosfato inorgânico do pirofosfato (PPi), o qual será usado pela sulfurilase para formar ATP, que por sua vez é utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina em oxiluciferina, com emissão de sinal luminoso. A intensidade do sinal gerado é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados à molécula, e essa proporcionalidade é usada pelo aparelho para determinar quantos nucleotídeos foram adicionados. Após a leitura feita pelo aparelho, os nucleotídeos não incorporados são lavados e os ciclos prosseguem, sendo adicionados nucleotídeos em uma sequencia conhecida, até que todas as moléculas tenham sido sequenciadas.

A plataforma 454/Roche é muito utilizada em estudos de ecologia microbiana, porém a plataforma Illumina/Solexa é atualmente a mais difundida no meio científico, principalmente por gerar enorme quantidade de dados (aproximadamente 35 Gb de sequências) (Shokralla et al., 2012). Entretanto, as sequências geradas são pequenas, entre 75 e 100pb, o que torna a análise dos dados mais complexa, principalmente no sequenciamento de metagenomas de amostras ambientais, pelo fato de que grande parte dos genes presentes ainda não está representada nos bancos de dados atuais.

A plataforma Illumina/Solexa também requer a ligação de adaptadores e a amplificação do DNA molde antes do sequenciamento, mas neste caso o enriquecimento é feito por amplificação em fase sólida. A placa de sequenciamento é dividida em 100 a 200 milhões de poços nos quais existem sequências complementares aos adaptadores adicionados. Por meio de processo denominado amplificação por ponte, cada parte da placa estará enriquecida com moléculas originadas de apenas uma molécula de DNA fita simples adicionada (Metzker, 2010).

Novas tecnologias de sequenciamento têm sido divulgadas desde 2011, como o Ion Torrent (Life Technologies). Esse sequenciador possui mecanismo de funcionamento semelhante ao sequenciador 454, mas, ao contrário deste, pode-se dizer que o Ion Torrent funciona como um sofisticado pHmetro: quando nucleotídeos são incorporados em uma cadeia crescente de DNA, prótons são liberados e alteram o potencial elétrico do micropoço onde a polimerização está ocorrendo. Esta variação é detectada por sensores e transmitida para o computador, que a reconhece como a incorporação de um nucleotídeo. Como a detecção é feita por meio de sensores, o Ion Torrent não requer câmeras sofisticadas para visualização da liberação de fluorescência durante a incorporação de nucleotídeos, contribuindo para a redução do custo do equipamento e do sequenciamento. Esta é uma tecnologia recém-lançada, mas que tem potencial para ser popularizada no meio científico.

O surgimento das novas tecnologias de sequenciamento em 2005 foi acompanhado por desafios como os de melhorar a qualidade dos dados gerados, reduzir o custo e o tempo de execução do sequenciamento, além de desenvolver tecnologias que diminuam os erros incorporados durantes as etapas de amplificação que precedem a etapa de sequenciamento (Mardis, 2008). A combinação de protocolos específicos em cada plataforma durante as etapas de preparação do DNA para sequenciamento determina o tipo de dado produzido (Metzeker, 2010).

Dentre as peculiaridades de cada técnica encontra-se a do tamanho da sequência gerada durante o sequenciamento, que pode variar de 30 pb na plataforma Life/APG, até mais que 1500 pb na Pacific Biosciences (Shokralla et al., 2012). As empresas desenvolvedoras das plataformas de sequenciamento estão em corrida contínua em busca de protocolos e equipamentos capazes de gerar sequências cada vez maiores, em menor tempo e com menor custo. Em 2005, a primeira versão do 454/Roche gerava fragmentos de 100pb e em 2013 a empresa anunciou que seu equipamento, o GS FLX + System, é capaz de produzir sequências com mais de 1000pb. De maneira similar, o sequenciador Illumina com o HiSeq 2500 saltou de 35pb para 150pb em 2012.

As empresas atualmente procuram desenvolver tecnologias que, além de gerar fragmentos de sequências de maior tamanho, tenham custos de aquisição e manutenção do sequenciador acessíveis a pequenos laboratórios. Neste sentido, já oferecem no mercado os sequenciadores GS Junior (R454/Roche), MiSeq (Hiseq/Illumina) e o PGM (Ion Torrent), equipamentos que possuem dimensões reduzidas e grande capacidade de geração de dados, e são considerados sequenciadores de bancada.

Em ecologia microbiana, as novas plataformas de sequenciamento são aplicadas na caracterização funcional de um sistema, por meio do sequenciamento e caracterização de bibliotecas metagenômicas construídas em vetores, como fosmídeos (Rondon et al., 2000), ou também pelo sequenciamento “shotgun” do DNA metagenômico. Neste segundo caso, o DNA ambiental é fragmentado, seja por via enzimática ou física, ligado aos adaptadores específicos e sequenciados. Esta estratégia tem sido aplicada com sucesso em estudos de metagenoma de comunidades associadas às porções fibrosas do rúmen (Brulc et al., 2009) e também de comunidades do intestino de humanos (Gill et al., 2006) e outros animais (Hildebrand et al., 2012).

Além da caracterização funcional, o sequenciamento em grande escala de genes como o rRNA 16S de bactérias e arqueas e o da região ITS do rRNA de fungos extraídos diretamente das amostras tem se mostrado como uma eficiente ferramenta para caracterizar uma amostra, bem como para se avaliar o efeito de tratamentos em um determinado sistema (Durso et al., 2012, Huttenhower et al., 2012, Oliveira et al., 2013). O aprimoramento dessa técnica, pela utilização de sequências nucleotídicas específicas que permitem o sequenciamento de diferentes amostras em uma única corrida, está contribuindo para a redução de custos e popularização do uso em estudos de diversidade (Parameswaran et al., 2007, Quince et al., 2009).

O sequenciamento utilizando código de barras (*barcoding*) consiste na inserção de uma sequência específica de nucleotídeos entre o adaptador e o primer utilizado, a qual será usada para identificar a origem de cada sequência após o sequenciamento. Em teoria, não há limite para o número de amostras possíveis de serem analisadas simultaneamente, mas quanto maior o número de amostras menor será o número de sequências por amostra. Assim, a comparação de comunidades microbianas em diferentes ambientes utilizando o sequenciador Illumina gerou cerca de três milhões de sequências por amostra, porém, o mesmo relacionamento entre elas poderia ser identificado com o número mínimo de 2000 *reads* (sequências) por amostra, o que abre a possibilidade de milhares de amostras serem sequenciadas simultaneamente para se compararem comunidades microbianas (Caporaso et al., 2011).

A comparação de diferentes sequenciadores tem mostrado que a frequência de alguns erros está associada à tecnologia. Por exemplo, a frequência de erros dos sequenciadores Roche 454 é maior em regiões de homopolímeros (Metzker, 2010), causado pelo acúmulo de variação na intensidade do sinal de luz emitido, além de ter maior incidência de sequências resultantes de amplificações artificiais durante a PCR em emulsão (Gomez-Alvarez et al., 2009). Ao contrário, o sequenciador Illumina não compartilha tais erros, mas apresenta variação na qualidade das sequências de acordo com a região da placa (Dolan & Denver, 2008), além de uma menor qualidade de sequenciamento na extremidade 3’ da sequência quando comparada com a extremidade 5’ (Schroder et al., 2010).

Independentemente da plataforma utilizada, as novas tecnologias de sequenciamento possibilitaram importantes avanços na ciência, pois permitem obter informações de maneira rápida e precisa para responder a inúmeras questões científicas, incluindo o efeito da associação com micro-organismos no fenótipo de mamíferos.

Estudos de microbiomas

As interações entre formas de vida multicelulares e comunidades microbianas começaram a se estabelecer há mais de um bilhão de anos, e provavelmente moldaram também a evolução dos vertebrados (Ley et al., 2008). Hoje, o resultado dessa co-evolução é perceptível pelos efeitos da microbiota no hospedeiro, que podem variar da diferenciação de estruturas e funções no intestino, da modulação do sistema imune até o metabolismo de energia do hospedeiro (Ley et al., 2008, Roesch et al., 2009, Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010).

A divulgação do genoma humano em 2000 mostrou que, para se entender toda a diversidade genética e fisiológica humana, seria preciso estudar os micro-organismos que habitam o corpo humano interna e externamente, os quais superam o número de células somáticas por um fator de 10 (Turnbaugh et al., 2007). Ao conjunto de micro-organismos e de seus genomas correspondentes, foi dado o nome de Microbioma, e diversos projetos foram iniciados, como o “The Human Microbiome Project” (Turnbaugh et al., 2007) e o denominado “Metagenomics of the Human Intestinal Tract” (“MetaHIT”) - http://www.metahit.eu/), posteriormente reunidos no “International Human Microbiome Consortium” (http://www.human-microbiome.org).

Um dos primeiros trabalhos sobre microbiomas associou a microbiota no intestino à obesidade como resultado da prevalência de micro-organismos com grande capacidade de aproveitar a energia disponível na alimentação (Ley et al., 2005, Turnbaugh et al., 2006). Atualmente, várias doenças possuem estreita relação com variações na microbiota, como psoríase (Gao et al., 2008), esofagite (Islami & Kamangar, 2008, Yang et al., 2012), asma (Blaser et al., 2008), inflamação do intestino (Greenblum et al., 2012), carcinoma colorretal (Castellarin et al., 2012), doenças cardiovasculares (Howitt & Garrett, 2012), entre outras.

O estabelecimento de associações entre microbiota e condições de saúde de humanos é um processo complexo. Por isso, um grande esforço tem sido feito para se criar bancos de dados com informações sobre a diversidade microbiana e também a diversidade funcional das comunidades presentes nos diversos locais do corpo. Em 2010, o sequenciamento do DNA metagenômico de amostras de origem intestinal de indivíduos doentes e saudáveis mostrou a existência de um grupo de organismos e genes presentes em todos os indivíduos. A quantidade de sequências geradas foi equivalente a de genoma de aproximadamente 1000 espécies bacterianas e possibilitou a determinação do metagenoma intestinal mínimo necessário para sustentar a vida microbiana no intestino (Qin et al., 2010). Embora exista um microbioma considerado como central (*core microbiome*) para um determinado local do corpo, a amostragem de diferentes locais em 242 indivíduos saudáveis mostrou que nenhuma das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) se encontrava presente em todos os locais amostrados Demonstrou-se ainda que a variação da microbiota em um indivíduo ao longo do tempo é menor do que a variação existente entre outros indivíduos, fato interpretado como uma característica associada ao microbioma de pessoas saudáveis (Huttenhower et al., 2012). A variação observada na estrutura da comunidade microbiana contrasta com a estabilidade das vias metabólicas codificadas pelos genes microbianos (Huttenhower et al., 2012).

Simultaneamente aos estudos associando microbiota a doenças, estão sendo desenvolvidos e aprimorados protocolos de amostragem e softwares para o processamento e análise de dados com o intuito de se padronizarem as pesquisas e os dados gerados por todos os centros de pesquisa envolvidos no projeto Microbioma Humano (Aagaard et al., 2012, Gevers et al., 2012). Outras áreas de atuação do projeto do microbioma humano incluem o desenvolvimento de tecnologias e ferramentas para se isolar e sequenciar o genoma de organismos ainda não cultivados, bem como avaliar implicações éticas, legais e sociais na pesquisa de microbiomas em humanos (Methe et al., 2012). Embora sejam grandes os avanços do conhecimento na Biologia, na era metagenômica existem limitações na anotação das sequências, uma vez que a maior parte dos organismos não é cultivável. Portanto, um dos objetivos do projeto do microbioma humano é gerar um enorme catálogo de genomas de espécies cultiváveis. Em 2010 foi publicada a anotação dos primeiros 178 genomas sequenciados de bactérias residentes no intestino humano (Nelson et al., 2010) e cerca de outros 800 genomas estão sendo sequenciados (Methe et al., 2012).

A expansão rápida do conhecimento da diversidade gênica e microbiana não resulta, porém, na elucidação completa dos processos nos quais os micro-organismos estão envolvidos. O conhecimento da estrutura da comunidade microbiana e de como esta se mantém é importante para futuras aplicações da medicina baseadas no controle da microbiota, o que também dependerá de informações sobre a influência de características ambientais e genéticas do hospedeiro na modulação da microbiota (Spor et al., 2011). Atualmente, alguns estudos visando à identificação de genes envolvidos em doenças humanas têm, simultaneamente, investigado o efeito da presença ou da ausência dos genes na microbiota, sendo a maioria dos genes relacionados ao sistema imune (Salzman et al., 2010, Hooper et al., 2012) e ao metabolismo (Zhang et al., 2010, Murphy et al., 2013).

A diversidade da microbiota e a ampla faixa de interações existentes no intestino humano são obstáculos a serem superados para o completo entendimento deste ecossistema. O sucesso de estudos de biologia de ecossistemas depende da geração de dados em três importantes aspectos do sistema: lista das partes; conectividade entre as partes e; adequação da conectividade no contexto de tempo e espaço (Raes & Bork, 2008).

A geração de dados por tecnologias meta-ômicas de *high-throughput*, como metagenômica (Nelson et al., 2010, Aagaard et al., 2012), metatranscriptômica (Turnbaugh et al., 2010, Zoetendal et al., 2012), metaproteômica (Verberkmoes et al., 2009) e metabolômica (Zhao et al., 2012) estão gerando quantidades enormes de dados e contribuindo com informações sobre as partes. A reconstrução de vias metabólicas em escala genômica é feita pela reunião de todos as informações armazenadas em bancos de dados, como o KEGG (www.genome.jp/kegg/), Brenda (www.brenda-enzymes.info/), BioCYC (http://biocyc.org/) e TransporteDB (http://www.membranetransport.org/) e posterior combinação dos dados com modelos matemáticos, com o objetivo de elucidar processos em sistemas complexos (Karlsson et al., 2011). Por fim, a determinação da variação do modelo, ou dos modelos construídos, em escala espacial e temporal, permite prever o comportamento do sistema em diferentes condições, por meio de um modelo de estudo em 4D (Bork & Serrano, 2005, Raes & Bork, 2008).

O reconhecimento da participação do microbioma na saúde humana justifica o crescente número de estudos nessa área, mas a participação de micro-organismos em simbioses com vertebrados é ampla e recentes pesquisas têm modificado os horizontes nessa área. Por exemplo, por meio da combinação de análises de carboidratos, metagenômicas e sequenciamento de genomas (Suen et al., 2010), ficou demonstrado que o jardim de fungos de formigas cortadeiras não é colonizado apenas por uma espécie de fungo, e sim por uma diversa comunidade bacteriana com alta capacidade de degradação de celulose. Esta descoberta acrescenta novos componentes dessa interação, aproximando-a, por convergência evolutiva, de outras, como aquelas presentes em outro animal herbívoro, o boi.

As formigas não são as únicas beneficiárias da capacidade degradativa da microbiota residente. Outras interações, de particular importância, são aquelas em que a microbiota do trato gastrointestinal (TGI) exerce a função de quebra de compostos não digeríveis pelo hospedeiro, como são os casos dos cupins e dos bovinos. No primeiro, a análise metagenômica da comunidade bacteriana residente no intestino identificou um grande e diverso conjunto de genes bacterianos em populações do gênero *Nasutitermes* envolvidos na degradação da celulose e de xilanas, além de ter contribuído com informações inéditas sobre outras funções atribuídas à interação (Warnecke et al., 2007). O metaproteoma do intestino dessa espécie identificou 197 proteínas com funções conhecidas, dentre as quais, a atividade de ferrodoxina oxidorredutase foi a mais redundante e ressaltou a importância da geração de piruvato a acetato como importante fonte de geração de ATP para a microbiota intestinal (Burnum et al., 2011).

O reconhecimento da importância das interações entre microbiota e hospedeiro no TGI associada à popularização de técnicas avançadas, especialmente de sequenciamento de *amplicons* e de metagenomas, são fatores que influenciaram a expansão dos estudos de microbiomas em outros seres, como por exemplo, suínos (Looft et al., 2012), equinos (Dougal et al., 2012, Shepherd et al., 2012), carrapatos (Andreotti et al., 2011), felinos (Tun et al., 2012), cães (Suchodolski et al., 2012), camelos (Bhatt et al., 2013), pássaros (Waite et al., 2012) e ostras (King et al., 2012). A quantidade de dados gerados e a diversidade de sistemas investigados com certeza irão contribuir para um melhor entendimento do TGI e das relações ali estabelecidas, com ênfase em como e quando a saúde e o metabolismo do hospedeiro são afetados pelos micro-organismos associados.

Microbioma no trato gastrointestinal de bovinos

Em bovinos, assim como em outros ruminantes, os micro-organismos residentes do trato gastrointestinal (TGI) são vitais, participando de importantes processos de degradação de material lignocelulósico ingerido pelo animal e da consequente produção de ácidos orgânicos voláteis, como acetato, butirato e propionato, os quais são absorvidos pelo animal (Flint, 1997). Em bovinos, o rúmen representa de 64 a 71 % do volume do TGI e de 9 a 13 % do volume corpóreo (Flint, 1997) e suporta uma microbiota numerosa e complexa, superior a 10^{10} células, dominada por anaeróbios obrigatórios. O reconhecimento da essencialidade das reações conduzidas pela microbiota ruminal a tornou o alvo central de estudos, principalmente pela possibilidade de manipulação, por meio da dieta, de reações grupo-específicas, para aumentar a produção animal (Russell & Rychlik, 2001).

O rúmen abriga um dos mais acessíveis e o mais bem compreendido ecossistema microbiano. O conhecimento desse ambiente e das interações nele existentes têm elucidado inúmeros processos que ocorrem durante o funcionamento desse sistema. O principal foco dos estudos de microbiomas em bovinos é a investigação do comportamento da microbiota ruminal em resposta a diferentes práticas de alimentação (Tajima et al., 2001, Belenguer et al., 2010, Callaway et al., 2010, Pitta et al., 2010, Rice et al., 2012). Em todas as práticas de manejo, a comunidade microbiana do rúmen é dominada por membros dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, sendo as famílias mais representativas a Lachnospiraceae e Ruminococcaceae (Firmicutes), e Prevotellaceae e Rikenellaceae (Bacteroidetes). Membros destes dois filos participam ativamente do processo de degradação de celulose, juntamente com a bactéria *Fibrobacter succinogenes* (Filo Fibrobacter), promovendo a quebra das moléculas de celulose e a liberação de açúcares fermentáveis que são convertidos em ácidos orgânicos voláteis, os quais serão absorvidos pelo epitélio ruminal (Russell & Rychlik, 2001).

Embora as populações do rúmen sejam dominadas por membros de dois filos, a estrutura e a composição das comunidades podem ser bastante variáveis, mesmo quando os animais estão sob a mesma prática de alimentação (Welkie et al., 2010). Recente comparação da comunidade microbiana em amostras de rúmen de 16 vacas lactantes (Jami & Mizrahi, 2012) mostrou que 50 % de todas as Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) detectadas foram encontradas somente entre 0 % e 30 % dos animais estudados, o que contribuiu para a variação das comunidades entre os animais. Entretanto, quando a filogenia de cada UTO foi considerada nas análises, o nível de similaridade entre as comunidades aumentou, mostrando que, embora constituídas por diferentes populações, elas são relacionadas filogeneticamente e, possivelmente, possuam características fisiológicas similares que possibilitam a ocupação de nichos similares.

O objetivo de parte dos trabalhos de microbioma do rúmen é o de caracterizar as possíveis mudanças na estrutura da comunidade com vistas à redução da ocorrência de distúrbios digestivos que levam à acidose do líquido ruminal e o desenvolvimento de processos inflamatórios que, quando prolongados, reduzem a eficiência da produção de leite (Zebeli & Metzler-Zebeli, 2012). A recuperação de açúcares fermentáveis nas fezes de ruminantes mostra que a eficiência degradativa no rúmen pode ser melhorada. O desenvolvimento de novas estratégias de estudo, e também de tecnologias em grande escala, irão representar importante avanço no entendimento da ecologia do sistema ruminal para culminar no aumento da eficiência dos sistemas produtivos (Krause et al., 2003).

O rúmen também é alvo de estudos de prospecção por novos genes, especialmente aqueles que codificam enzimas envolvidas na degradação de celulose (Brulc et al., 2009, Hess et al., 2011, Del Pozo et al., 2012, Gong et al., 2012, Kong et al., 2012). A compreensão destes processos degradativos no rúmen, associada à descoberta de genes de organismos ainda não cultiváveis, terá impacto no desenvolvimento e aperfeiçoamento de processos biotecnológicos em biorrefinarias com uso de consórcios ou coquetéis de enzimas disponíveis comercialmente para produção de etanol e outros produtos derivados de materiais lignocelulósicos (Del Pozo et al., 2012, Yue et al., 2013).

A importância do rúmen no metabolismo animal é reconhecida e o grande número de trabalhos publicados tem mostrado que este é um ambiente complexo e sujeito às flutuações oriundas de fatores ambientais e do manejo. Porém, o trato gastrointestinal de bovinos não se restringe a esta câmara fermentativa, uma vez que juntamente com o omaso e o retículo formam o pré-estômago do animal, seguido pelo abomaso e pelos intestinos delgado e grosso (Russell & Rychlik, 2001). O surgimento e a manutenção de estruturas da magnitude dos intestinos em bovinos sugerem que as mesmas possuem funções consideráveis no corpo do animal, as quais não se limitam à condução dos resíduos alimentares ao reto. Considerando-se o importante papel da microbiota intestinal em vertebrados, como o demonstrado para os humanos, a presença de populações microbianas ativas no intestino de bovinos possivelmente tem implicações de importância funcional até então negligenciada pelo direcionamento dos estudos para a microbiota do rúmen.

Grande parte dos trabalhos que abordam a microbiota pós ruminal no TGI de ruminantes (Durso et al., 2010, Shanks et al., 2011, Durso et al., 2012) investiga amostras fecais, as quais são relevantes quando se considera que são fontes de contaminação de alimentos e do ambiente. Também o entendimento da estrutura microbiana nas fezes pode ser relevante para o monitoramento do efeito de diferentes práticas de alimentação (Rice et al., 2012). Durante o trânsito da digesta do rúmen até as fezes, ocorrem mudanças significativas na comunidade microbiana quando o material passa de um segmento do TGI para o outro, como foi demonstrado por T-RFLP e PCR em Tempo Real em amostras do rúmen, duodeno, íleo e fezes (Frey et al., 2010). A segregação existente entre os diferentes segmentos também foi observada quando se comparam as comunidades microbianas presentes no lúmen do TGI e aquelas associadas à mucosa do tecido intestinal (Malmuthuge et al., 2012). Estes estudos foram importantes por demonstrarem a existência de variações das comunidades microbianas ao longo do TGI, mas não forneceram a visão detalhada de quais membros da microbiota respondiam pelas diferenças nos diferentes compartimentos e não investigaram a comunidade em todos os segmentos do TGI de um bovino.

Em 2013 foi publicado o primeiro trabalho utilizando tecnologias de sequenciamento em grande escala a contemplar a variação na comunidade microbiana em todos os segmentos do TGI de um boi da raça Nelore, oriundo do Brasil (Oliveira et al., 2013). Neste trabalho foi empregada uma exaustiva estratégia de amostragem do TGI, incluindo a coleta de amostras do rúmen (porções sólida e líquida), retículo, omaso, abomaso, duodeno, jejuno, íleo, ceco, cólon e fezes, além de amostras do material usado para alimentar o animal, capim e silagem de milho. Os resultados mostraram que, embora a comunidade ao longo do TGI seja dominada por membros dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, existem grandes variações na abundância desses filos entre as amostras, principalmente quando se considera a dominância de membros do filo Firmicutes nas amostras do intestino delgado e do intestino grosso e, ao contrário, o domínio nas amostras dos estômagos do animal de populações do filo Bacteroidetes. Além da alternância entre as populações, também foi demonstrada grande variação intra-individual, uma vez que somente 40 UTOs foram compartilhadas entre amostras de rúmen, fezes e intestino delgado, uma mostra de que a avaliação da microbiota no rúmen ou nas fezes não pode ser extrapolada para outros segmentos. A variação da comunidade microbiana dos segmentos distintos do TGI, e também a sua localização no segmento, possivelmente conferem papel funcional às interações que as tornam relevantes para a saúde animal.

Os microbiomas dos animais de pecuária, que compreendem todos os genomas e genes encontrados nos membros das microbiotas a eles associadas, representam a nova fronteira do conhecimento a ser explorada na produção animal no Brasil. O domínio do conhecimento dessas interações no Nelore brasileiro, base da cadeia produtiva da pecuária de corte e que constitui cerca de 70 % do rebanho bovino brasileiro (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012), deverá suportar o desenvolvimento de novas tecnologias para o manejo e nutrição dos animais, que traduzam os pressupostos da produtividade em sistema de produção sustentável e ambientalmente saudável. A conclusão do sequenciamento do genoma do Nelore foi divulgada em 2012 (Canavez et al., 2012) e propiciou a construção de um importante banco de dados para uso em estudos de melhoria da qualidade do rebanho nelore no Brasil. No futuro, o relacionamento das informações sobre o genoma do animal e seu microbioma será importante para a compreensão e definição das tecnologias adequadas ao manejo e maior produtividade do rebanho. Portanto, antecipa-se que a ênfase dos estudos sobre o gado Nelore e o seu microbioma estará centrada em um primeiro momento na saúde e eficiência nutricional e alimentar do animal nos distintos sistemas de produção da pecuária de corte utilizados no Brasil.

A pecuária de corte no Brasil é uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro e contribui de forma expressiva para com a segurança alimentar e geração de empregos e renda. Os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística para o ano safra de 2011/2012 é de uma produção total de carne bovina superior a 30 milhões de cabeças de gado para abate, das quais 22 % a 25 % foram destinadas ao mercado externo que movimentaram quase seis bilhões de dólares em 2012 (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior). Entretanto, o Relatório da FAO/ONU de 2009 estima que a demanda por proteína animal no mundo deverá dobrar até 2050, sinalizando novas oportunidades para a pecuária de corte no Brasil. Esse cenário demanda avanços tecnológicos para mitigar as pressões sobre o meio ambiente.

A complexidade da microbiota do trato gastrointestinal de bovinos e o conhecimento limitado dos micro-organismos presentes, especialmente no intestino delgado e grosso, dificultam a caracterização da diversidade e das atividades e contribuições da microbiota na saúde e na produtividade do animal, mas este cenário tende a alterar-se à medida que novas interações entre microbiota e o hospedeiro sejam descobertas.

Referência

Aagaard, K., J. Petrosino, W. Keitel, M. Watson, J. Katancik, N. Garcia, S. Patel, M. Cutting, T. Madden, H. Hamilton, E. Harris, D. Gevers, G. Simone, P. McInnes & J. Versalovic. 2012. The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. FASEB J.

Andreotti, R., A. A. Perez de Leon, S. E. Dowd, F. D. Guerrero, K. G. Bendele & G. A. Scoles. 2011. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus through tag-encoded pyrosequencing. BMC Microbiol 11(1):6.

Belenguer, A., P. G. Toral, P. Frutos & G. Hervas. 2010. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. J Dairy Sci 93(7):3275-3286.

Bentley, D. R. and S. Balasubramanian and H. P. Swerdlow et. al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature 456(7218):53-59.

Bhatt, V. D., S. S. Dande, N. V. Patil & C. G. Joshi. 2013. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). Mol Biol Rep. *Epub ahead of print*.

Blaser, M. J., Y. Chen & J. Reibman. 2008. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? Gut 57(5):561-567.

Bork, P. & L. Serrano. 2005. Towards cellular systems in 4D. Cell 121(4):507-509.

Brulc, J. M., D. A. Antonopoulos, M. E. Miller, M. K. Wilson, A. C. Yannarell, E. A. Dinsdale, R. E. Edwards, E. D. Frank, J. B. Emerson, P. Wacklin, P. M. Coutinho, B. Henrissat, K. E. Nelson & B. A. White. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. Proc Natl Acad Sci U S A 106(6):1948-1953.

Burnum, K. E., S. J. Callister, C. D. Nicora, S. O. Purvine, P. Hugenholtz, F. Warnecke, R. H. Scheffrahn, R. D. Smith & M. S. Lipton. 2011. Proteome insights into the symbiotic relationship between a captive colony of *Nasutitermes corniger* and its hindgut microbiome. Isme J 5(1):161-164.

Callaway, T., S. Dowd, T. Edrington, R. Anderson, N. Krueger, N. Bauer, P. Kononoff & D. Nisbet. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. J Anim Sci 88(12):3977-3983.

Canavez, F. C., D. D. Luche, P. Stothard, K. R. Leite, J. M. Sousa-Canavez, G. Plastow, J. Meidanis, M. A. Souza, P. Feijao, S. S. Moore & L. H. Camara-Lopes. 2012. Genome Sequence and Assembly of *Bos indicus*. J Hered 103:342-348.

Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer & R. Knight. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci USA 108:4516-4522.

Castellarin, M., R. L. Warren, J. D. Freeman, L. Dreolini, M. Krzywinski, J. Strauss, R. Barnes, P. Watson, E. Allen-Vercoe, R. A. Moore & R. A. Holt. 2012. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res 22(2):299-306.

Cerf-Bensussan, N. & V. Gaboriau-Routhiau. 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? Nat Rev Immunol 10(10):735-744.

Cottrell, M. T., J. A. Moore & D. L. Kirchman. 1999. Chitinases from uncultured marine microorganisms. Appl Environ Microbiol 65(6):2553-2557.

Culligan, E. P., R. D. Sleator, J. R. Marchesi & C. Hill. 2012. Functional metagenomics reveals novel salt tolerance loci from the human gut microbiome. ISME J 6(10):1916-1925.

Del Pozo, M. V., L. Fernandez-Arrojo, J. Gil-Martinez, A. Montesinos, T. N. Chernikova, T. Y. Nechitaylo, A. Waliszek, M. Tortajada, A. Rojas, S. A. Huws, O. V. Golyshina, C. J. Newbold, J. Polaina, M. Ferrer & P. N. Golyshin. 2012. Microbial beta-glucosidases from cow rumen metagenome enhance the saccharification of lignocellulose in combination with commercial cellulase cocktail. Biotechnol Biofuels 5(1):73.

Delmont, T. O., P. Robe, S. Cecillon, I. M. Clark, F. Constancias, P. Simonet, P. R. Hirsch & T. M. Vogel. 2011. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. Appl Environ Microbiol 77(4):1315-1324.

DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. Proc Natl Acad Sci U S A 89(12):5685-5689.

DeLong, E. F. 2009. The microbial ocean from genomes to biomes. Nature 459(7244):200-206.

Dinsdale, E. A., R. A. Edwards, D. Hall, F. Angly, M. Breitbart, J. M. Brulc, M. Furlan, C. Desnues, M. Haynes, L. Li, L. McDaniel, M. A. Moran, K. E. Nelson, C. Nilsson, R. Olson, J. Paul, B. R. Brito, Y. Ruan, B. K. Swan, R. Stevens, D. L. Valentine, R. V. Thurber, L. Wegley, B. A. White & F. Rohwer. 2008. Functional metagenomic profiling of nine biomes. Nature 452(7187):629-632.

Dolan, P. C. & D. R. Denver. 2008. TileQC: A system for tile-based quality control of Solexa data. Bmc Bioinformatics 9.

Dougal, K., P. A. Harris, A. Edwards, J. A. Pachebat, T. M. Blackmore, H. J. Worgan & C. J. Newbold. 2012. A comparison of the microbiome and the metabolome of different regions of the equine hindgut. FEMS Microbiol Ecol 82(3):642-652.

Durso, L. M., G. P. Harhay, T. P. Smith, J. L. Bono, T. Z. Desantis, D. M. Harhay, G. L. Andersen, J. E. Keen, W. W. Laegreid & M. L. Clawson. 2010. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. Appl Environ Microb 76(14):4858-4862.

Durso, L. M., J. E. Wells, G. P. Harhay, W. C. Rice, L. Kuehn, J. L. Bono, S. Shackelford, T. Wheeler & T. P. L. Smith. 2012. Comparison of bacterial communities in faeces of beef cattle fed diets containing corn and wet distillers' grain with solubles. Let Appl Microbiol 55(2):109-114.

Eid, J., A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. Dewinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach & S. Turner. 2009. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. Science 323(5910):133-138.

Ferrer, M., O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, D. Reyes-Duarte, V. A. Santos, C. Strompl, K. Elborough, G. Jarvis, A. Neef, M. M. Yakimov, K. N. Timmis & P. N. Golyshin. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. Environ Microbiol 7(12):1996-2010.

Flint, H. 1997. The rumen microbial ecosystem - some recent developments. Trends Microbiol 5(12):483-488.

Frey, J., A. Pell, R. Berthiaume, H. Lapierre, S. Lee, J. Ha, J. Mendell & E. Angert. 2010. Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. J Appl Microbiol 108(6):1982-1993.

Gao, Z., C. H. Tseng, B. E. Strober, Z. H. Pei & M. J. Blaser. 2008. Substantial Alterations of the Cutaneous Bacterial Biota in Psoriatic Lesions. Plos One 3(7).

Gevers, D., M. Pop, P. D. Schloss & C. Huttenhower. 2012. Bioinformatics for the Human Microbiome Project. Plos Comput Biol 8(11):e1002779.

Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett & K. E. Nelson. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science 312(5778):1355-1359.
Gomez-Alvarez, V., T. K. Teal & T. M. Schmidt. 2009. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. Isme J 3(11):1314-1317.
Gong, X., R. J. Gruninger, M. Qi, L. Paterson, R. J. Forster, R. M. Teather & T. A. McAllister. 2012. Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene. Bmc Res Notes 5:566.
Greenblum, S., P. J. Turnbaugh & E. Borenstein. 2012. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. Proc Natl Acad Sci USA 109(2):594-599.
Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy & R. M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem Biol 5(10):R245-249.
Harris, T. D., P. R. Buzby, H. Babcock, E. Beer, J. Bowers, I. Braslavsky, M. Causey, J. Colonell, J. Dimeo, J. W. Efcavitch, E. Giladi, J. Gill, J. Healy, M. Jarosz, D. Lapen, K. Moulton, S. R. Quake, K. Steinmann, E. Thayer, A. Tyurina, R. Ward, H. Weiss & Z. Xie. 2008. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. Science 320(5872):106-109.
Henne, A., R. A. Schmitz, M. Bomeke, G. Gottschalk & R. Daniel. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 66(7):3113-3116.
Hess, M., A. Sczyrba, R. Egan, T. W. Kim, H. Chokhawala, G. Schroth, S. Luo, D. S. Clark, F. Chen, T. Zhang, R. I. Mackie, L. A. Pennacchio, S. G. Tringe, A. Visel, T. Woyke, Z. Wang & E. M. Rubin. 2011. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. Science 331(6016):463-467.
Hildebrand, F., T. Ebersbach, H. B. Nielsen, X. Li, S. B. Sonne, M. Bertalan, P. Dimitrov, L. Madsen, J. Qin, J. Wang, J. Raes, K. Kristiansen & T. R. Licht. 2012. A comparative analysis of the intestinal metagenomes present in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and humans (*Homo sapiens*). Bmc Genomics 13:514.
Hooper, L. V., D. R. Littman & A. J. Macpherson. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. Science 336(6086):1268-1273.
Howitt, M. R. & W. S. Garrett. 2012. A complex microworld in the gut Gut microbiota and cardiovascular disease connectivity. Nat Med 18(8):1188-1189.
Huttenhower, C. & D. Gevers and R. Knight et al and Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 486(7402):207-214.
Islami, F. & F. Kamangar. 2008. *Helicobacter pylori* and Esophageal Cancer Risk: A Meta-analysis. Cancer Prev Res 1(5):329-338.
Jami, E. & I. Mizrahi. 2012. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. Plos One 7(3).
Jones, B. V., M. Begley, C. Hill, C. G. M. Gahan & J. R. Marchesi. 2008. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. Proc Natl Acad Sci USA 105(36):13580-13585.
Karlsson, F. H., I. Nookaew, D. Petranovic & J. Nielsen. 2011. Prospects for systems biology and modeling of the gut microbiome. Trends Biotechnol 29(6):251-258.
Kennedy, J., N. D. O'Leary, G. S. Kiran, J. P. Morrissey, F. O'Gara, J. Selvin & A. D. Dobson. 2011. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. J Appl Microbiol 111(4):787-799.
Kim, D., S. N. Kim, K. S. Baik, S. C. Park, C. H. Lim, J. O. Kim, T. S. Shin, M. J. Oh & C. N. Seong. 2011. Screening and Characterization of a Cellulase Gene from

the Gut Microflora of Abalone Using Metagenomic Library. J Microbiol 49(1):141-145.
King, G. M., C. Judd, C. R. Kuske & C. Smith. 2012. Analysis of Stomach and Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. Plos One 7(12):e51475.
Kong, Y., Y. Xia, R. Seviour, M. He, T. McAllister & R. Forster. 2012. In situ identification of carboxymethyl cellulose-digesting bacteria in the rumen of cattle fed alfalfa or triticale. FEMS Microbiol Ecol 80(1):159-167.
Krause, D. O., S. E. Denman, R. I. Mackie, M. Morrison, A. L. Rae, G. T. Attwood &. S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. Fems Microbiol Rev 27(5):663-693.
Ley, R., C. Lozupone, M. Hamady, R. Knight & J. Gordon. 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. Nat. Rev. Microbiol. 6(10):776-788.
Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight & J. I. Gordon. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci USA 102(31):11070-11075.
Looft, T., T. A. Johnson, H. K. Allen, D. O. Bayles, D. P. Alt, R. D. Stedtfeld, W. J. Sul, T. M. Stedtfeld, B. Chai, J. R. Cole, S. A. Hashsham, J. M. Tiedje & T. B. Stanton. 2012. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proc Natl Acad Sci USA 109(5):1691-1696.
Lorenz, P. & J. Eck. 2005. Metagenomics and industrial applications. Nat Rev Microbiol 3(6):510-516.
Malmuthuge, N., M. Li, Y. Chen, P. Fries, P. J. Griebel, B. Baurhoo, X. Zhao & l. L. Guan. 2012. Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. FEMS Microbiol Ecol 79(2):337-347.
Mardis, E. R. 2008. Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet 9:387-402.
Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley & J. M. Rothberg. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437(7057):376-380.
Methe, B. A. & K. E. Nelson and M. Pop et. al. & Human Microbiome Project Consortium. 2012. A framework for human microbiome research. Nature 486(7402):215-221.
Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 11(1):31-46.
Murphy, E. F., P. D. Cotter, A. Hogan, O. O'Sullivan, A. Joyce, F. Fouhy, S. F. Clarke, T. M. Marques, P. W. O'Toole, C. Stanton, E. M. Quigley, C. Daly, P. R. Ross, R. M. O'Doherty & F. Shanahan. 2013. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. Gut 62(2):220-226.
Nacke, H., M. Engelhaupt, S. Brady, C. Fischer, J. Tautzt & R. Daniel. 2012. Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes. Biotechnol Lett 34(4):663-675.

Nelson, K. E., G. M. Weinstock, S. K. Highlander, K. C. et al. Jumpstart. 2010. A Catalog of Reference Genomes from the Human Microbiome. Science 328(5981):994-999.

Nyren, P., B. Pettersson & M. Uhlen. 1993. Solid-Phase DNA Minisequencing by an Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay. Anal Biochem 208(1):171-175.

Oliveira, M. N. V., Jewell, K., Freitas, F. S., Benjamin, L. A., Totola, M. R., Borges, A. C., Moraes, C. A. & G. Suen. 2013. Characterizing the Microbiota across the Gastrointestinal Tract of a Brazilian Nelore Steer. Veterinary Microbiology *In Press.*

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J. & Olsen, G. J. 1985. Analyzing natural microbial population by ribossomal rRNA sequences. ASM News 51:4-12.

Parameswaran, P., R. Jalili, L. Tao, S. Shokralla, B. Gharizadeh, M. Ronaghi & A. Z. Fire. 2007. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. Nucleic Acids Res 35(19):e130.

Pitta, D. W., E. Pinchak, S. E. Dowd, J. Osterstock, V. Gontcharova, E. Youn, K. Dorton, I. Yoon, B. R. Min, J. D. Fulford, T. A. Wickersham & D. P. Malinowski. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. Microb Ecol 59(3):511-522.

Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Dore, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork & S. D. Ehrlich. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 464(7285):59-65.

Quince, C., A. Lanzen, T. P. Curtis, R. J. Davenport, N. Hall, I. M. Head, L. F. Read & W. T. Sloan. 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. Nat Methods 6(9):639-641.

Rademacher, A., M. Zakrzewski, A. Schluter, M. Schonberg, R. Szczepanowski, A. Goesmann, A. Puhler & M. Klocke. 2012. Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. Fems Microbiol Ecol 79(3):785-799.

Raes, J. & P. Bork. 2008. Molecular eco-systems biology: towards an understanding of community function. Nat Rev Microbiol 6(9):693-699.

Rice, W. C., M. L. Galyean, S. B. Cox, S. E. Dowd & N. A. Cole. 2012. Influence of wet distillers grains diets on beef cattle fecal bacterial community structure. Bmc Microbiol. 12:25.

Roesch, L. F., G. L. Lorca, G. Casella, A. Giongo, A. Naranjo, A. M. Pionzio, N. Li, V. Mai, C. H. Wasserfall, D. Schatz, M. A. Atkinson, J. Neu & E. W. Triplett. 2009. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. Isme J 3(5):536-548.

Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman & R. M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl Environ Microbiol 66(6):2541-2547.

Russell, J. & J. Rychlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. Science 292(5519):1119-1122.

Salzman, N. H., K. Hung, D. Haribhai, H. Chu, J. Karlsson-Sjoberg, E. Amir, P. Teggatz, M. Barman, M. Hayward, D. Eastwood, M. Stoel, Y. Zhou, E. Sodergren, G. M. Weinstock, C. L. Bevins, C. B. Williams & N. A. Bos. 2010.

Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. Nat Immunol 11(1):76-83.
Schloss, P. D. & J. Handelsman. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. Curr Opin Biotechnol 14(3):303-310.
Schroder, J., J. Bailey, T. Conway & J. Zobel. 2010. Reference-Free Validation of Short Read Data. Plos One 5(9).
Shanks, O., C. Kelty, S. Archibeque, M. Jenkins, R. Newton, S. McLellan, S. Huse & M. Sogin. 2011. Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations. Appl Environ Microb 77(9):2992-3001.
Shepherd, M. L., W. S. Swecker, Jr., R. V. Jensen & M. A. Ponder. 2012. Characterization of the fecal bacteria communities of forage-fed horses by pyrosequencing of 16S rRNA V4 gene amplicons. Fems Microbiol Lett 326(1):62-68.
Shokralla, S., J. L. Spall, J. F. Gibson & M. Hajibabaei. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. Mol Ecol 21(8):1794-1805.
Simon, C. & R. Daniel. 2011. Metagenomic analyses: past and future trends. Appl Environ Microbiol 77(4):1153-1161.
Spor, A., O. Koren & R. Ley. 2011. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. Nat Rev Microbiol 9(4):279-290.
Steven, B., L. Gallegos-Graves, S. R. Starkenburg, P. S. Chain & C. R. Kuske. 2012. Targeted and shotgun metagenomic approaches provide different descriptions of dryland soil microbial communities in a manipulated field study. Env Microbiol Rep 4(2):248-256.
Suchodolski, J. S., M. E. Markel, J. F. Garcia-Mazcorro, S. Unterer, R. M. Heilmann, S. E. Dowd, P. Kachroo, I. Ivanov, Y. Minamoto, E. M. Dillman, J. M. Steiner, A. K. Cook & L. Toresson. 2012. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. Plos One 7(12):e51907.
Suen, G., J. J. Scott, F. O. Aylward, S. M. Adams, S. G. Tringe, A. A. Pinto-Tomas, C. E. Foster, M. Pauly, P. J. Weimer, K. W. Barry, L. A. Goodwin, P. Bouffard, L. Li, J. Osterberger, T. T. Harkins, S. C. Slater, T. J. Donohue & C. R. Currie. 2010. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. PLoS Genet 6(9).
Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura & Y. Benno. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl Environ Microbiol 67(6):2766-2774.
Tun, H. M., M. S. Brar, N. Khin, L. Jun, R. K. Hui, S. E. Dowd & F. C. Leung. 2012. Gene-centric metagenomics analysis of feline intestinal microbiome using 454 junior pyrosequencing. J Microbiol Methods 88(3):369-376.
Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight & J. I. Gordon. 2007. The human microbiome project. Nature 449(7164):804-810.
Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis & J. I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444(7122):1027-1031.
Turnbaugh, P. J., C. Quince, J. J. Faith, A. C. McHardy, T. Yatsunenko, F. Niazi, J. Affourtit, M. Egholm, B. Henrissat, R. Knight & J. I. Gordon. 2010. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. Proc Natl Acad Sci USA 107(16):7503-7508.
Tyson, G. W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E. E. Allen, R. J. Ram, P. M. Richardson, V. V. Solovyev, E. M. Rubin, D. S. Rokhsar & J. F. Banfield. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. Nature 428(6978):37-43.
Valouev, A., J. Ichikawa, T. Tonthat, J. Stuart, S. Ranade, H. Peckham, K. Zeng, J. A. Malek, G. Costa, K. McKernan, A. Sidow, A. Fire & S. M. Johnson. 2008. A

high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. Genome Res 18(7):1051-1063.
Verberkmoes, N. C., A. L. Russell, M. Shah, A. Godzik, M. Rosenquist, J. Halfvarson, M. G. Lefsrud, J. Apajalahti, C. Tysk, R. L. Hettich & J. K. Jansson. 2009. Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. Isme J 3(2):179-189.
Waite, D. W., P. Deines & M. W. Taylor. 2012. Gut microbiome of the critically endangered New Zealand parrot, the kakapo (*Strigops habroptilus*). Plos One 7(4):e35803.
Warnecke, F., P. Luginbuhl, N. Ivanova, M. Ghassemian, T. H. Richardson, J. T. Stege, M. Cayouette, A. C. McHardy, G. Djordjevic, N. Aboushadi, R. Sorek, S. G. Tringe, M. Podar, H. G. Martin, V. Kunin, D. Dalevi, J. Madejska, E. Kirton, D. Platt, E. Szeto, A. Salamov, K. Barry, N. Mikhailova, N. C. Kyrpides, E. G. Matson, E. A. Ottesen, X. Zhang, M. Hernandez, C. Murillo, L. G. Acosta, I. Rigoutsos, G. Tamayo, B. D. Green, C. Chang, E. M. Rubin, E. J. Mathur, D. E. Robertson, P. Hugenholtz & J. R. Leadbetter. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. Nature 450(7169):560-565.
Welkie, D. G., D. M. Stevenson & P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. Anaerobe 16(2):94-100.
Woese, C. R & G. E. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA 74(11):5088-5090.
Yang, L. Y., F. Francois & Z. H. Pei. 2012. Molecular Pathways: Pathogenesis and Clinical Implications of Microbiome Alteration in Esophagitis and Barrett Esophagus. Clin Cancer Res 18(8):2138-2144.
Yue, Z. B., W. W. Li & H. Q. Yu. 2013. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol 128:738-744.
Zebeli, Q. & B. U. Metzler-Zebeli. 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. Res Vet Sci 93(3):1099-1108.
Zhang, C., M. Zhang, S. Wang, R. Han, Y. Cao, W. Hua, Y. Mao, X. Zhang, X. Pang, C. Wei, G. Zhao, Y. Chen & L. Zhao. 2010. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. Isme J 4(2):232-241.
Zhao, L., J. K. Nicholson, A. Lu, Z. Wang, H. Tang, E. Holmes, J. Shen, X. Zhang, J. V. Li & J. C. Lindon. 2012. Targeting the human genome-microbiome axis for drug discovery: inspirations from global systems biology and traditional Chinese medicine. J Proteome Res 11(7):3509-3519.
Zoetendal, E. G., J. Raes, B. van den Bogert, M. Arumugam, C. C. Booijink, F. J. Troost, P. Bork, M. Wels, W. M. de Vos & M. Kleerebezem. 2012. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. Isme J 6, 1415-1426.

CAPÍTULO 2[*]

CHARACTERIZING THE MICROBIOTA ACROSS THE GASTROINTESTINAL TRACT OF A BRAZILIAN NELORE STEER

[*]Formatting according to Veterinary Microbiology author guidelines

Characterizing the Microbiota across the Gastrointestinal Tract of a Brazilian Nelore Steer

Marcelo Nagem Valério de Oliveira[a], Kelsea A. Jewell[c], Fernanda S. Freitas[a], Laércio A. Benjamin[b], Marcos R. Tótola[a], Arnaldo C. Borges[a], Célia A. Moraes[a], and Garret Suen[c]

[a] Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Minas Gerais 36570-000, Brazil

[b] Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, Brazil

[c] Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin 53706, United States of America

Corresponding author:

Garret Suen, gsuen@wisc.edu.

4552 Microbial Sciences Building, 1550 Linden Drive. Madison, WI, 53706

Tel.+1(608)890-3971Fax.:+1(608)262-9865

Abstract

The gastrointestinal tracts (GIT) of herbivores harbor dense and diverse microbiota that has beneficial interactions with the host, particularly for agriculturally relevant animals like ruminants such as cattle. When assessing ruminant health, microbiological indicators are often derived from the rumen or feces. However, it is probable that ruminal and fecal microbiota do not reflect the microbial communities within the GIT of ruminants. To test this, we investigated the compartments of the GIT from a Brazilian Nelore steer and performed a 16S rRNA pyrosequencing analysis on the collected samples. Our results showed high intra-individual variation, with samples clustering according to their location in the GIT including the forestomach, small intestine, and large intestine. Although sequences related to the phyla Firmicutes and Bacteroidetes predominated all samples, there was a remarkable variation at the family level. Comparisons between the microbiota in the rumen, feces, and other GIT components showed distinct differences in microbial community. This work is the first comprehensive GIT microbiota analysis for any ruminant and provides a framework for understanding how host microbiota impacts the health of bovines.

Keywords: Microbiome, Bovine, Gastrointestinal Tract, 16S RNA, ruminants, Nelore

1. Introduction

Symbioses that occur in the gastrointestinal tract (GIT) of animals have long been recognized as essential factors in the structural development of this anatomical feature. Importantly, development of the GIT likely facilitated the evolution of the animal lifestyle (Ley et al., 2008), and thus has essential implications for overall animal health. The microbiota in the rumen and feces of ruminants have been used as a diagnostic tool for assessing animal health (Dowd et al., 2008; Lettat et al., 2012; Van Baale et al., 2004; Van Donkersgoed et al., 1999), but the role of microorganisms in other segments of the GIT, such as the small and large intestine, have received little attention.

To address this, we investigated the microbial community across the GIT of the Nelore (*Bos indicus*) breed of cattle, an indicine species that has been genetically improved through selection. This species represents over 72 % of the bovine herds in Brazil and is the top exported beef cattle in the world (United States Department of Agriculture [http://www.usda.org], Ministerio da Agricultura do Brasil [http://www.agricultura.gov.br]). Understanding the structure of the microbial community and the factors that affect microbial assemblage in the GIT of this bovine may be useful for developing new livestock management technologies, particularly in nutrition and sustainability systems.

Here we describe for the first time, the composition and phylogenetic distribution of the microbiota present within the different compartments of the GIT for any ruminant, and in particular, from a Nelore steer from a Brazilian commercial farm. We show that the microbiota across the GIT is localized, with distinct communities in the forestomach, small intestine, and large intestine. Importantly, we show that the microbiota across the GIT is different from that of feces and the rumen. Given the importance of the Nelore breed in global cattle production, this study not only provides the first comprehensive study of the Nelore-associated microbiota, but further increases our understanding of the localization of GIT-associated microbial communities in ruminants.

2. Methods

2.1. Study Animal

A two-year old, healthy, purebred Nelore beef steer, weighting 460 kg, was used in this study. This animal was reared and maintained in Uberaba City, Minas Gerais, Brazil, using standard livestock management practices, which includes pasture feeding followed by a diet of corn silage 40 days before sacrifice. This animal was slaughtered according to institutional animal care guidelines, which includes anesthetization followed by an intramuscular injection of 2 % xylazine chlorhydrate. Euthanasia was performed using 2 % lidocaine injected in the cistern magna.

2.2. Gastrointestinal and feed sampling

Our sampling approach included collecting luminal contents from three regions of the GIT, namely the forestomach, small and large intestine. All segments from these three regions were sampled as follows: forestomach: rumen, reticulum, omasum, and abomasum; small intestine: duodenum, jejunum, and ileum; and large intestine: cecum, colon and feces. Luminal samples of the gastrointestinal tract were obtained as follows. Following sacrifice, the animal was transferred to a biopsy table. Samples from the forestomach, including the rumen, reticulum, omasum, and abomasum, were collected and pooled out separately. Rumen samples were filtered through sterile gauze to obtain both liquid and solid (fiber-adherent) portions. Intestinal sampling was performed from the beginning of the duodenum in the small intestine through the end of the colon in the large intestine. The duodenum was 1 meter in length and was sampled at the beginning, middle, and end sections. Sixteen samples were collected from the jejunum by sampling every five intestinal handles (1.5 m each). Due its small length (30 cm), the entire ileum luminal contents were collect as one sample. For the large intestine, the voluminous cecum was delimited into three sections (top, medium, and bottom) and separately sampled. Four anatomical points of the colon were sampled: internal and external handles of the ascendent colon, the transverse colon, and the descendent colon. Fecal samples were also collected during animal defecation before animal slaughter.

In order to prevent shifting of luminal contents from one site to another during intestinal sampling, a 30 cm section from each sampling site was isolated from the entire intestine by clamping its extremities using a thread. This strategy was used to ensure that the sampled contents came from each specific anatomic location in the GIT. Animal feed was also sampled, including grass from five random sites in the pasture field and five random locations in the corn silage trough provided to the animal prior to sacrifice. All samples were kept at -80 ^{o}C until processing.

2.3. DNA Extraction

Genomic DNA was isolated from all samples using a QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) with 50 mg of luminal samples or 100 mg of feed samples and resuspended in 180 μL of ATL buffer that was subsequently incubated for one hour at 37 ^{o}C with 250 μg of lysozyme (Sigma-Aldrich) for cell lysis. Subsequent steps were followed according to the manufacturer's manual for bacterial DNA isolation from biological fluids. DNA concentration and purity were determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) at wavelengths of 230, 260 and 280 nm. Different samples from the same GIT segment (3 samples from duodenum, 16 from jejunum and 3 from cecum and 3 from colon) were separately pooled in equimolar amounts prior to PCR.

2.4. PCR and Pyrosequencing

A fragment spanning the V6-V8 variable region of the 16S rRNA gene from bacteria (positions 906 to 1406 in the *Escherichia coli* numbering system) was PCR amplified using custom-designed primers containing the Roche 454 A or B Titanium sequencing adapters, a unique five base-pair barcode sequence (only in the reverse primer) and the primer of interest. These included 926F-5'-*CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG*AAACTYAAAKGAATTGACGG-3' and 1392R-5'-*CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCA*G-XXXXX-ACGGGCGGTGTGTRC-3', where X represents the barcode sequence location. A total of 25 ng of DNA was used in a 50 µL reaction containing 1X HF Buffer, 200 µM of dNTPs, 0.125 µM of each primer, 3.5 % of DMSO, and 1 unit of Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New Englands Biolabs Inc., Ipswich, MA). PCR conditions were: initial denaturing of 94 ^{o}C for 2 min; 30 cycles consisting of 94 ^{o}C for 30 s, 50 ^{o}C for 45 s and 68 ^{o}C for 1.45 min; and final extension step of 68 ^{o}C for 10 min. Amplicons were purified twice using the Agencourt AMPure XP system (Beckman Coulter, Inc., San Diego, CA) and quantified using a Qubit® Fluorometer (Invitrogen, San Diego, CA). All subsequent amplicons were pooled out in equal amounts for emulsion PCR.

Amplicon sequencing was performed using the manufacturer's protocols (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) for Titanium sequencing on a Roche 454 GS Junior Titanium sequencer. Emulsion PCR, recovery, and sequencing were done according to manufacturer's protocols using the Lib-L kit with an initial emPCR ratio of two molecules of DNA per bead. All sequences were submitted to the National Center for Biotechnology. Information's short read archives and can be publicly accessed under accession number SRA056229.

2.5. Data Analysis

Sequences were processed using the program MOTHUR v.1.23.0 (Schloss et al., 2009). 16S rRNA reads were decoded based on the 5 bp sample-specific barcodes and processed to remove poor quality sequences. To reduce sequencing errors, the *shhh.flows* command was applied, which is the MOTHUR implementation of the AmpliconNoise algorithm (Quince et al., 2011). Quality filters were applied to trim and remove sequences with: average qual score less than 35; homopolymers longer than 8 nucleotides and more than 2 different bases to the primer. In order to obtain a non-redundant set of sequences, unique sequences were determined and used to align against the SILVA reference alignment database (Pruesse et al., 2007); chimeras were removed using c*himera.uchime* (http://drive5.com/uchime); sequences identified as being of eukaryotic origin were removed; and 16S rRNA sequences were classified using the Greengenes database (DeSantis et al., 2006). Rarefaction curves and Good's coverage were calculated to quantify the coverage and sampling effort. Community diversity was estimated using the ACE (Chao and Lee, 1992), Chao1 (Chao, 1984) and Berger-Parker (Magurran, 1988) indices. The unweighted Unifrac distance method (Lozupone and Knight, 2005) was used to perform a principal co-ordinates analysis and a distance-based AMOVA was conducted to assess significant differences between samples. Double hierarchical analysis was conducted using the unweighted pair-group (UPGMA) method and Manhattan distance with no scaling in the Number Cruncher Statistical System (NCSS 2007) software (NCSS, Kaysville, UT). All OTU analyses presented in this study were determined at a 95 % sequence identity as it has been reported that a reasonable genus-level richness can be achieved using this degree of discrimination (Roesch et al., 2007).

3. Results

A total of 30,315 sequences across all luminal and feed samples were generated by pyrosequencing, and the number of total and high-quality sequences recovered from each sample is presented in Table S1. Rarefaction analysis (Fig. S1) and Good's coverage (Table S1) indicated that the sampling effort had sufficient sequence coverage to detect the majority of bacterial diversity, with a Good's coverage value of at least 0.88 across all samples. Indices of bacterial richness and diversity based on operational taxonomic units (OTUs) were estimated through Ace and Chao1, and the proportional importance of the more abundant OTUs was determined using the Berger-Parker approach as summarized in Table S1. Considering only the GIT of the animal, the minimum number of different OTUs ranged from 163 in the jejunum to 443 in the abomasum, but the richness estimated by Chao1 and ACE indices was higher than the determined values (Table S1).

The phylogenetic diversity (PD), calculated as the sum of all the branch lengths in a 16S rRNA tree, was found to be variable over the GIT of the animal, reaching a maximum value in the liquid fraction of the rumen content and a minimal value in the small intestine (Fig. 1). The PD value in the large intestine (cecum, colon, and feces) is higher than in the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) but lower than in all samples from the forestomach of the animal (solid and liquid fractions of the rumen content, omasum and abomasum).

A principal coordinate analysis (PCoA) of overall diversity, based on an unweighted UniFrac metric, was also performed to compare all samples. This analysis showed that samples from the same/adjacent GIT segment (pre-stomach/stomach, small intestine and large intestine) harbor microbial communities more similar to each other than to samples from other segments (Fig. 2). Furthermore, we found that the microbial communities in each of the three GIT groups are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Using the Greengenes taxonomic database in the analysis program MOTHUR (Schloss et al., 2009), we were able to classify 97.12 % of all sequences into 19 different phyla (Fig. 3a). We also annotated 85.36 % of all sequences to class, 84.07 % to order, 67.64 % to family and 47.04 % to genus with a minimum of 60 % confidence. The majority of the sequences belonged to the phyla Firmicutes (41.22 %), Bacteroidetes (33.51 %), and Proteobacteria (12.15 %). The most highly represented families included the Ruminococcaceae (11.14 % of all sequences), Lachnospiraceae (9.98 %) and Prevotellaceae (8.67 %). Analysis of the most abundant phyla by sample revealed that Bacteroidetes are found predominantly from the reticulum to abomasum, whereas Firmicutes dominate within the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) and within the large intestine (cecum, colon and feces) (Fig. 3a). The Proteobacteria phylum dominated the corn silage and the grass sample. A detailed view of phyla abundance across all samples in this study can be found in the Table S2.

Based on our PCoA analysis (Fig. 2) we grouped all sequence samples according to their cluster membership (feed, forestomach, small intestine, large intestine) and analyzed them at the family level within the phyla Firmicutes and Bacteroidetes, both of which make up ~75 % of the total phyla found across all GIT samples. In particular, we found that for the Firmicutes, members of the family Lachnospiraceae were dominant in the forestomach, while in the small intestine and in the large intestine, members of the families Clostridiaceae and Rumminococcaceae dominated (Fig. 3b). Within the Bacteroidetes, most of the sequences in the forestomach were unclassified at the family level, whereas Prevotellaceae dominated the small intestine and Bacteroidaceae were abundant in the large intestine (Fig. 3c). In addition, the large intestine was also characterized by sequences belonging to Rikenellaceae, a trend not found in any other segment.

To gain a more in-depth understanding of the differences between the microbial communities across the GIT, we performed a double hierarchical analysis of the 50 most abundant OTUs from the whole GIT assigned at 95 % sequence similarity (Fig. S2). We found that the large intestine harbored the most significantly different microbial community, with the small intestine having the least. With the exception of an OTU identified to the genus *Paludibacter*, abundant OTUs in one segment are generally not found in any other segment. Moreover, our analysis revealed the presence of three distinct clusters corresponding to the three GIT segments sampled, with OTUs differentially present in the forestomach and large intestine, and a smaller cluster of six OTUs in the small intestine.

Given that the majority of studies on ruminant microbial communities focus on either ruminal or fecal samples, we conducted an additional OTU analysis using the rumen, small intestine (duodenum, jejunum and ileum), and fecal samples from our study, as shown in Figure 4a. We found 1,105 OTUs across all of these samples, 411 which were found exclusively in the rumen, 262 in the small intestine, and 186 in feces (Fig. 4b). Taxonomic classification of those OTUs shared between all three segments showed that these sequences belong to four phyla including the Bacteroidetes (19 OTUs or 24.64 % of all sequences in the three segments), Firmicutes (44 OTUs, 13.82 %), Spirochaetes (1 OTU, 0.41 %), and Planctomycetes (1 OTU, 0.03 %) (Fig. 4B).

4. Discussion

A properly functioning GIT is essential to overall health of ruminants. A key component of the GIT is the microbial flora, which help these animals acquire nutrients from their feed (Russell and Rychlik, 2001) in addition to limiting the effectiveness of opportunistic pathogens (Lettat et al., 2012). Assessing the microbiota of ruminants requires documenting the microbial community within the GIT. This is often very difficult, since gaining access to these samples may not be feasible. As a result, health assessments are often determined based on either ruminal or fecal microbial communities.

Here, we performed the first comprehensive analysis of the bacterial communities associated with the GIT of Nelore cattle. We employed 16S rRNA pyrosequencing on 11 different GIT components of a single Nelore steer in order to determine if ruminal and fecal microbial communities are correlated to other sections of the GIT. In particular, we targeted the luminal contents of the GIT, rather than the host tissue microbiota, as this best correlates to the microbiota detectable from both the rumen and feces. Importantly, we recognize that the work presented here is from a single animal, however the purpose of our study was to intensively sample and compare the microbiota across different GIT segments within the same animal to determine if these communities had similarities, particularly between the rumen, feces, and other GIT sections. While inter-microbiota variation is important for assessing differences of the GIT sections between individuals, intra-microbiota variation is equally as important, given that health assessments for individuals is primarily assessed using fecal and/or ruminal microbiota analysis.

A primary finding of our study is that there are differences in microbial community composition between the segments of the GIT. However, these microbial communities are more similar to each other when traversing the anatomical length of the GIT (Fig. 1). This is in agreement with previous studies that have reported significant changes in the microbiota within the GIT as digesta passes from one segment to another (Frey et al., 2010). These shifts are thought to be related to the finding that passage from the forestomach to the small intestine occurs under acidic conditions, where microbial cells are lysed to provide dietary protein to the host (Dehority, 2003). However, these studies also showed that there are differences between the microbial communities in the duodenum and ileum, which cannot be explained by drastic physical or chemical parameter changes. In addition, the existence of distinct microbial populations associated the host tissue when comparing with those in the lumen at the same GIT segment, taken together with the fact that the former are in lower number (Malmuthuge et al., 2012), indicate that the contribution of adhered microbes to our findings could not be used to explain the observed microbial segregation. Taken together, our results indicate that yet unknown host factors could be involved in selecting microbial communities in each GIT segment according with their contribution to the host physiology.

We found that the samples with the highest phylogenetic diversity were in the rumen (Fig. 1), where most of the ingested food is transformed into short chain fatty acids (SCFAs). This diversity was found to decline slightly in the omasum, where digesta is compressed and water is absorbed. Surprisingly, we found high diversity and richness estimates for the microbial community in the abomasum (Table S1). This was unexpected, given that this organ is where gastric secretions are released, and creating an acidic and hostile environment (pH 2.3) that is expected to limit the ability of many bacteria to survive. As digesta passes from the omasum to the small intestine there is a decrease in bacterial diversity, with the lowest diversity observed in the jejunum. The jejunum is the longest compartment of

GIT and is the only segment dominated by a small group of bacteria (Table S1). After the jejunum, the microbial diversity increases (Fig. 1), possibly due to the involvement of these bacteria in the degradation of plant biomass that bypasses the rumen and small intestine.

The distribution of the 20 phyla we recovered from all samples showed remarkable differences across the compartments of the GIT, with two predominant phyla in all samples: Firmicutes and Bacteroidetes (Fig. 3a and 3b). These two phyla, which comprised 75 % of our sequences, have been shown to be ubiquitous in bovines (Callaway et al., 2010; de Menezes et al., 2011; Dowd et al., 2008; Shanks et al., 2011) and other animals (Ley et al., 2008). Our results indicate that there is considerable intra-animal variation of these two phyla, which has not been reported to date. In contrast, we found that the PD of the microbial community in the feed is different from the GIT. In particular, both corn silage and grass feeds were dominated by members of the Proteobacteria. This finding corroborates previous work (Callaway et al., 2010; Shanks et al., 2011) and further indicates that very few bacteria are retained from feed as it passes through the GIT. This is not surprising given that the rumen, which is the first major organ that feed enters, is adept at selecting a very specific microbiota.

Our analysis of the rumen, small intestine, and fecal samples showed that only 40 OTUs of 1,105 OTUs are shared across all locations (Fig. 4a). Although those OTUs account for 29.43 % of the sequences in these samples, they represent only 4 phyla (Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, and Spirochaetes) of the 19 we found across all samples. This indicates that the microbial diversity across the entire GIT cannot be predicted from a single segment. This is important given that conclusions regarding the bacterial communities within the ruminant GIT are often drawn by using ruminal and fecal samples as proxies.

Our analysis of the Nelore GIT also includes the ruminant forestomach, which is responsible for the degradation and fermentation of plant biomass into SCFAs. In agreement with previous studies (Callaway et al., 2010; de Menezes et al., 2011), our analysis revealed an over-enrichment of OTUs belonging to the phyla Bacteroidetes, Firmicutes and Fibrobacteres (Fig. 3 and S2). In particular we identified bacteria in the genera *Prevotella, Bacteroides* and *Fibrobacter*, which are commonly found in the rumen and implicated in the degradation of both cellulose and hemicelluloses (Russell and Rychlik, 2001). These data are in agreement with a recent study of inter-individual ruminal microbiota variation across a number of lactating cows (Jami and Mizrahi, 2012; Ross et al., 2012). This study identified a core microbiome comprised of 32 genera that ranged from 0.01 - 50 % of all sequences in each animal's rumen. Some of those core genera were found to be ubiquitous in our study of the Nelore GIT, such as *Pseudobutyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, and *Clostridium*.

Our study also included those segments of the small intestine that play important roles in ruminant health. For example, given the close proximity of these components with host tissue, the bacterial community within the small intestine is thought to directly affect the innate and adaptive immune system (Hooper and Macpherson, 2010). Importantly, the passage of digesta through the small intestine is relatively fast, suggesting that there is limited time for bacteria to both establish and proliferate in this segment. Previous work suggests that the bacterial density can vary by up to three orders of magnitude from the duodenum to the ileum (O'Hara and Shanahan, 2006), although a recent survey of 16S rRNA sequences in the proximal and distal GIT of dairy calves did not reveal a significant difference in bacterial density (Malmuthuge et al., 2012).

Our results also point to an increase in the abundance of sequences from the families Clostridiaceae and Prevotellaceae within the small intestine when compared to other GIT compartments. Given the known role of these bacteria in carbohydrate metabolism, these bacteria may further contribute to nutrient acquisition within the small intestine, as has been recently proposed for humans (Zoetendal et al., 2012). One of the most abundant OTUs found in the small intestine was from the ileum, and could not be assigned to a known phylum (Fig. S2). This suggests that the GIT microbiota in cattle has other players yet to be identified. These findings thus indicate that microbial populations in the small intestine are dynamic, but quantitative data is necessary to confirm if population shifts are accompanied by increases in bacterial density.

In addition to the forestomach and small intestine, bovines also have a large intestine composed of a voluminous cecum and a long colon. These segments are the site of post-ruminal degradation of cellulose and starch, and are thought to be important in animal digestion, especially as it relates to diet (Armstrong and Smithard, 1979). For example, surveys of 16S rRNA from cattle fecal samples show a higher recovery of Ruminococcaceae sequences in forage fed animals (Shanks et al., 2011) than in grain fed animals (Callaway et al., 2010). This may indicate that these forage practices select for microbial populations enriched in cellulose degraders given that members of the Ruminococcaceae are known for their cellulolytic capacity (Russell and Rychlik, 2001). Our data support the presence of distinct populations of members from the family Ruminococcaceae and the phylum Bacteroidetes in the large intestine, similar to what was found for the rumen (Fig.

S2). Given the role of these bacteria within the rumen, it is possible that these communities may also contribute to further downstream feed fermentation. Finally, our analysis also shows that the rumen and feces microbial communities have the largest differences in diversity, relative to other components, with only 66 shared OTUs (Fig. 4). Many important members in the rumen were not present in the feces, such as *Fibrobacter*, *Treponema*, and *Methanobrevibacter*.

The gut-associated microbiota of mammals is important because of its impact on the health and well-being of the host (Wallace et al., 2011). In bovines the gut microbiota is not well-characterized because most studies focus on either ruminal or fecal microbiota. Our report of high intra-individual variation argues for more comprehensive studies to evaluate the effect of section-specific microbiota on different parts of the GIT, particularly by investigating inter-individual variation. Moreover, our 16S rRNA based approach is useful for obtaining a relative consensus of abundance, but the use of more fine-scale approaches, like qPCR, could monitor specific bacteria identified in our study and potentially differentiate between segments that displayed similar microbial diversity estimates. Understanding how host-microbe interactions are shaped by either the host or microorganism would provide important insights into ruminants, and ultimately have important implications for the health and nutrition of bovines.

5. Conclusions

This works reveals that there is high intra-individual variation in the microbiota found within the different components of the gastrointestinal tract of a Nelore steer. Comparison of the microbial communities in the forestomach, small intestine, and large intestine, reveals marked differences in both microbial diversity and relative abundance. These data suggest that ruminal and fecal microbial communities are not effective proxies for documenting the microbiota found in other sections of the GIT. Our work, which is the first systematic evaluation of the microbial communities across the GIT for any ruminant using culture-independent next-generation sequencing, serves as a framework for understanding the role of microbiota in ruminant health.

Acknowledgements. This work was supported by CAPES, and CNPq Brazilian funding agencies. This study was also supported in part by the Wisconsin Bioenergy Initiative. We would like to thank Dr. Renato Sampaio and Dr. Luiz Antônio Josahkian from the Brazilian Association of Zebu Breeders, for their assistance in sampling. We would also like to thank Alissa Hanshew for help with sequencing, and all members of the Suen lab for their support, insightful discussions, and careful reading of the manuscript.

References

Armstrong, D.G., Smithard, R.R., 1979, Fate of Carbohydrates in the Small and Large-Intestines of the Ruminant. J. Sci. Food Agric. 30, 1021-1022.

Callaway, T., Dowd, S., Edrington, T., Anderson, R., Krueger, N., Bauer, N., Kononoff, P., Nisbet, D., 2010, Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. J. Anim. Sci. 88, 3977-3983.

Chao, A., 1984, Nonparametric-Estimation of the Number of Classes in a Population. Scand. J. Stat. 11, 265-270.

Chao, A., Lee, S.M., 1992, Estimating the Number of Classes Via Sample Coverage. J. Am. Stat. Assoc. 87, 210-217.

de Menezes, A., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B., Clipson, N., Doyle, E., 2011, Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. FEMS Microbiol. Ecol. 78, 256-265.

Dehority, B.A., 2003, Rumen microbiology. Nottingham University Press, Thrumpton, Nottingham, vii, 372 p. pp.

DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006, Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Appl. Environ. Microb. 72, 5069-5072.

Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R., Edrington, T., 2008, Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rRNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). BMC Microbiol. 8, 125.

Frey, J., Pell, A., Berthiaume, R., Lapierre, H., Lee, S., Ha, J., Mendell, J., Angert, E., 2010, Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. J. Appl. Microbiol. 108, 1982-1993.

Hooper, L.V., Macpherson, A.J., 2010, Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat. Rev. Immunol. 10, 159-169.

Jami, E., Mizrahi, I., 2012, Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. Plos One 7.

Lettat, A., Noziere, P., Silberberg, M., Morgavi, D.P., Berger, C., Martin, C., 2012, Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. Bmc Microbiol. 12.

Ley, R., Lozupone, C., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J., 2008, Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. Nat. Rev. Microbiol. 6, 776-788.

Lozupone, C., Knight, R., 2005, UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appli. Environ. Microbiol. 71, 8228-8235.

Magurran, A.E., 1988, Ecological diversity and it's measurement. Croom Helm, 160 p p.

Malmuthuge, N., Li, M., Chen, Y., Fries, P., Griebel, P.J., Baurhoo, B., Zhao, X., Guan, l.L., 2012, Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. FEMS Microbiol. Ecol. 79, 337-347.

O'Hara, A.M., Shanahan, F., 2006, The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. 7, 688-693.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F., 2007, SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. Nucleic Acids Res. 35, 7188-7196.

Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R.J., Turnbaugh, P.J., 2011, Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. Bmc Bioinformatics 12, 38.

Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G., Triplett, E.W., 2007, Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J. 1, 283-290.

Ross, E.M., Moate, P.J., Bath, C.R., Davidson, S.E., Sawbridge, T.I., Guthridge, K.M., Cocks, B.G., Hayes, B.J., 2012, High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing. Bmc Genet. 13.

Russell, J., Rychlik, J., 2001, Factors that alter rumen microbial ecology. Science 292, 1119-1122.

Schloss, P., Westcott, S., Ryabin, T., Hall, J., Hartmann, M., Hollister, E., Lesniewski, R., Oakley, B., Parks, D., Robinson, C., Sahl, J., Stres, B., Thallinger, G., Van Horn, D., Weber, C., 2009, Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. Appl. Environ. Microb. 75, 7537-7541.

Shanks, O., Kelty, C., Archibeque, S., Jenkins, M., Newton, R., McLellan, S., Huse, S., Sogin, M., 2011, Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations. Appl. Environ. Microb. 77, 2992-3001.

Van Baale, M.J., Sargeant, J.M., Gnad, D.P., DeBey, B.M., Lechtenberg, K.F., Nagaraja, T.G., 2004, Effect of Forage or Grain Diets with or without Monensin on Ruminal Persistence and Fecal Escherichia coli O157:H7 in Cattle. Appl. Environ. Microb. 70, 5336-5342.

Van Donkersgoed, J., Graham, T., Gannon, V., 1999, The prevalence of verotoxins, Escherichia coli O157 : H7, and Salmonella in the feces and rumen of cattle at processing. Can. Vet. J. 40, 332-338.

Wallace, T.C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M.D., Gibson, G., Hentges, E., Sanders, M.E., 2011, Human gut microbiota and its relationship to health and disease. Nutr. Rev. 69, 392-403.

Zoetendal, E.G., Raes, J., van den Bogert, B., Arumugam, M., Booijink, C.C., Troost, F.J., Bork, P., Wels, M., de Vos, W.M., Kleerebezem, M., 2012, The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. ISME J., 6, 1415-1426.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interests

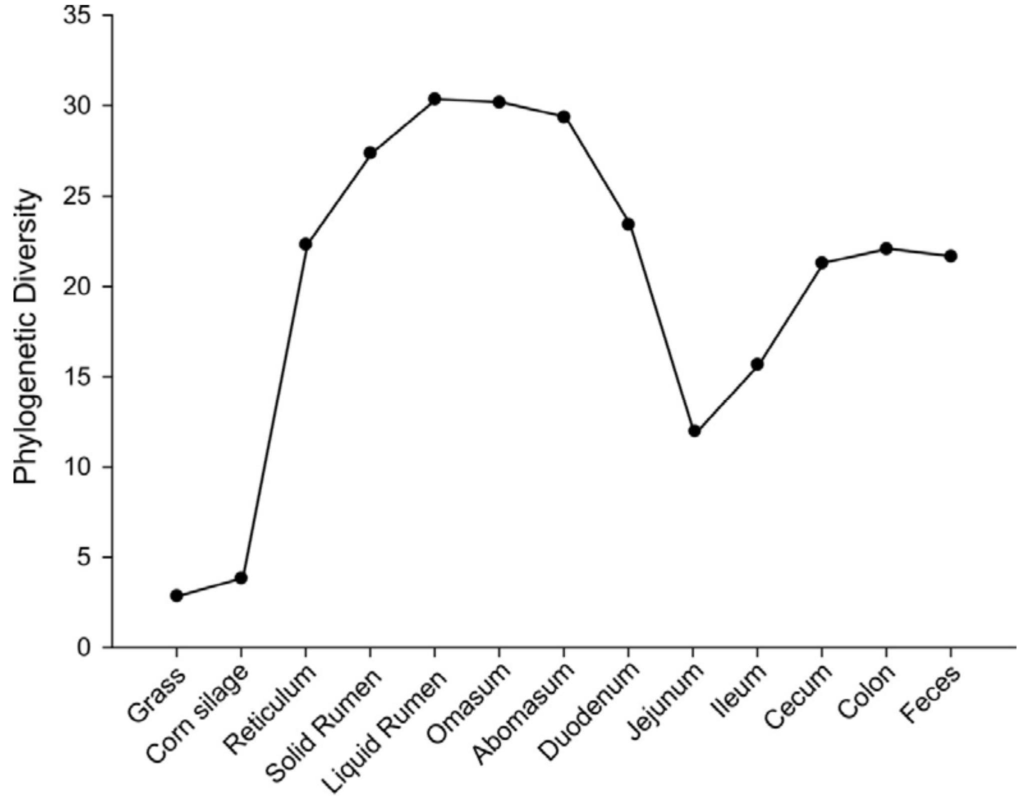


Fig. 1. Phylogenetic diversity in the feed and GIT of a Nelore steer, as calculated by the sum of all the branch lengths in a 16S rRNA phylogenetic tree.

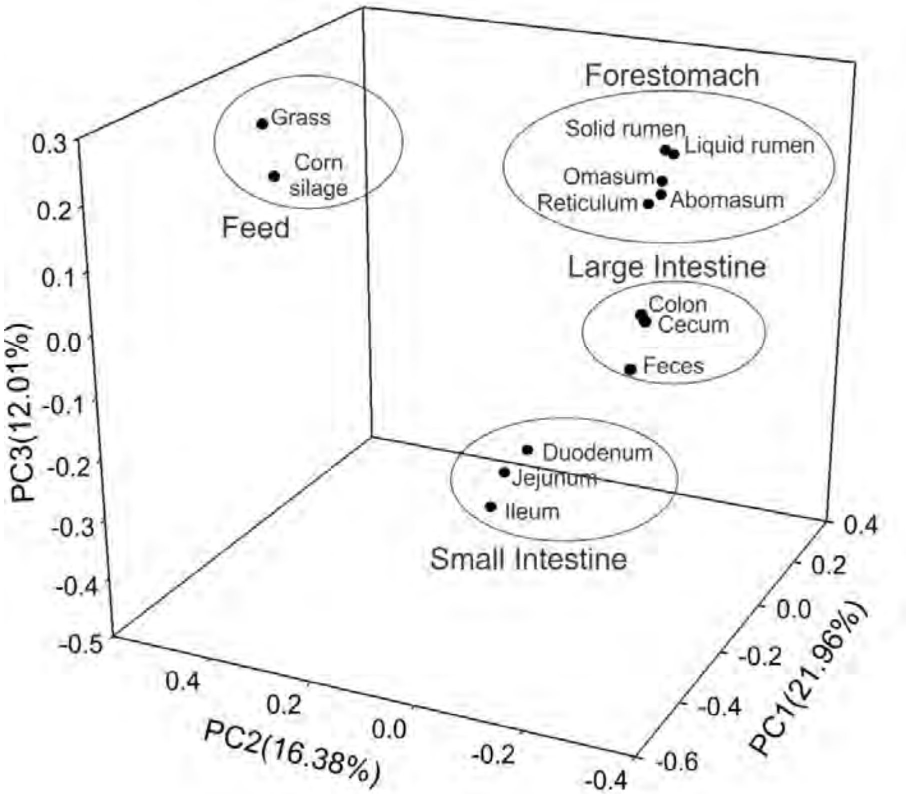


Fig. 2. Three-dimensional principal coordinate analysis of microbial diversity across all samples using an unweighted UniFrac metric. The percentage of variation explained by PC1, PC2 and PC3 are indicated in the axis. Groups of samples highlighted by open circles were found to be significantly different from each other (P < 0.05).

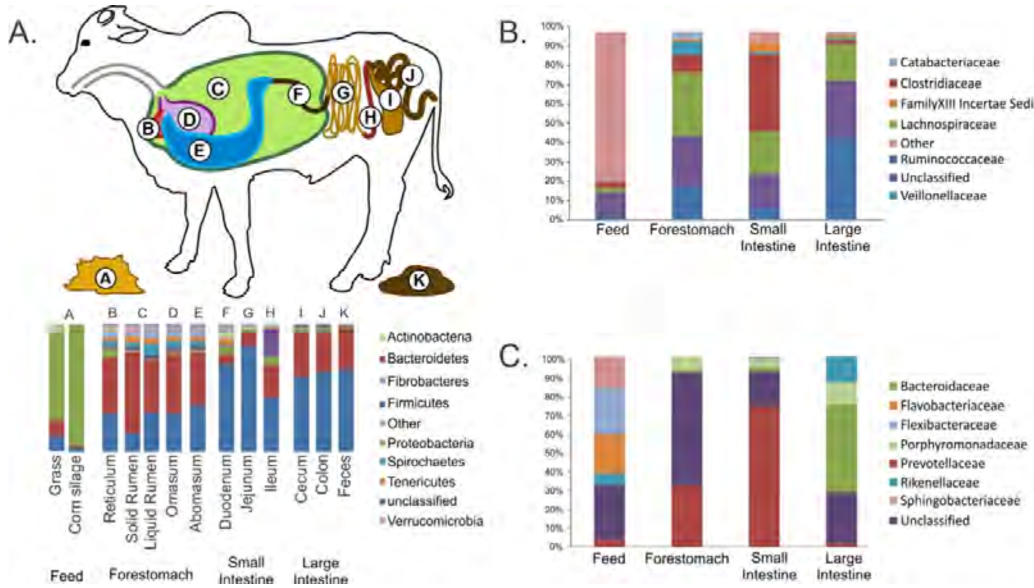
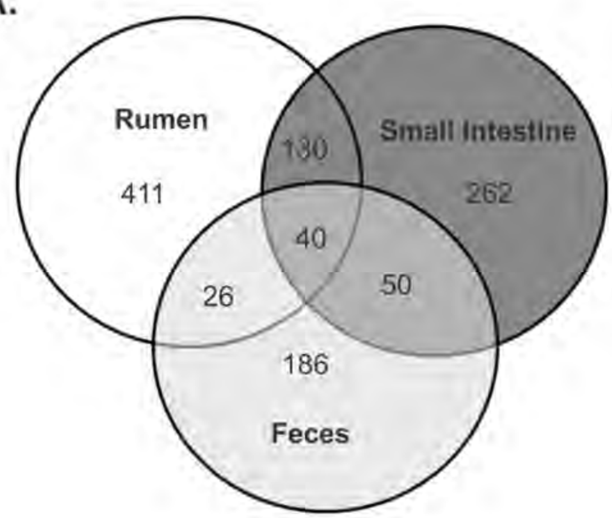


Fig. 3. Distribution of 16S rRNA sequences from the feed and GIT of a Nelore steer. Depicted are sampling locations and the relative sequence abundances in phyla (A) and families within the Firmicutes (B) and Bacteroidetes (C). OTUs were assigned at a 95 % similarity level corresponding to the genus taxonomic level and classified using the Greengenes database with a cutoff of 60 %.

A.



B.

	OTUs
Prevotella	12
unclassified Lachnospiraceae	10
unclassified Firmicutes	8
unclassified Clostridiales	6
unclassified Ruminococcaceae	6
unclassified Bacteroidales	3
Bacteroides	2
Oscillospira	2
unclassified Bacteroidetes	2
unclassified Catabacteriaceae	2
unclassified Clostridia	2
Clostridium	1
Coprococcus	1
Ethanoligenens	1
Paludibacter	1
Pseudobutyrivibrio	1
Ruminococcus	1
Selenomonas	1
Sutterella	1
Treponema	1
unclassified Cyanobacteria	1
unclassified Pirellulales	1

Fig. 4. Comparison of the number of OTUs shared between the rumen, small intestine, and feces of the Nelore steer (A). Taxonomic classification of OTUs common to all compartments is shown in (B). OTUs were defined at 95 % similarity level corresponding to the genus taxonomic level.

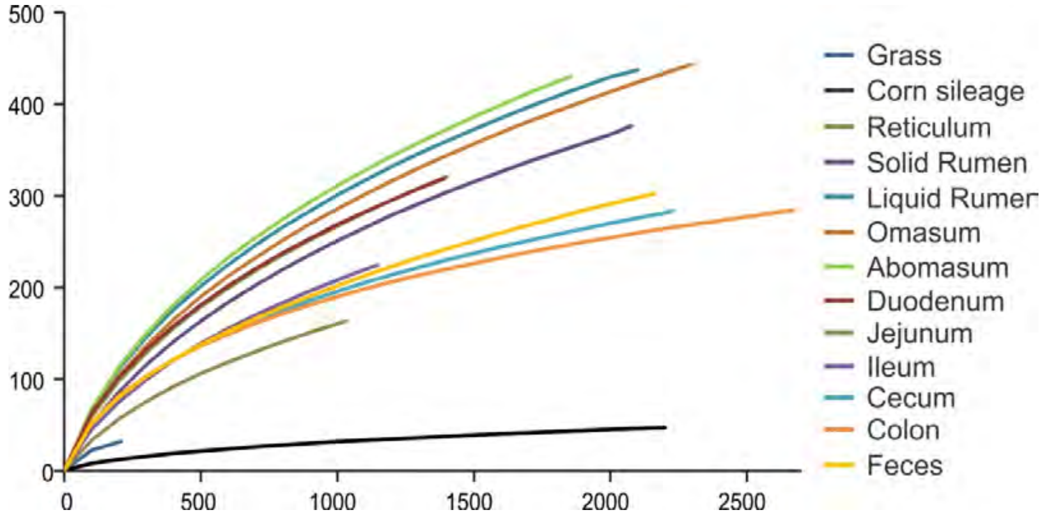


Fig. S1. Rarefaction results based on operational taxonomic unit (OTUs) assigned at 95 % similarity level for each sample.

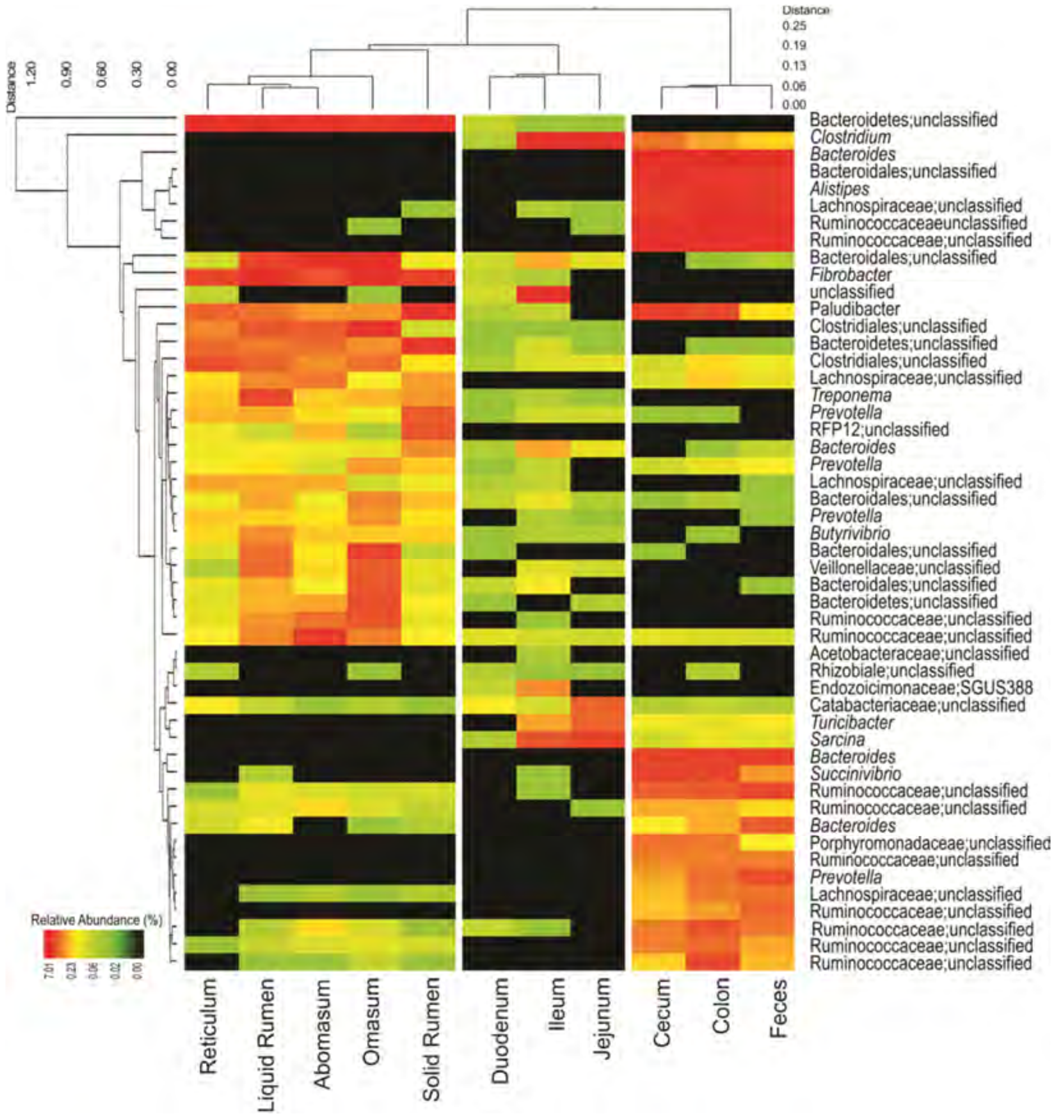


Fig. S2. Double hierarchical dendrogram representing bacterial diversity and relative abundance of the 50 most common OTUs defined at 5 % distance level across the Nelore GIT. Distances displayed at the right and left of the heatmap are based on UPGMA and Manhattan methods with no scaling to cluster samples (x-axis) and OTUs (y-axis). The heatmap shows relative percentages of each OTU, as indicated by the scale. Taxonomic identification of each OTU is given as the deepest taxonomy determined using the Greengenes database at a 60 % cutoff.

Table S1. Number of sequences, estimated sample coverage, diversity and OTU richness in each sample.

Sample Location	16S rRNA reads		Community Richness			Community Diversity	
	Total	High-quality	Berger-Parker	Chao1	ACE	No. of OTUs	Good's Coverage
Grass	1,658	208	0.25	56 (39-112)	92 (65-142)	32	0.92
Corn silage	2,393	2,177	0.80	79 (58-136)	113 (86-158)	47	0.99
Reticulum	1,543	1,402	0.18	638 (529-803)	832 (738-948)	321	0.88
Solid Rumen	2,614	2,395	0.35	663 (580-783)	868 (782-972)	401	0.92
Liquid Rumen	2,693	2,077	0.07	707 (624-826)	910 (825-1013)	437	0.90
Omasum	2,916	2,297	0.10	808 (696-970)	996 (901-1110)	443	0.90
Abomasum	2,514	1,854	0.09	733 (640-865	984 (889-1097)	430	0.88
Duodenum	2,154	1,394	0.10	544 (467-660)	755 (670-861)	319	0.88
Jejunum	2,302	1,030	0.53	321 (253-441)	457 (387-549)	163	0.91
Ileum	1,527	1,147	0.22	410 (338-523)	528 (458-620)	224	0.89
Cecum	2,489	2,229	0.11	454 (389-558)	558 (496-637)	283	0.94
Colon	3,110	2,672	0.10	387 (346-454)	404 (365-463)	284	0.96
Feces	2,402	2,160	0.09	484 (420-582)	754 (666-863)	302	0.93

Table S2. Percentage distribution of all phyla found within each sample in this study using OTU definition assigned at 95 % similarity level corresponding to the genus taxonomic level.

Phylum	% of all sequences	Grass	Corn silage	Rumen		Reticulum	Omasum	Abomasum	Duodenum	Jejunum	Ileum	Cecum	Colon	Feces
				Solid	Liquid									
Firmicutes	41,22	11,54	3,31	14,70	30,38	29,46	29,73	36,19	68,79	82,43	42,46	58,77	62,24	64,12
Bacteroidetes	33,51	12,02	1,10	63,22	41,21	44,08	47,06	41,15	7,32	10,87	25,72	34,90	31,85	32,50
Proteobacteria	12,15	66,35	94,99	1,42	0,91	6,99	1,74	2,43	5,95	1,94	5,84	3,32	2,99	1,53
Unclassified	2,87	0	0,14	2,34	3,03	2,43	3,27	2,97	1,51	0,19	21,88	1,79	1,83	0,60
Spirochaetes	2,23	0	0	3,51	8,62	3,42	4,70	3,83	0,29	0,19	0,17	0,31	0,15	0,23
Tenericutes	2,20	0	0	4,80	4,62	2,64	3,31	3,13	4,09	0,78	1,57	0,45	0,71	0,60
Fibrobacteres	1,98	0	0	2,63	6,69	4,07	6,01	2,86	0,36	0	0,17	0	0	0
Verrucomicrobia	0,95	0,96	0	3,67	1,01	1,85	0,83	2,59	0,72	0,10	0,09	0,04	0,04	0,09
Actinobacteria	0,70	8,65	0,32	0,08	0,39	2,14	0,04	0,32	4,30	0,97	1,31	0,09	0,04	0,05
Lentisphaerae	0,53	0	0	1,34	0,87	0,64	1,22	1,51	0,22	0,19	0,09	0,04	0,04	0
TM7	0,38	0	0	0,50	0,43	0,43	0,52	0,11	2,44	0,87	0	0,09	0,04	0
Euryarchaeota	0,37	0	0	0,46	0,58	0,14	0,35	0,16	2,08	1,07	0,44	0	0,04	0,14
Chloroflexi	0,31	0	0,05	0,08	0,24	1,00	0,13	1,62	1,08	0,10	0,09	0	0	0
Planctomycetes	0,22	0	0	0,29	0,29	0,43	0,35	0,65	0,22	0,19	0,17	0,13	0	0,09
Cyanobacteria	0,16	0,48	0	0,50	0,43	0,14	0,35	0,16	0	0,10	0	0,04	0	0,05
Elusimicrobia	0,09	0	0	0,42	0,05	0,07	0,04	0,05	0,43	0	0	0	0	0
Synergistetes	0,05	0	0	0	0,19	0,07	0,17	0,11	0,07	0	0	0	0	0
WPS-2	0,03	0	0	0	0,05	0	0,13	0,11	0	0	0	0	0	0
Armatimonadetes	0,02	0	0	0,04	0	0	0,04	0,05	0,07	0	0	0	0	0
Fusobacteria	0,01	0	0,09	0	0	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0

CAPÍTULO 3*

DEEP SAMPLING APPROACH ALONG THE GASTROINTESTINAL TRACT OF A BOVINE REVEALS A HIGH INTRA-INDIVIDUAL VARIATION IN THE MICROBIAL POPULATIONS

*Formatting according to FEMS Microbiology Ecology author guidelines

Deep sampling approach along the gastrointestinal of a bovine reveals high intra-individual variation in the microbial populations

Marcelo Nagem Valério de Oliveira[1], Larissa C. Pacheco[1], Júlio C. Delvaux[1], Paulo S. B. Miguel[1], Laércio B. Anjos[2], Marcos R. Tótola[1], Arnaldo C. Borges[1], Célia A. Moraes[1]

[1] Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil

[2] Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil

Corresponding author:

Célia Alencar de Moraes

Laboratório de Microbiologia Industrial, BIOAGRO

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil

Tel.: +55 (031) 3899-2974 Fax: +55 (031) 3899-1941

e-mail: camoraes@ufv.br

Abstract:

The Gastrointestinal Tract (GIT) of ruminants hosts a diverse microbiota which role is well established only in the rumen. Recent advances in sequencing are now unraveling how ruminal and fecal microbiota are affected by different factors, as temperature and diet, but little is known if sampling approaches used given a representative view of microbiota in the entire GIT. Here we performed a detailed sampling along the GIT of a Nelore steer from Brazil, which included collecting both digesta (lumen) and tissue (mucosa) samples from 30 different segments along three regions of the GIT, namely forestomach, small and large intestine. The associated microbiota was characterized by PCR-DGGE using universal primers targeting the Fungi kingdom and the Archaea and Bacteria domains. Microbial populations clustered according with GIT segment, but samples from different locations within the same segment can harbor very distinct communities. Additionally, the clear segregation of the microbiota among tissue and digesta samples suggests that microbes in close association with the host tissue can be exposed to different selection driving forces, and should be considered to gain a better understanding of the microbial ecology in the GIT of ruminants. Characterization of fungal communities by sequencing DGGE bands revealed the prevalence of members of Neocallimastigomycota phylum in all segments, but also the presence of fungi Basidiomycota and Ascomycota, being some of them exclusively found in the lumen or in association with the mucosa. The quantification of archaeal and bacterial populations by RT-PCR revealed the predominance of in the lumen of the forestomach and the large intestine but not in the small intestine. Our data provides new perspectives on microbial ecology of the GIT by showing microbial segregation between digesta and mucosa samples throughout the entire GIT of a Nelore steer.

Keywords: ruminant; sampling; mucosa; digesta; Gastrointestinal Tract; microbial diversity.

Introduction

The development of new sequencing technologies has boosted research on microbial ecology in the gastro intestinal tract (GIT) of animals and on how the associated microbiota is impacted by different factors, as diet, genetic, localization, diseases and others. Understanding how microbes in the GIT and host homeostasis are interconnected is crucial for to the development of new strategies to improve animal healthy and performance.

The GIT of mammals is dominated by members of the phyla Firmicutes and Bacteroidetes (Ley*, et al.*, 2008), and recent surveys have showed the existence of a core microbiome in the intestine of humans (Huse*, et al.*, 2012) and also in the rumen of bovines (Jami & Mizrahi, 2012). In humans, the majority of the studies focus in sampling feces due the difficulty to access other GIT segments in live individuals. For ruminants, the major area of interest so far relies in interactions established between microbes in the rumen, ultimately resulting in cellulose degradation and production of short chain volatile fatty acids (Russell & Rychlik, 2001). Despite the enormous significance of intestine for humans, this ecosystem has not been frequently accessed in ruminants, therefore representing a gap that must be fulfilled in order to give a more detailed view of the microbiota in GIT.

It was recently proposed that microorganisms of humans also coevolved with each other, leading to coherently organized, resilient microbial associations that are distinct according to the region and sample type (mucosal tissue/digesta) within the GIT (Van den Abbeele*, et al.*, 2011). This has been demonstrated in calves, where predominant microbial community associated with the tissue differed from those in the lumen, and also among the GIT regions, namely rumen, jejunum, ileum, cecum and colon (Frey*, et al.*, 2010, Malmuthuge*, et al.*, 2012).

Considering the long extension of the GIT of bovines we hypothesized that mucosa and digesta associated microbiota differs even within a same GIT segment. In order to prove that, we performed a deep sampling approach in the GIT of a Nelore (*Bos indicus*) steer from Brazil, collecting different parts within each segment – rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon. Communities of Fungi, Bacteria and Archaea were characterized by PCR-DGGE using primers targeting the fungal 18S rRNA and the bacterial and archaeal 16S rRNA. We also sequenced DGGE bands to identify, for the first time, the major fungal members presents along the entire GIT of a bovine, and quantified total bacterial and archaeal populations by RT-PCR.

Methods

Gastrointestinal sampling

Digesta and tissue samples (Table S1) of the gastrointestinal tract of a two-years old, healthy, purebred Brazilian Nelore (*Bos indicus*) beef steer, reared using management practice including pasture feeding followed by a diet of corn silage 40 days before sacrifice, were obtained as follows. After slaughtering, the entire GIT was removed and transferred to a biopsy table where sampling was performed. The forestomach – including rumen, reticulum, omasum and abomasum – was fist sampled by cutting the tissue with a surgical bistoury and collecting the digesta in five different parts and pooling all of them together. Rumen samples were filtered through sterile gauze to obtain both liquid and solid (fiber-adherent) portions. In each segment a small piece of tissue was cut and washed with sterile water to remove adherent particles but retaining the intact mucosa. The ruminal epithelium has distinct regions covered by large or small papillae, and both were sampled in this study.

During intestinal sampling, target sections had their extremities closed with a thread to avoid movement of the intestinal content. Due to their long extension, many sections of the intestine were taken. In the small intestine the duodenum was sampled at the beginning, middle, and end sections, while in the jejunum samples were taken every five intestinal handles (nearly 1.5 m each), and all ileum content was collected as one sample. For the large intestine, the cecum was sampled in three sections (top, medium and bottom), and four anatomical points of the colon were chosen to be analyzed: internal and external handles of the ascendant colon, the transverse colon and the descendent colon. As previously described for the forestomach, in each segment a small piece of tissue was sampled. The lumen of three sections of jejunum and two from colon was empty during sampling procedure, thus in those sections only tissue samples were taken. Feces were collected during animal defecation before slaughtering.

DNA Extraction

Metagenomic DNA was isolated from all samples using an adapted protocol from QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Valencia, CA). Mucosal samples was obtained by gradually scraping them away from the tissue with a scalpel. For both tissue and digesta samples, 50 mg of the material were resuspended in 180 µL of ATL buffer (provided in the kit) that was subsequently incubated for one hour at 37 ^{o}C with 250 µg of lysozyme (Sigma-Aldrich) for cell lysis. Subsequent steps were followed according to the manufacturer's manual for bacterial DNA isolation from biological fluids (QIAGEN).

Amplification and DGGE analysis of rRNA gene fragments

The diversity of the natural microbial community in the samples was analyzed by PCR-DGGE using universal DGGE-primers (Table S2) for domains Bacteria (F984GC/R1378) and Archaea (Arch344F/517r), and for the kingdom Fungi (FF390/FR1) containing a long GC-clamp incorporated into the forward primer. For Archaea and Fungi a nested-PCR strategy was used, using primers Arch344f/927r and NS1/EF3, respectively, which provided specific fragments that were used as templates for a second PCR using primers described above. PCR products were applied onto 8 % (w/v) polyacrylamide gel prepared with a denaturant gradient of urea and formamide ranging from 40 – 60 %. The electrophoresis was carried out in 1 × TAE buffer at 60 V for 20 h at a constant temperature of 60 °C. Gel was stained for 20 min in 1 × TAE buffer with 1 × SYBR Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Analyses of band profiles were carried out in the Bionumerics software version 6.6 (Applied Maths, Inc., Austin, TX, USA).

Individual Fungi DNA bands from the polyacrylamide gels were eluted in 50 µL of water using sterile tips, reamplified using primers FF390/FR1 and sequenced at Macrogen Inc., Korea.

Phylogenetic analysis

To study the evolutionary relationships among fungi using the 18S rRNA, the sequences obtained were processed using the Sequencher® software and compared to those from nucleotide collection database stored in GenBank using the BLAST algorithm (Altschul*, et al.*, 1990). Sequences with high identity were imported into MEGA 4® software and aligned to other 18S rRNA gene sequence fragments using ClustalW® (Larkin*, et al.*, 2007). Calculation of the phylogenetic trees was based on these sequence alignments using the Maximum Parsimony method (Tamura*, et al.*, 2011) and the evolutionary distances were computed using the p-distance method. To check the robustness of the resulting tree and the statistical significance levels of the interior nodes, bootstrap analysis with 1000 replicates was carried out and values above 50 % were reported.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences reported in this study are available in the GenBank under the GenBank ID numbers KC192552 - KC192647.

qPCR analysis of total bacterial and archaeal populations

qPCR assays were performed on a CFX96™ Real Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA. Reactions mixtures contained 5 µL of Fast SYBR ®Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 200 µM of each primer targeting bacterial (Eub338f and Eub518r) and archaeal (Arch344f and 517r) 16S rRNA (Table S2), and 0.8-40 ng of metagenomic DNA to a total of 10 µL. The amplification program consisted of an initial denaturing step of 95 ^{o}C for 20 s, followed by 30 cycles consisting of 95 ^{o}C for 3 s and 60 ^{o}C for 1 min. The specificity of the PCR amplification was checked by a melting curve analysis, performed by slow heating at temperatures from 65 to 95 ^{o}C at a rate of 0.1 ^{o}C/s, with continuous fluorescence measurement. Since we would like to quantify changes in microbial population in one steer, we performed two DNA extractions for each sample and considered them as replicates.

Genomic DNA of reference strains *Escherichia coli* ATCC1175 (primers p027 and 1378r, Table S2) and *Halococcus morrhuae* ATCC 17082 were used for amplification of 16S rRNA gene using the pairs of primers p027/1378r (Bacteria, Table S2), and 21f/958r (Archaea, Table S2). Amplicons were cloned into a pGEM-T ^{Easy} vector system (Promega, Madison, WI, USA) and used for transformation of competent *Escherichia coli* JM109 (Promega). Purified plasmids concentration and purity were determined using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) at wavelengths of 230, 260 and 280 nm and standard curves ranging from 10^{10} to 10^{3} copies of plasmid were constructed using the same reactions conditions as described above for qPCR. The copy number of 16S rRNA genes for total bacteria and archaea per gram of DNA was calculated using the absolute quantification method (Rutledge & Cote, 2003) which equation is: $(10^{((cq\text{-}y0)/slope)}) \times 10^{9}$/(ng of DNA used in the qPCR reaction). Standard curves were always included on the same assay plate.

Results and Discussion

Bacterial diversity

Principal Component Analysis performed using DGGE profiles revealed clear differences in bacterial communities when comparing those in the lumen and in association with the mucosa (Fig. 1). Differences were also observed when samples within each GIT segment were compared. Samples from forestomach and from the large intestine are more similar, and clustered together, while the small intestine harbors a very distinct community, both groups sharing less than 30 % of similarity (Fig. S1).

Changes in bacterial populations in the digesta during its transit through the GIT were described in lactating dairy cows using T-RFLP analysis to investigate rumen, duodenum, ileum and feces (Frey, *et al.*, 2010). The segregation of bacterial populations along the GIT of the Nelore steer was recently demonstrated (Oliveira et al., 2013). In that paper was reported that samples from the same GIT segment were pooled prior pyrosequencing and here we further that analysis by assessing by comparing each sample independently with their respective sample from the mucosa.

The effect of sample location (Fig. 1) suggests that microbial communities in the lumen are exposed to different selection driving forces. In a recent study the mucosa-associated microbiota in humans was suggested to acts through direct interaction with the host, while the microbiota in the lumen acts through cometabolism or metabolic exchange with the host (Chen, *et al.*, 2012). That hypothesis was formulated from a study of bacterial 16S rRNA, and have been showed in the GIT of weaned calves and in chickens (Malmuthuge, *et al.*, 2012), but it can possibly be applied to all microbial groups, as we have showed that not only bacterial, but also archaeal and fungal communities are influenced by their location in the GIT (Fig. 1).

Archaeal diversity

Our results indicate persistent colonization of Archaea throughout the GIT showing a community segregation similar to that observed for Bacteria, with different populations present (Fig. 1B) in the lumen and in association with the mucosa. Archaea are members of ruminal microbiota, corresponding to about 0.3 % to 3.3 % of the microbial 16S rRNA extracted from rumen (Janssen & Kirs, 2008). They are linked to methane production by their capacity to use H_2 to reduce CO_2 (Dehority, 2003), but other distinct physiologic archaeal groups have been identified in rumen (Mitsumori, *et al.*, 2010), rising questions on what role they in the GIT of ruminants.

Lumen population in the rumen and in the reticulum clustered together, forming a separate cluster of samples from forestomach and from large intestine (Fig. S2). It seems that after digesta passes from the rumen to omasum there is a drastic change in the structure of the archaeal community, starting in the forestomach going through the small intestine up to the large intestine. Samples in the small intestine, namely jejunum and ileum, harbor distinct populations when comparing with cecum and colon, what is probably associated with environmental conditions in those segments, involved with different metabolic functions in the animal (Dehority, 2003).

Although communities in the forestomach and in the large intestine differ from luminal samples, that is not true for samples from mucosa, which formed a distinct group sharing almost 60 % of similarity (Fig. S2). The presence of mucosa-associated archaea has been reported in humans (Nava*, et al.*, 2012), and methanogens have been detected in the duodenum and in the ileum of cattle (Frey*, et al.*, 2010), but our results show how variable those communities are in different segments and locations of the GIT (mucosa/lumen). Archaea are well known by their involvement with cellulose degradation and methane production, but if the similarity found among segments is somehow related to these processes that take part in the forestomach and in the large intestine remains to be elucidated.

Fungal diversity

Fungal communities are also affected by their location (Fig. 1C), although cluster analysis did not show an evident separation between samples from lumen and from mucosa (Fig. S3) as for bacterial and archaeal profiles (Figs S1 and S2). Considering both sample types, the structure of the communities in the forestomach and in the large intestine is similar, whilst two cluster of samples were formed with samples from small intestine (Fig. S3).

The existence of fibrolytic fungi able to colonize anaerobic environment as the GIT of herbivorous is well known (Trinci*, et al.*, 1994) and they are now classified in a single order (Neocallimastigales) within the phylum Neocallimastigomycota (Hibbett*, et al.*, 2007). These microorganisms are important in the rumen, where they act as cellulose degraders. The detection of fungi related DGGE bands in samples from locations not involved with cellulose degradation, as in the small intestine and in the mucosa, led us to further our analysis by sequencing DGGE bands eluted from all samples.

In total, from 171 eluted bands (Fig. S4), 111 were successfully sequenced and allowed the identification of the major fungal groups present. DGGE bands belonged to 14 genera (Fig. 2): *Piromyces*, *Cyllamyces*, *Tomentella*, *Tilletiopsis*, *Malassezia*, *Donkioporia*, *Wallemiales*, *Cryptococcus*, *Alloclavaria*, *Hydnomerulius*, *Candida*, *Neottiella*, *Fusarium* and *Cyniclomyces*. Eight genera, especially within Basidiomycota phylum, where found exclusively as mucosa-associated and two genus were unique to digesta samples (Fig. 2). Sequences assignment at a 97 %

identity level revealed 15 OTUs which were affiliated to the phyla Basidiomycota, Ascomycota and Neocallimastigomycota (Fig. S5).

The occurrence of fungi from phyla other than Neocallimastigomycota in the GIT of ruminant is not well known, but some of the identified genera are commonly found in agricultural environment (Hanhela*, et al.*, 1995). Some of these fungi are plant growth promoters and establish benefic interactions with their hosts. Others can live as plant (e.g. genus *Fusarium*) (Turkington*, et al.*, 2011) or animal pathogens (e.g. *Cryptococcus* and *Candida*) (Moretti, et al., 1998, Malik, et al., 2002, Magalhaes, et al., 2012) but species within the same genera can be involved in beneficial or harmful interactions with their host. The presence of fungi in the environment and the ability to produce spores could explain the identification of fungi across the GIT of ruminant as a result of feed intake, but the observed segregation between lumen and mucosa-associated communities, including members of aerobic fungi, refutes such hypothesis and suggests the persistence of fungal populations in response to still unknown factors. Mucosal microorganisms are confronted with an oxygen gradient as oxygen is continuously released from the blood towards the mucus layer, what could support the survival and the colonization of mucosa by aerobic fungi (Van de Abbeelee et al., 2011).

Once we have detected differences in fugal populations among sample locations, unraveling how fungi establish in the GIT of ruminant will be an outstanding finding, especially as attention has been paid to identify nematode parasites for biological control in ruminants in order to reduce the use of commercial anthelmintic drugs (Assis*, et al.*, 2012, Torres-Acosta*, et al.*, 2012) and avoid the widespread development of anthelmintic resistance (Waller & Thamsborg, 2004).

Only 11 bands showed identity with animal DNA, confirming that primers used were very specific even when used in mucosa samples, where recovery of animal DNA probably occurs due to the difficult to remove the mucosa layer without disturbing the animal tissue. Results here presented show that despite 18S rRNA being a well conserved region, it can be successfully used to identify and discriminate fungal groups in the GIT of a bovine. However, these primers would not be suitable for high-throughput sequencing studies, since the number of OTUs was probably underestimated when using identity level of 97 % due to the highly conserved nature of 18S rRNA.

Microbial OTU Richness

The variation in the microbial communities along the GIT can also be viewed by the richness of OTUs (DGGE bands) in each sample (Fromin, *et al.*, 2002). Richness values were variable along microbial groups, ranging from 4 to 44 for Bacteria, from 1 to 25 for Archaea and from 5 to 25 for Fungi (Fig. 3). Such unequal OTU distribution, even among adjacent samples, highlights the necessity to a deep sampling approach in order to avoid misinterpretation of microbiome analysis and unveil most of microbial diversity along the GIT of a ruminant.

A higher number of bacterial OTUs was found in samples from forestomach when compared with samples from small and large intestine, what is reasonable considering the diversity of metabolic processes that are carried out in rumen (Russell & Rychlik, 2001). For Bacteria (Fig. 3a), luminal samples showed higher richness than mucosa-associated samples, although in some sites, as in the reticulum, omasum and abomasum, the number of OTUs was more equally distributed. Pattern of Archaea distribution along the GIT has a different picture as richness of mucosa-associated communities was higher than in luminal ones in the forestomach and in some samples from the large intestine. Fungal richness (Fig. 3c) does not show a clear distinction between digesta and mucosa samples, reflecting an unequal distribution of community in the GIT.

Microbial population quantification by qPCR

A primary finding of our study is that there are important variations within bacterial and archaeal populations' density (Figure 4) in the lumen and in the mucosal tissue along the GIT. As expected, both groups are similar among samples from lumen in the forestomach and in the large intestine than among samples from the small intestine, but the number of bacterial 16S rRNA gene is around three orders of magnitude higher than the archaeal ones (Fig. 4). The monitoring of microbial populations throughout the GIT depicts large variations in the copy number of 16S rRNA gene (Fig. 4a and 4b). Taken together with microbial OTU richness data (Figs. 3a and 3b), our conclusions that populations are dynamic and point to the necessity of a complete sampling strategy in order to recover most of microbial diversity are supported.

By pyrosequencing we have previously demonstrated (Oliveira et al., 2013) that most of the differences among cecum and rumen bacterial diversity were within populations involved in cellulose degradation. The higher number of archaeal and bacterial 16S rRNA copies recovered from cecum sample (Figs. 4a and 4b) is probably linked to post-ruminal cellulose degradation that occurs in that GIT segment. Particularly, the sample from the bottom of the cecum harbors more dense communities in the lumen comparing with sample from the top and middle-cecum what could be explained by the anatomy of that segment, resulting in longer retention time of the digesta in the bottom. However, the longer digesta retention time doesn't result in more dense populations in the mucosa, what is especially true for archaea, showing a host effect in selecting and maintaining microbes adhered to its mucosa. These findings confirm that our sampling procedure could detect regional differences even within a relatively short GIT segment such as the cecum.

When comparing population (Figs. 4a and 4b) and richness (Figs. 3a and 3b) in the lumen, a more dense bacterial population with lower richness was found in the omasum, showing that digesta compression results in increases of a small group within the microbial populations in that GIT segment. The reticulum was the only sample in the forestomach in which archaeal population in the mucosal tissue was higher than in the lumen, probably reflecting the fact that the feed has a low archaeal concentration, since the reticulum is a site where the feed passes before it reaches the rumen.

The small intestine is the major site for the absorption of nutrients and drugs, what is accomplished through the enormous surface area available in this organ whose surface is covered by villi (Kararli, 1995). Surface colonization by microorganisms allows an extensive cross-talk between the gut bacteria and between those and the animal, and has important function in shaping mammalian immunity (Hooper*, et al.*, 2012, Aziz*, et al.*, 2013). Additionally, host-microbes interactions are controlled by gut epithelia mechanisms that actively sense enteric bacteria, playing an essential role in maintaining homeostasis at the mucosal interface (Vaishnava*, et al.*, 2008). Mucosa-associated populations become predominant in samples from the small intestine, what is more evident in the jejunum, since in the duodenum acid resistant bacteria (Fig. 4a), but not archaea (Fig. 4b), still remains after digesta passes from abomasum to duodenum. Our results indicate that as the digesta transit time through the small intestine is relatively fast, it limits microbial growth in the lumen, while the mucosal-tissue harbors a denser microbiota which is probably being selected by host factors.

To the best of our knowledge, only one paper has quantitatively assessed bacterial populations in the mucosa and in the lumen in different segments of the GIT (Malmuthuge*, et al.*, 2012), whose results show that both GIT region and sample type have a significant impact on bacterial density of 6-month old calves but not in 3-week old calves. Our results differ in the fact that the bacterial density of mucosa-associated populations is higher than in the digesta in samples from the small intestine, specifically in the jejunum and in the ileum. As in that paper differences could be detected only in 6-months calves and we have sampled an adult steer, this indicate that important microbial adaptation to the GIT environment occurs during animal growth, possibly reflecting in the observed differences among studied animals. Also, these differences could be attributed to the breed or management practice effects, but as the GIT of mammals is a well conserved system through evolution, we speculate that even if microbial diversity in the GIT is affected by those characteristics, the differences in population abundance and segregation between lumen and tissue should still be detected.

Although the importance of ruminal fermentation to overall metabolism of animal, important processes occur in other parts of the GIT, such as protein degradation and nutrient absorption in the small intestine (Armstrong & Smithard, 1979), and post-ruminal cellulose degradation in the cecum (Armstrong & Smithard, 1979). Additionally to their contribution to the energy metabolism, microbes are known to establish interactions with the host tissue, modulating their immune system and tissue development (Hooper*, et al.*, 2012, Taschuk & Griebel, 2012), besides acting as a protective barrier against pathogens (Chaucheyras-Durand & Durand, 2010). Those functions have been studied in humans, where special attention has been paid to elucidate the association among GIT microbiome and diseases (Wallace*, et al.*, 2011).

The GIT of ruminants have received considerable attention due their contribution to animal health and performance, but most of studies have been restricted to sampling of ruminal or feces content for microbial characterization, especially within Bacteria domain, and we have previously demonstrated how that sampling approach cannot be used as proxies to other GIT segments (Oliveira et al., 2013). On other hand, the presence and diversity of archaea and fungi in the digesta and associated to the mucosa is far from complete. Only a few studies have investigated regional variations in the GIT (Frey*, et al.*, 2010, Malmuthuge*, et al.*, 2012), but none of them had addressed how variable microbial communities could be within a same GIT segment.

Taken together, our results show that the microbial ecology in the GIT of a bovine is more complex than previously thought, and that a deep sampling approach comprising all GIT segments and microbial groups should be performed to have a more detailed view of processes taking place in the GIT and how they affect the host phenotype.

Conclusions

This study provides important insights onto microbiological characterization of the entire gastrointestinal tract for ruminants, showing that profound shifts in the microbial populations occur in all compartments of the GIT of a bovine. No definitive biological conclusion on how and why those populations are selected in each segment was draw, but it is important to emphasize that the major aim of this study was to investigate the existence of differences in the microbial composition in the GIT. Results here found show that a deep sampling approach is required to have a more detailed view of microbiota in the GIT, since bacterial, archaeal and fungal population diverge in different segments of the GIT and also among digesta and tissue samples from the same GIT section.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES and CNPq Brazilian funding agencies. We would like to thank Dr. Renato Sampaio and Dr. Luiz Antônio Josahkian from the Brazilian Association of Zebu Breeders, for their assistance in sampling.

References

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E & Lipman D (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.

Armstrong DG & Smithard RR (1979) Fate of Carbohydrates in the Small and Large-Intestines of the Ruminant. *Proc. Nutr Soc* **38**: 283-294.

Assis RCL, Luns FD, Araujo JV & Braga FR (2012) Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Exp Parasitol* **132**: 373-377.

Aziz Q, Dore J, Emmanuel A, Guarner F & Quigley EM (2013) Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastr Motil* **25**: 4-15.

Chaucheyras-Durand F & Durand H (2010) Probiotics in animal nutrition and health. *Benef Microbes* **1**: 3-9.

Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X & Xiang C (2012) Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* **7**: e39743.

Dehority BA (2003) Rumen microbiology. *Nottingham University Press*.

Delong EF (1992) Archaea in Coastal Marine Environments. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5685-5689.

Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R & Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4117-4120.

Frey J, Pell A, Berthiaume R*, et al.* (2010) Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. *J Appl Microbiol* **108**: 1982-1993.

Frey JC, Pell AN, Berthiaume R*, et al.* (2010) Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. *J Appl Microbiol* **108**: 1982-1993.

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S*, et al.* (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* **4**: 634-643.

Hanhela R, Louhelainen K & Pasanen AL (1995) Prevalence of microfungi in Finnish cow barns and some aspects of the occurrence of *Wallemia sebi* and *Fusaria*. *Scand J Work Environ Health* **21**: 223-228.

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K & Wellington EMH (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *App Environ Microbiol* **63**: 3233-3241.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF*, et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**: 509-547.

Hooper LV, Littman DR & Macpherson AJ (2012) Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* **336**: 1268-1273.

Huse SM, Ye YZ, Zhou YJ & Fodor AA (2012) A Core Human Microbiome as Viewed through 16S rRNA Sequence Clusters. *PLoS One* **7**.

Jami E & Mizrahi I (2012) Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One* **7**: e33306.

Janssen PH & Kirs M (2008) Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3619-3625.

Jurgens G, Lindstrom K & Saano A (1997) Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Appl Environ Microbiol* **63**: 803-805.

Kararli TT (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm Drug Dispos* **16**: 351-380.

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML & Pace NR (1985) Rapid-Determination of 16s Ribosomal-Rna Sequences for Phylogenetic Analyses. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6955-6959.

Larkin M, Blackshields G, Brown N*, et al.* (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R & Gordon JI (2008) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* **6**: 776-788.

Magalhaes GM, Saut JPE, Beninati T*, et al.* (2012) Cerebral *Cryptococcomas* in a Cow. *J Comp Pathol* **147**: 106-110.

Malik R, Alderton B, Finlaison D*, et al.* (2002) Cryptococcosis in ferrets: a diverse spectrum of clinical disease. *Aust Vet J* **80**: 749-755.

Malmuthuge N, Li M, Chen Y*, et al.* (2012) Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *FEMS Microbiol Ecol* **79**: 337-347.

Malmuthuge N, Li M, Chen Y*, et al.* (2012) Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**: 337-347.

May LA, Smiley B & Schmidt MG (2001) Comparative denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities associated with whole plant corn silage. *Can J Microbiol* **47**: 829-841.

Mitsumori M, Nakagawa S, Matsui H, Shinkai T & Takenaka A (2010) Phylogenetic diversity of gene sequences isolated from the rumen as analysed using a self-organizing map (SOM). *J Appl Microbiol* **109**: 763-770.

Moretti A, Pasquali P, Mencaroni G, Boncio L & Fioretti DP (1998) Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (Yeasts and Bacteria). *J Vet Med* **45**: 129-132.

Nava GM, Carbonero F, Croix JA, Greenberg E & Gaskins HR (2012) Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *Isme Journal* **6**: 57-70.

Nubel U, Engelen B, Felske A*, et al.* (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**: 5636-5643.

Oliveira, MNV, Jewell, KA, Freitas, FS, Benjamin, LA, Totola, MR, Borges, AC, Moraes, CA, Suen, G (2013) Characterizing the Microbiota across the Gastrointestinal Tract of a Brazilian Nelore Steer. *Vet Microbiol* In Press

Oros-Sichler M, Gomes NCM, Neuber G & Smalla K (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *J Microbiol Methods* **65**: 63-75.

Raskin L, Stromley JM, Rittmann BE & Stahl DA (1994) Group-Specific 16s Ribosomal-Rna Hybridization Probes to Describe Natural Communities of Methanogens. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1232-1240.

Russell JB & Rychlik JL (2001) Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* **292**: 1119-1122.

Rutledge RG & Cote C (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* **31**: e93.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.

Taschuk R & Griebel PJ (2012) Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev* **13**: 129-141.

Torres-Acosta JFJ, Molento M & de Gives PM (2012) Research and implementation of novel approaches for the control of nematode parasites in Latin America and the Caribbean: Is there sufficient incentive for a greater extension effort? *Vet Parasitol* **186**: 132-142.

Trinci APJ, Davies DR, Gull K, Lawrence MI, Nielsen BB, Rickers A & Theodorou MK (1994) Anaerobic Fungi in Herbivorous Animals. *Mycol Res* **98**: 129-152.

Turkington TK, Clear RM, Demeke T, Lange R, Xi K & Kumar K (2011) Isolation of *Fusarium graminearum* from cereal, grass and corn residues from Alberta, 2001-2003. *Can J Plant Pathol* **33**: 179-186.

Vainio EJ & Hantula J (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res* **104**: 927-936.

Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L & Hooper LV (2008) Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 20858-20863.

Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W & Possemiers S (2011) The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 681-704.

Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E & Sanders ME (2011) Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev* **69**: 392-403.

Waller PJ & Thamsborg SM (2004) Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends Parasitol* **20**: 493-497.

.

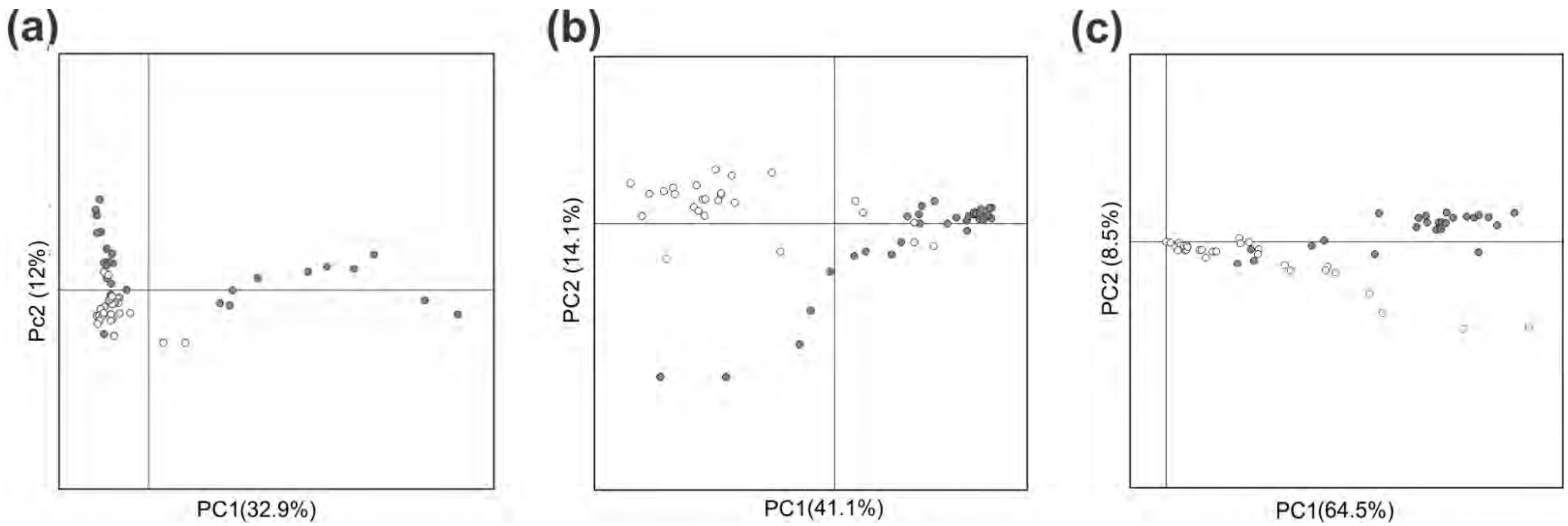


Fig. 1. Two-dimensional principal component analysis of (a) bacterial, (b) archaeal and (c) fungal diversity along gastro intestinal tract of a ruminant. The percentage of variation explained by PC1 and PC2 are indicated in the axis. White circles - mucosa samples; grey circles – digesta samples

.

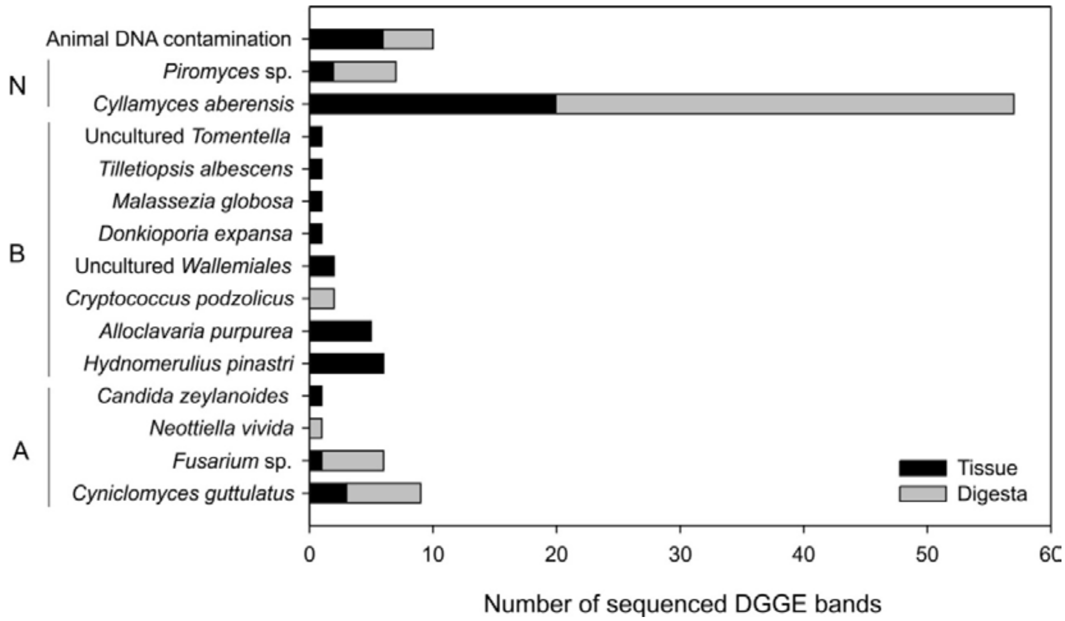


Fig. 2. Distribution of 18S rRNA sequences recovered from digesta and mucosa-associated samples from the gastro intestinal tract of a bovine. DGGE bands were eluted, sequenced and compared against the nucleotide database available in the GenBank.

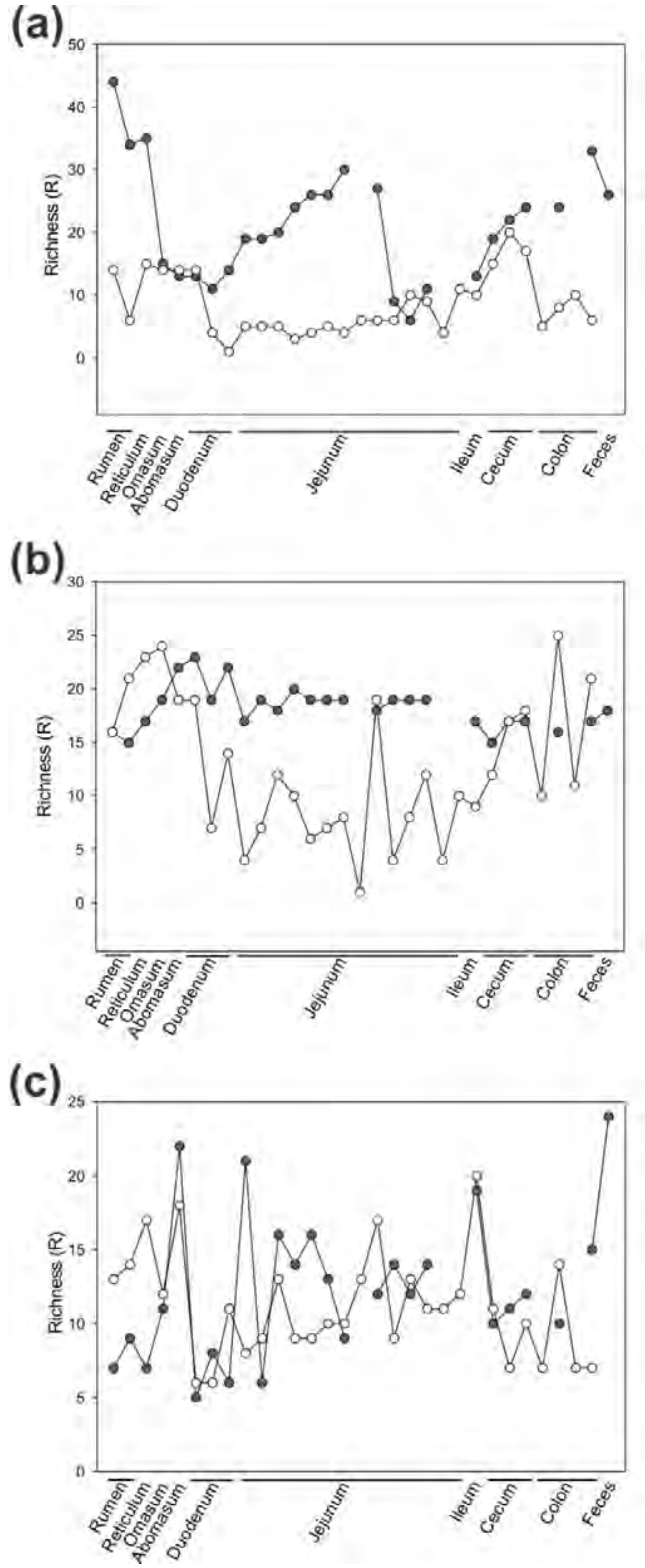


Fig. 3. Graphics depicting the bacterial (a), archaeal (b) and fungal (c) OTU richness calculated as the sum of DGGE bands for each sample. White circles – mucosa samples; grey circles – digesta samples.

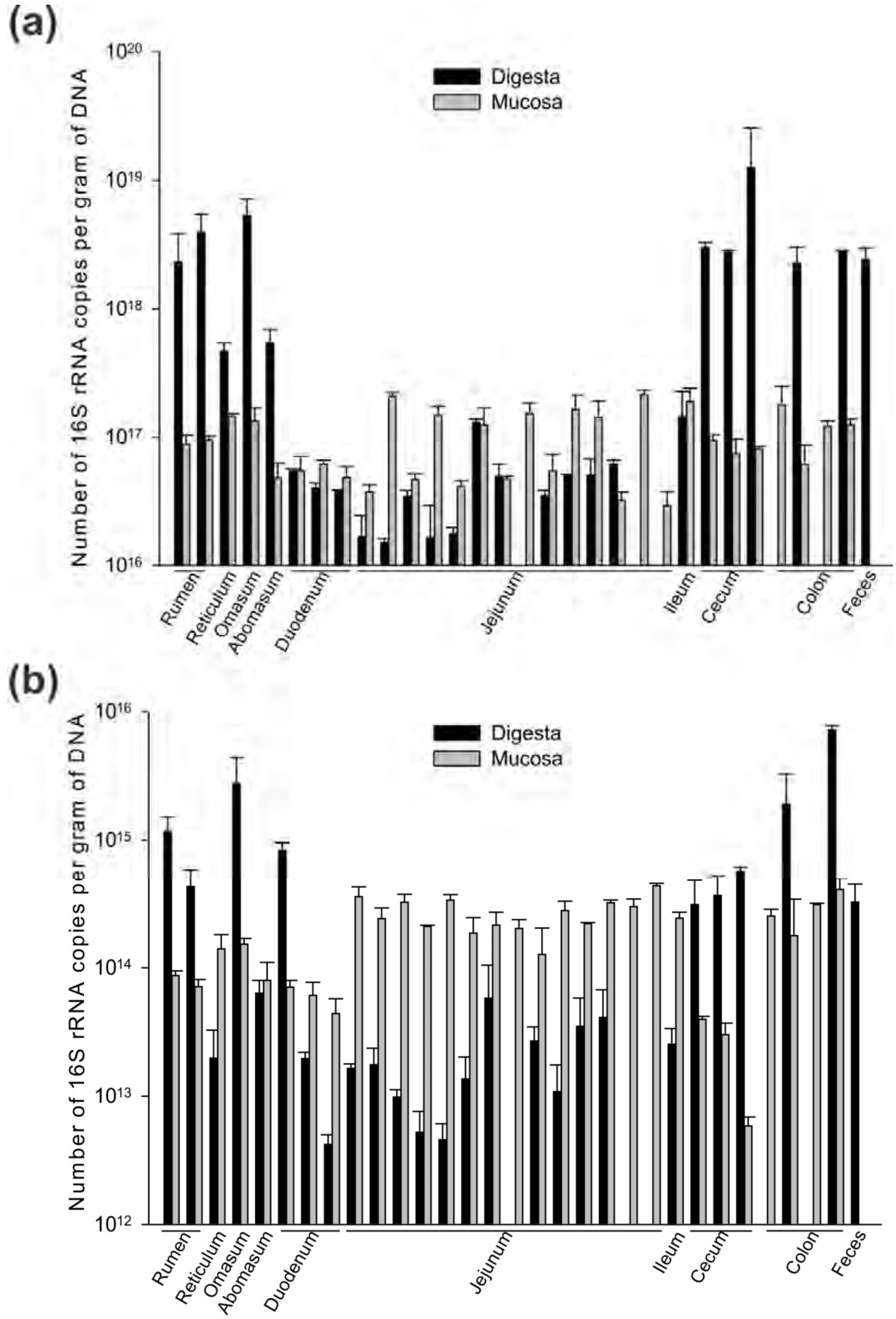


Fig. 4. Copy number of bacterial (a) and archaeal (b) 16S rRNA gene per gram of DNA recovered from samples throughout the gastrointestinal tract of a Nelore steer.

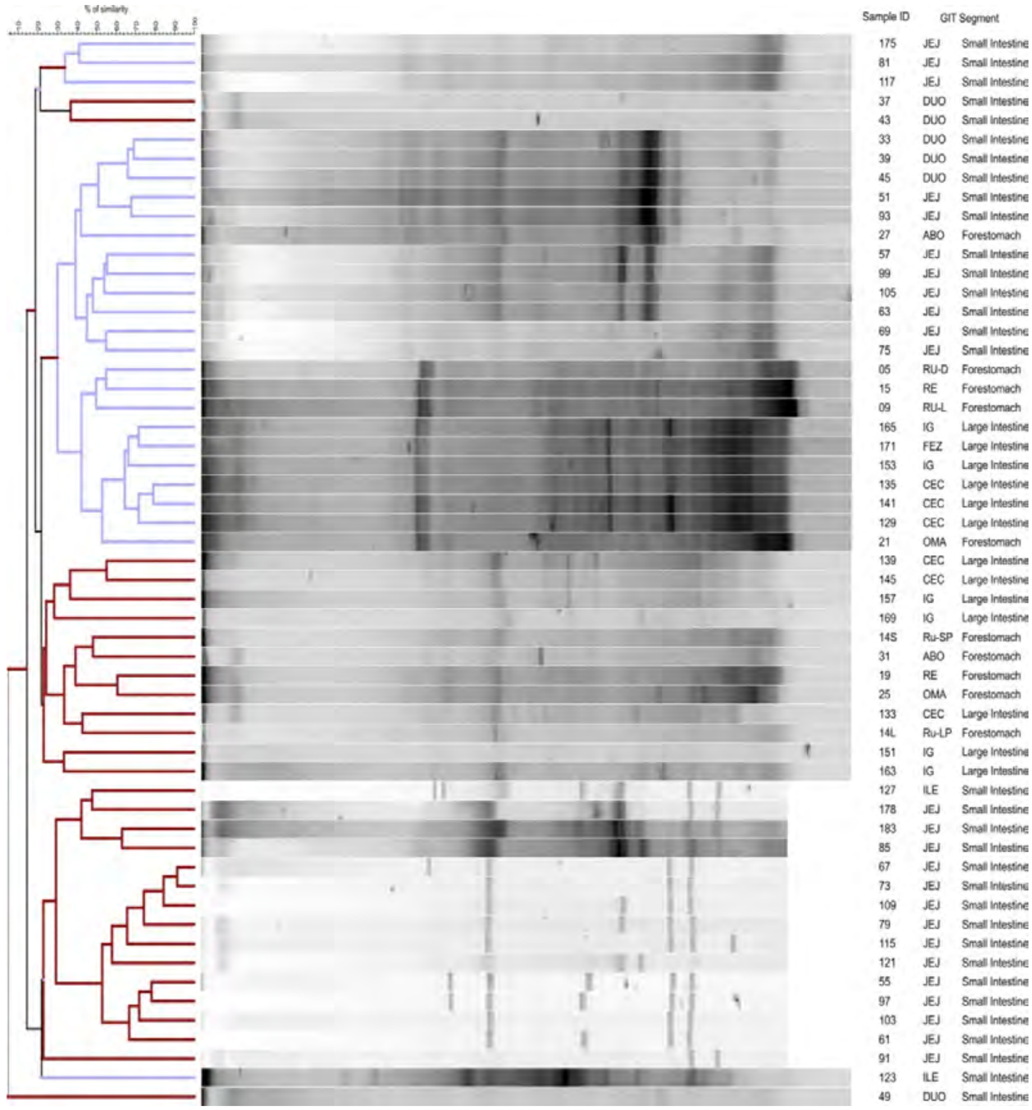


Fig. S1. Clustering analysis of PCR-DGGE profiles generated from digesta and from mucosa samples collected from the gastrointestinal tract of a Nelore steer using universal primers targeting the bacterial 16S rRNA gene. The sample ID is indicated above each. In the dendrogram, branches from digesta samples are in blue and those from mucosa samples are in red. The comparison of profiles was generated with the BioNumerics software (version 6.0). The scale indicates the level of similarity based on Dice's coefficient. Blue lines – digesta samples; red lines – mucosa samples.

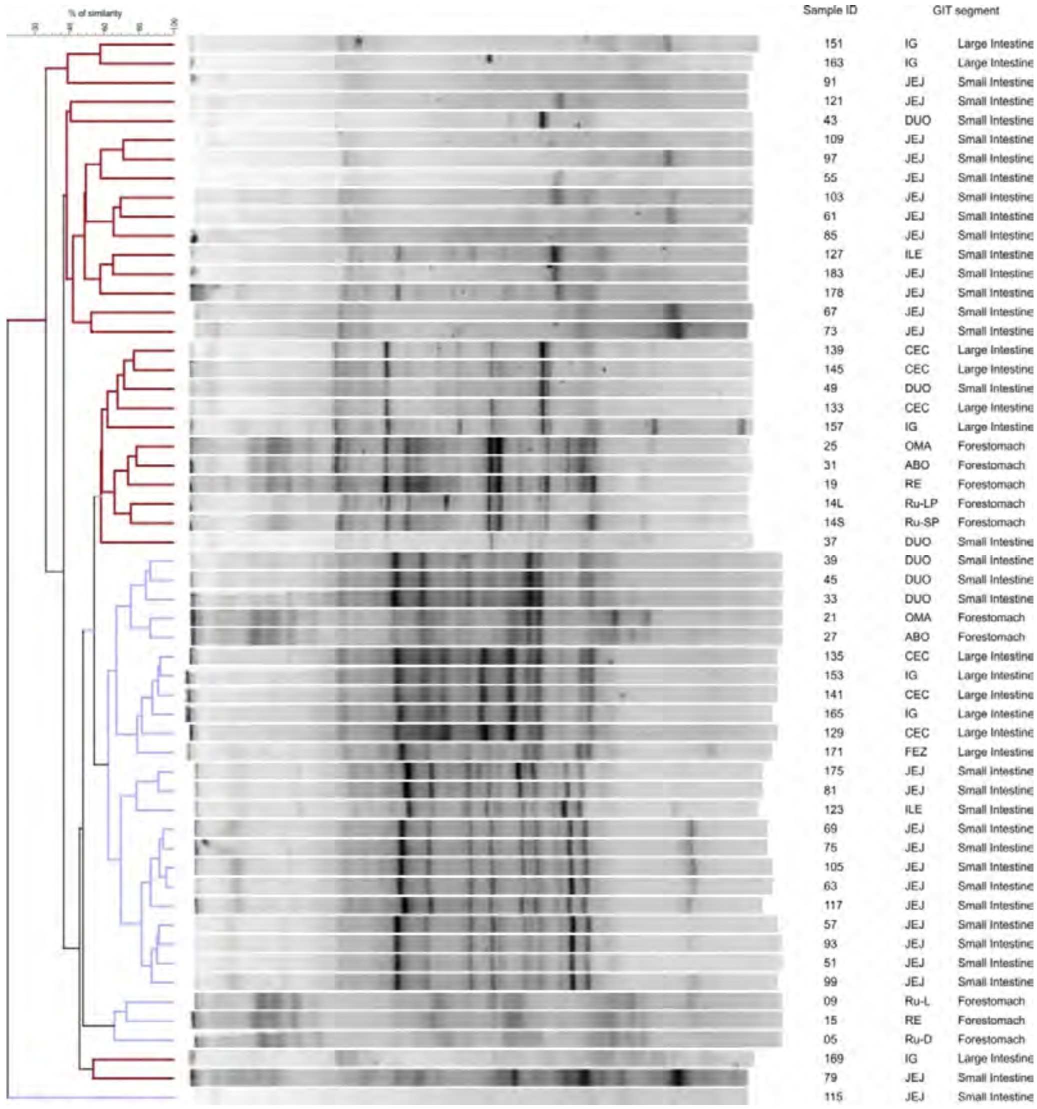


Fig. S2. Clustering analysis of PCR-DGGE profiles generated from digesta and from mucosa samples collected from the gastro intestinal tract of a Nelore steer using universal primers targeting the archaeal 16S rRNA gene. The sample ID is indicated above each lane. In the dendrogram, branches from digesta samples are in blue and those from mucosa samples are in red. The comparison of profiles was generated with the BioNumerics software (version 6.0). The scale indicates the level of similarity based on Dice’s coefficient. Blue lines – digesta samples; red lines – mucosa samples.

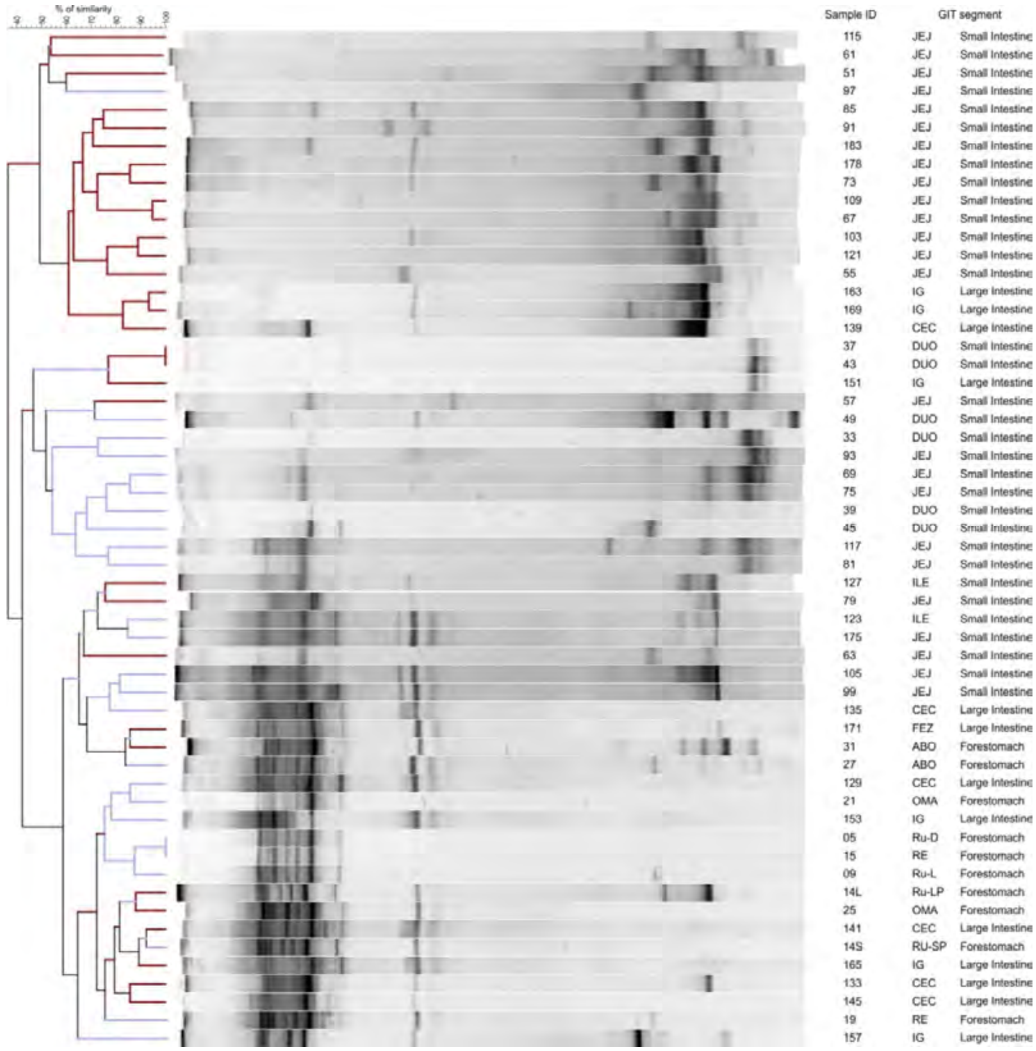


Fig. S3. Clustering analysis of PCR-DGGE profiles generated from digesta and from mucosa samples collected from the gastro intestinal tract of a Nelore steer using universal primers targeting the fungal 18S rRNA gene. The sample ID is indicated above each lane. In the dendrogram, branches from digesta samples are in blue and those from mucosa samples are in red. The comparison of profiles was generated with the BioNumerics software (version 6.0). The scale indicates the level of similarity based on Dice's coefficient. Blue lines – digesta samples; red lines – mucosa samples.

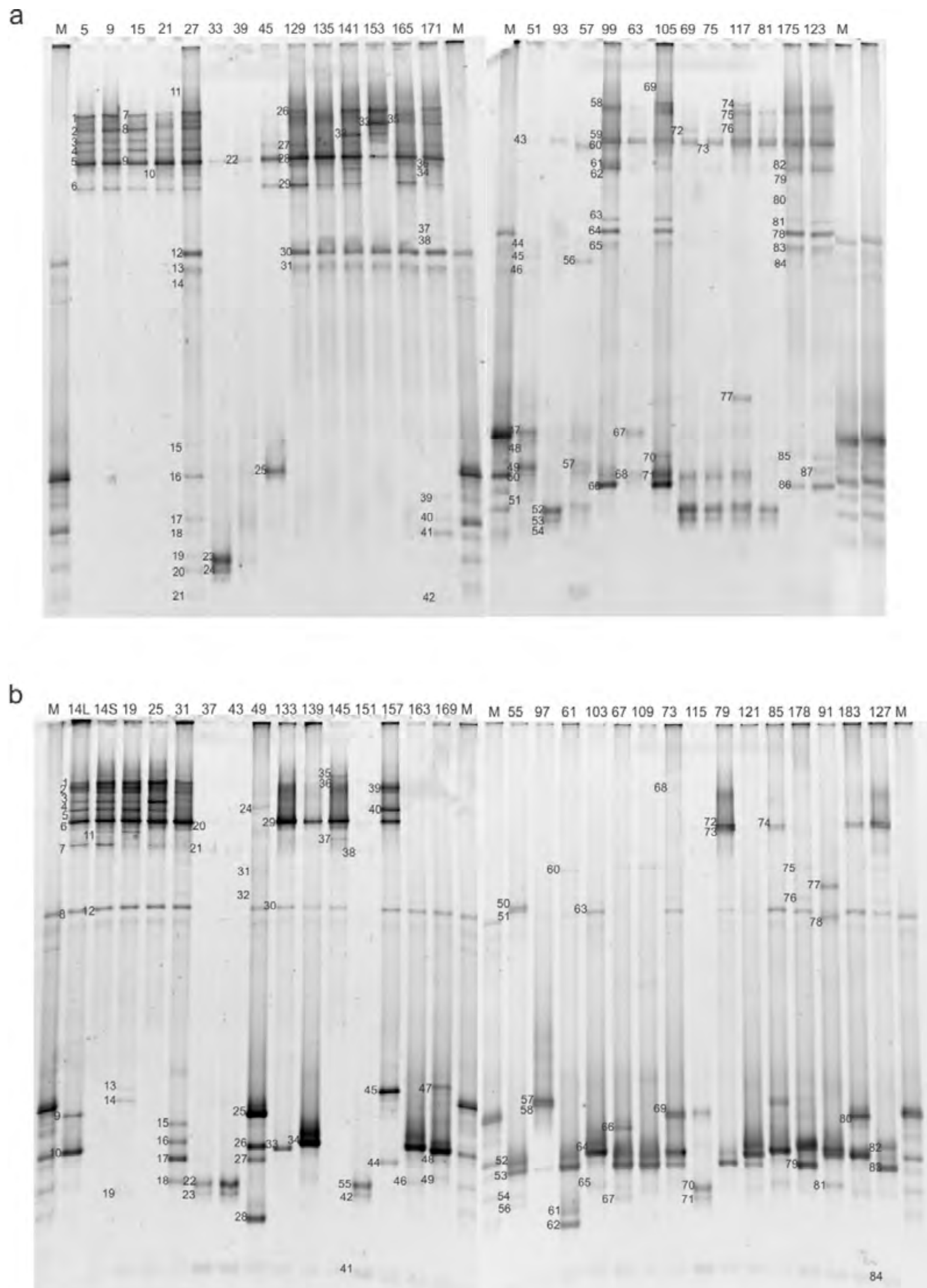


Fig. S4. DGGE gels of partial 18S rRNA genes amplified from fungal communities in (a) digesta and (b) mucosa samples collected from the gastro intestinal tract of a Brazilian Nelore steer. Numbers in the figure were used to identify what bands were eluted and sequenced.

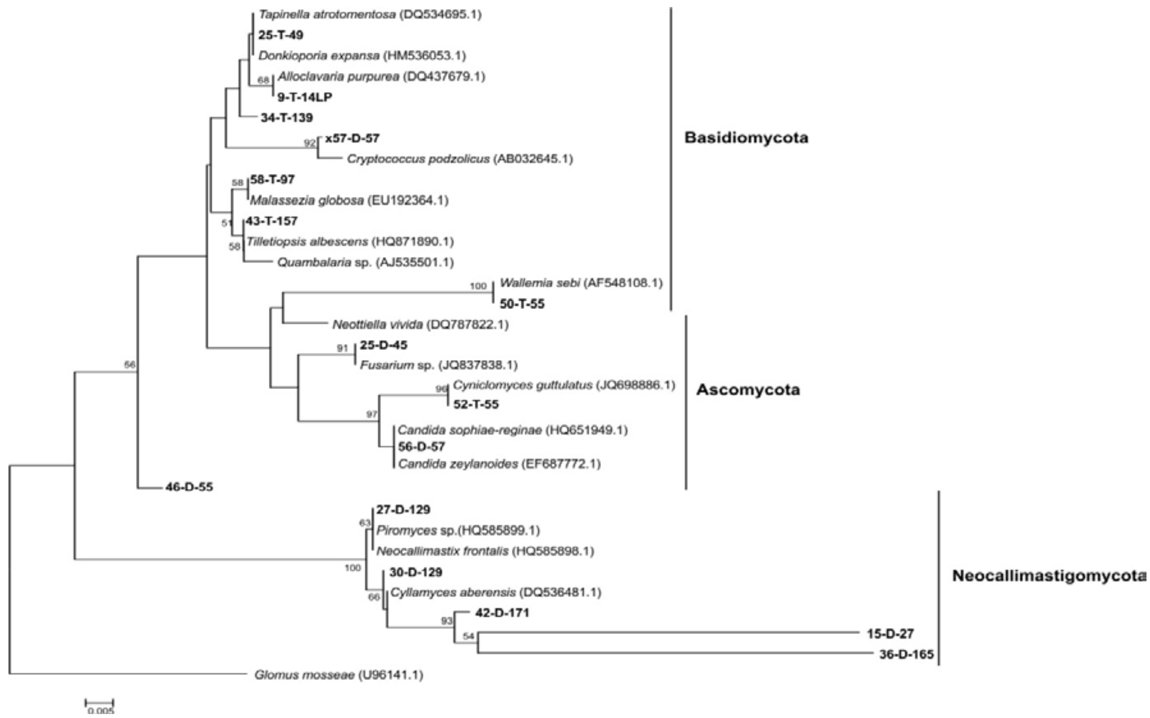


Fig. S5. Neighbor-joining phylogenetic tree of fungal 18S rRNA gene sequences rooted by 18S rRNA gene sequence of *Glomus mosseae*. Sequences were obtained by sequencing DGGE bands, and OTUs selected to reconstruct the phylogeny were defined at 97 % identity level.

Table S1. Sample identification number (Sample ID) and description of location and GIT segment of sampling.

Sample ID number	Location	GIT segment
5	Digesta	Solid Rumen fraction
9	Digesta	Liquid Rumen fraction
15	Digesta	Reticulum
21	Digesta	Abomasum
27	Digesta	Omasum
33	Digesta	Proximal Duodenum
39	Digesta	Middle Duodenum
45	Digesta	Distal Duodenum
51	Digesta	Jejunum 1st intestinal handle
93	Digesta	Jejunum 5th intestinal handle
57	Digesta	Jejunum 10th intestinal handle
99	Digesta	Jejunum 15th intestinal handle
63	Digesta	Jejunum 20th intestinal handle
105	Digesta	Jejunum 25th intestinal handle
69	Digesta	Jejunum 30th intestinal handle
75	Digesta	Jejunum 40th intestinal handle
117	Digesta	Jejunum 45th intestinal handle
81	Digesta	Jejunum 50th intestinal handle
175	Digesta	Jejunum 55th intestinal handle
123	Digesta	Ileum
129	Digesta	Top Cecum
135	Digesta	Middle Cecum
141	Digesta	Bottom Cecum
153	Digesta	External handle of the Ascendent colon
165	Digesta	Descendent Colon
171	Digesta	Feces
14LP	Mucosa	Rumen Large Papillae
14SP	Mucosa	Rumen Small Papillae
19	Mucosa	Reticulum
25	Mucosa	Omasum
31	Mucosa	Abomasum
37	Mucosa	Proximal Duodenum

43	Mucosa	Middle Duodenum
49	Mucosa	Distal Duodenum
55	Mucosa	Jejunum 1st intestinal handle
97	Mucosa	Jejunum 5th intestinal handle
61	Mucosa	Jejunum 10th intestinal handle
103	Mucosa	Jejunum 15th intestinal handle
67	Mucosa	Jejunum 20th intestinal handle
109	Mucosa	Jejunum 25th intestinal handle
73	Mucosa	Jejunum 30th intestinal handle
115	Mucosa	Jejunum 35th intestinal handle
79	Mucosa	Jejunum 40th intestinal handle
121	Mucosa	Jejunum 45th intestinal handle
85	Mucosa	Jejunum 50th intestinal handle
178	Mucosa	Jejunum 55th intestinal handle
91	Mucosa	Jejunum 60th intestinal handle
183	Mucosa	Distal Jejunum intestinal handle
127	Mucosa	Ileum
133	Mucosa	Top Cecum
139	Mucosa	Middle Cecum
145	Mucosa	Bottom Cecum
151	Mucosa	Internal handle of the Ascendent Colon
157	Mucosa	External handle of the Ascendent
163	Mucosa	Transverse Colon
169	Mucosa	Descendent Colon

Table S2. Sequences amplification conditions of the 16S and 26S rRNA gene-targeted primers used in this study.

Analysis	Target purposed	Primer name Primer sequence (5'→3')	Reference	Amplicon size	Initial Denaturation	Amplification cycle
PCR-DGGE	Archaea	Arch344f ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA	(Raskin, *et al.*, 1994)	605 bp	94 ^{o}C 5 min	(10x) 94 ^{o}C 30 s 61-56 ^{o}C 30 s 72 ^{o}C 1 min
		927r CCCGCCAATTCCTTTAAGTTTC	(Jurgens, *et al.*, 1997)			(30x) 94 ^{o}C 30 s 56 ^{o}C 30 s 72 ^{o}C 1 min
	Archaea Nested-PCR	Arch344fGC ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA		230 bp		
		517r ATTACCGCGGCTGCTGG	(Lane, *et al.*, 1985)			72 ^{o}C 7 min
	Bacteria	984GC gc.-AACGCGAAGAACCTTAC	(Heuer, *et al.*, 1997)	434 bp	94 ^{o}C 5 min	(30x) 94 ^{o}C 1 min 53 ^{o}C 1 min 72 ^{o}C 2 min
		R1378 CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG				72 ^{o}C 10 min
	Fungi	NS1 GTAGTCATATGC TTGTCTC	(May, *et al.*, 2001)	1800 bp	94 ^{o}C 4 min	(35x) 94 ^{o}C 1 min 47 ^{o}C 1 min 72 ^{o}C 2 min
		EF3 TCCTCTAAATGACCAAGTTTG	(Oros-Sichler, *et al.*, 2006)			72 ^{o}C 10 min

	Fungi Nested-PCR	FR1GC AICCATTCAATCGGTAIT FF390 CGATAACGAACGAGACCT	(Vainio & Hantula, 2000)	350 bp	94 °C 4 min	(35x) 94 °C 1 min 50 °C 1 min 72 °C 1 min 72 °C 10 min
	GC-Clamp	gc. CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGG	(Nubel, *et al.*, 1996)			
Real-Time	Bacteria	Eub338f ACTCCTACGGGAGGCAGCAG Eub518r ATTACCGCGGCTGCTGG	(Fierer, *et al.*, 2005)	190 bp	95 °C 20s	(30x) 95 °C 3 s 60 °C 1 min
	Archaea	Arch 344f ACGGGGCGCAGCAGGCGCGA 517r ATTACCGCGGCTGCTGG	(Raskin, *et al.*, 1994) (Lane, *et al.*, 1985)	190 bp		
Plasmid-construction	Bacteria	P027f GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1378r CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	(Lane, *et al.*, 1985) (Heuer, *et al.*, 1997)	1506 bp	94 °C 5min	(30x) 94 °C 1 min 53 °C 1 min 72 °C 2 min 72 °C 10 min
	Archaea	21f TTCCGGTTGATCCYGCCGGA 958r YCCGGCGTTGAMTCCAATT	(Delong, 1992)	919 bp		(35x) 94 °C 30 s 56 °C 30 s 72 °C 1 min 72 °C 7 min

CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho foi demonstrada a existência de grande diversidade microbiana ao longo do trato gastrointestinal (TGI) de um animal da raça Nelore, oriundo do município de Uberaba, no Estado de Minas Gerais, Brasil. Embora os resultados tenham sido obtidos a partir do estudo de um animal da raça Nelore, a existência de populações distintas no lúmen e associadas à mucosa possivelmente poderá ser identificada em outros animais, uma vez que o processo evolutivo no TGI de mamíferos é conservada e a distribuição encontrada pode estar relacionada à função exercida pelos micro-organismos.

O objetivo primário deste trabalho foi o de desenvolver de estratégia de amostragem para avaliar a diversidade de comunidades microbianas associadas das diferentes regiões anatômicas do TGI de um bovino da raça Nelore. O procedimento descrito confirmou a existência de grande variabilidade das comunidades microbianas nas diferentes regiões do TGI, e permitiu identificar as variações mesmo em regiões próximas de um mesmo segmento intestinal, fato descrito pela primeira vez na literatura.

Embora a maior parte dos trabalhos na literatura aborde a diversidade bacteriana em rúmen e/ou em fezes de ruminantes, demonstrou-se que o TGI, ao longo de toda sua extensão, é colonizado por membros dos domínios Archaea e Bacteria, além de membros do reino Fungi. A segregação observada entre as comunidades microbianas presentes no lúmen e aquelas associadas à mucosa do epitélio demonstra que tais comunidades estão sujeitas a diferentes pressões de seleção no TGI, as quais afetam tanto a diversidade como a densidade das populações no lúmen e também na mucosa.

A caracterização da comunidade utilizando tecnologia de sequenciamento em grande escala representa o primeiro trabalho a descrever as comunidades microbianas em todos os segmentos do TGI de um bovino. Este estudo também revelou que amostras de rúmen ou de fezes não podem ser utilizadas para predizer a microbiota em outros segmentos ou regiões do TGI de bovinos, resultado relevante quando se considera que grande parte da diversidade microbiana, a qual está diretamente associada à saúde do animal, não tem sido investigada nos estudos de microbiologia de ruminantes.

Os resultados obtidos neste trabalho representam a primeira caracterização do microbioma associado ao trato gastrointestinal de bovinos da raça Nelore, sendo estes resultados inéditos, com relevantes implicações em futuros estudos de microbiologia de ruminantes. Esses resultados são da maior relevância quando se considera que a diversidade microbiana, sua funcionalidade e as interações, que estão diretamente associadas à saúde do animal e não têm sido investigada nos estudos de microbiologia do TGI em bovinos.

Com base nos trabalhos que se seguiram aos de caracterização de microbiomas em humanos, antecipa-se a relevância dos dados para os estudos da nutrição e dos distintos sistemas de manejo do rebanho de nelores com o objetivo de se obter maior produtividade do animal, maximizando a expressão do potencial genético da raça Nelore. Espera-se que os estudos subsequentes permitam dados para melhorar o desempenho nutricional de bovinos Nelore com o melhor aproveitamento de fontes de alimentos e também com menor pressão sobre a expansão de áreas para pastagem. A modulação possível da microbiota do animal poderá resultar em ganhos para o meio ambiente pela diminuição da emissão de metano pela eructação.

Os horizontes do projeto aqui iniciado são amplos e abrangem áreas além do manejo, saúde animal e meio ambiente. A exploração de ambientes ainda não prospectados pode levar ao descobrimento de novas drogas e enzimas, uma vez que o TGI é composto de ambientes ricos em micro-organismos em interações e, com certeza, podem trazer interessantes surpresas e perspectivas.