



Avaliação do efeito da suplementação de colostro de vaca na comunidade bacteriana das fezes de cordeiros da raça ovina Churra Galega Bragançana

Laila Cristina Lopes

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Ciências Animais no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientada por:

Prof.^{ra} Doutora Teresa Montenegro Correia

Prof.^{ra} Doutora Paula Baptista

Prof.^{ra} Doutora Juliana Morini Küpper Cardoso Perseguini

Bragança

2020

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

Agradecimentos

Agradeço, com todo o amor em meu coração, à professora Teresa Montenegro Correia que com todo zelo e preocupação me incentivou a sempre fazer o melhor e a professora Paula Baptista pela oportunidade e desafio que me mostrou a ter confiança ao longo deste trabalho. Quero agradecer em especial pela professora Teresa por toda ajuda que foi além da vida acadêmica e que com certeza me incentivou a ser uma pessoa mais generosa e mais humilde. Os ensinamentos obtidos neste trabalho foram grandes e maravilhosos, sou hoje uma pessoa mais entusiástica e que o levarei por toda a minha vida.

Quero agradecer a toda ajuda que obtive no ambiente de trabalho, especialmente à Cristina Cameirão, por todo o conhecimento que me transmitiu, toda a calma e a paciência. Sempre me ajudou e me ensinou, você merece o mundo inteiro. Quero agradecer também por todos os colegas de trabalho que me incentivaram, riram e me ajudaram de alguma forma.

Quero agradecer todo o apoio que tive dos meus colegas de intercâmbio, foi um ano lindo, de grandes conquistas para todos nós e que certamente levarei o amor e o carinho de vocês para sempre. Em especial a Tatiane Ciscoszki e ao Luíz Lopes que sempre me acalmaram, me motivaram e me influenciaram a terminar este trabalho com mais calma e leveza.

Aos meus pais e ao meu irmão por me permitirem conquistar toda essa experiência de intercâmbio e que mesmo longe nunca deixaram faltar nada e sempre senti o carinho e a preocupação. Gratidão mãe, Gratidão pai e Gratidão Ivan.

Resumo

Sendo a raça ovina Churra Galega Bragançana autóctone do nordeste de Portugal, encontra-se bem adaptada ao seu Solar, porém algumas condições ambientais são bastante adversas fazendo com que muitas vezes estes animais não expressem o seu potencial produtivo. Também é do nosso conhecimento que pequenas mudanças quer no manejo quer na alimentação podem contribuir para um melhor desempenho destes animais. Nesse sentido, surgiu a ideia de aproveitar o colostro de vaca como suplemento de cordeiros, visto que este é excedentário e muitas vezes descartado nas explorações intensivas de bovinos de leite. Neste ensaio utilizaram-se 18 ovinos da raça Churra Galega Bragançana os quais foram divididos em dois grupos: o controlo e o grupo tratamento (3 ovelhas e 6 cordeiros, cada grupo). Os cordeiros do grupo tratamento, a partir do terceiro dia de idade foram suplementados com 50ml pôr dia de colostro de duas vacas Holstein-Frísia, durante 4 semanas. Os cordeiros foram pesados aos 10, 17, 24 e 33 dias de idade. A comunidade bacteriana presente nas amostras de fezes de cordeiros, colostro de vaca e leite das mães foi avaliada recorrendo a métodos não dependentes do cultivo utilizando a plataforma *Illumina miseq*. Nas amostras de fezes, a diversidade bacteriana foi avaliada adicionalmente por métodos dependentes de cultivo, com o intuito de avaliar nos isolados obtidos a capacidade produtiva de enzimas líticas. Relativamente ao ganho médio diário (GMD) dos cordeiros, no período dos 10 dias após o nascimento, o grupo tratamento mostrou um GMD (0,232g/d) significativamente maior ($p=0,031$) que o controlo (0,127g/d), o mesmo não se verificando nos diferentes períodos. No total, os dois métodos permitiram identificar 93 géneros nas fezes e de 231 géneros nas amostras lácteas, sendo *Bacteroides* e *Acinetobacter* os géneros mais abundantes na comunidade bacteriana, respetivamente. Verificou-se que a composição da comunidade bacteriana das fezes dos cordeiros controlo é significativamente diferente ($R=0,48$; $p=0,029$) da comunidade presente nas fezes dos cordeiros que ingeriram colostro de vaca. Dos isolados bacterianos obtidos das fezes, por métodos dependentes de cultivo foram identificados três OTUs (*Acinetobacter* sp., *Jeotgalicoccus* sp. e *Bacillus* sp.) que mostraram capacidade em produzir enzimas digestivas, tais como amílase, celulase, lípase e protéase. Desta forma, estes isolados apresentam um potencial enorme na nutrição animal e adicionalmente como adjuvantes imunológicos e/ou probiótico. Apesar dos resultados obtidos serem bastante promissores dever-se-ão realizar mais estudos.

Palavras-chave: Ovinos; Composição microbiana; colostro; enzimas; fezes

Abstract

The autochthonous sheep breed Churra Galega Bragançana from the northeast of Portugal, it is well adapted to its habitat, but some environmental conditions are quite adverse, often causing these animals not express their productive potential. We also know that small changes in both management and feeding can contribute to a better improvement of these animals. In this sense, the idea arose to use cow colostrum as a supplement for lambs, as it is surplus and often discarded in intensive dairy cattle farms. In this study 18 of the Churra Galega Bragançana sheep breed were used and divided into two groups: the control and the treatment group (3 ewes and 6 lambs each). The lambs of the treatment group, from the third day of age were supplemented with 50 ml per day of colostrum from two Holstein-Friesian cows, for 4 weeks. The lambs were weighed at 10, 17, 24 and 33 days of age. The bacterial community present in the faeces samples of lambs, cow colostrum and milk from their mothers was evaluated using non-cultivation methods using the *Illumina miseq* platform. In stool samples, bacterial diversity was additionally evaluated by culture-dependent methods in order to evaluate the lytic enzyme production capacity of the isolates obtained. Regarding the average daily gain (ADG) of lambs, in the period of 10 days after birth, the treatment group showed a ADG (0.232g/d) significantly higher ($p=0.031$) than the control group (0.127g/d), the same not occurring in the different periods. In total, the two methods identified 93 genera in faeces and 231 genera in milk samples, with *Bacteroids* and *Acinetobacter* being the most abundant genera in the bacterial community respectively. It was found that the composition of the bacterial community of the control lambs' faeces is significantly different ($R=0.48$; $p=0.029$) from the community present in the faeces of lambs that ingested cow colostrum. From the bacterial isolates obtained from feces, three OTUs (*Acinetobacter sp.*, *Jeotgalicoccus sp.* and *Bacillus sp.*) were identified by cultivation-dependent methods that showed capacity to produce digestive enzymes such as amylase, cellulase, lipase and proteinase. In this way, these isolates present an enormous potential in animal nutrition and additionally as immunological and/or probiotic adjuvants. Although the results obtained are quite promising, further studies should be carried out.

Keywords: Ovine; microbial composition; colostrum; enzymes; feces

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS	X
ABREVIATURAS E SIGLAS	11
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	14
1.1 ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	14
CAPÍTULO 2: COMPOSIÇÃO MICROBIANA E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DIGESTIVO DOS RUMINANTES.....	17
2.1 INTRODUÇÃO.....	17
2.2 COLONIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA GASTROINTESTINAL.....	18
2.3 DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL E FUNÇÃO DOS MICROORGANISMOS	22
CAPÍTULO 3: COMPOSIÇÃO MICROBIANA E IMPORTÂNCIA DO COLOSTRO	24
3.1 COLOSTRO.....	24
3.2 IMPORTÂNCIA DO COLOSTRO NA RESPOSTA IMUNE INATA.....	25
3.3 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS NÃO BACTERIANAS DO COLOSTRO	27
3.4 PROPRIEDADES MICROBIANAS DO COLOSTRO E DO LEITE.....	28
3.4.1 ENZIMAS LÍTICAS.....	29
3.5 HIPÓTESE DA VIA ENTERO-MAMÁRIA	31
CAPÍTULO 4: OUTRAS POSSIBILIDADES NA UTILIZAÇÃO DO COLOSTRO E DAS FEZES.....	33
4.1 UTILIZAÇÃO DO COLOSTRO NO CONSUMO HUMANO.....	33
4.2 PROBIÓTICOS.....	35
4.3 PREBIÓTICOS	36
4.4 TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL	37
CAPÍTULO 5: MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1 AMOSTRAGEM.....	39
5.2 ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA.....	41
5.2.1 MÉTODOS NÃO DEPENDENTES DE CULTIVO – METAGENÓMICA.....	41
5.2.2 MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO	43

5.3	AVALIAÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS	46
5.4	ANÁLISE DE DADOS DA COMUNIDADE BACTERIANA	47
CAPÍTULO 6: RESULTADOS		49
6.1	PESO DOS CORDEIROS	49
6.2	ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA	51
6.2.1	<i>DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA NAS FEZES POR MÉTODOS CULTURAIS</i> 51	
6.2.2	<i>DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA NAS FEZES POR MÉTODOS NÃO DEPENDENTES DO CULTIVO</i>	52
6.2.3	<i>DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA NO LEITE E COLOSTRO POR MÉTODOS NÃO DEPENDENTES DO CULTIVO</i>	56
6.3	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS BACTÉRIAS PRESENTES NAS FEZES	61
CAPÍTULO 7: DISCUSSÃO		64
7.1	PESO DOS ANIMAIS	64
7.2	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS FEZES DE CORDEIROS 65	
7.3	CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS AMOSTRAS LÁCTEAS	70
7.4	COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA PRESENTE ENTRE AS AMOSTRAS LÁCTEAS E FEZES	71
7.5	ATIVIDADE ENZIMÁTICA BACTERIANA.....	73
CAPÍTULO 8: CONCLUSÃO		75
8.1	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
CAPÍTULO 9: REFERÊNCIAS		77

Lista de figuras

- Figura 1.** Representação dos compartimentos e desenvolvimento dos estômagos dos ruminantes. Adaptado de WATTIAUX (1997)..... 19
- Figura 2.** Esquemas da permeabilidade de leucócitos do colostro até a absorção pelo epitélio intestinal de borregos recém-nascidos. Adaptado de CHASE et al. (2008)... 20
- Figura 3.** Percentagem do desenvolvimento dos compartimentos estomacais de ovinos em relação ao peso estomacal total, durante o desenvolvimento corporal (Adaptado de LYFORD Jr. (1988) por OLIVEIRA et al. (2019))..... 21
- Figura 4.** Imunossupressão do recém-nascido. Adaptado de CHASE et. al. (2008)..... 26
- Figura 5.** Hipótese da via entero-mamária em ruminantes. Adaptado de JIMÉNEZ, L. M (2018)..... 32
- Figura 6.** Ovinos da raça Churra Galega Bragançana. Fonte própria. 40
- Figura 7.** Peso médio (kg) dos cordeiros do controlo e do tratamento das quatro semanas. Valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p < 0,05$)..... 50
- Figura 8.** Ganho médio diário (kg) dos animais do grupo controlo e do grupo tratamento no período de 10, 17, 24 e 33 dias de idade. Valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p < 0,05$). 50
- Figura 9.** Abundância ao nível do filo, classe e família da comunidade bacteriana cultivável no total das amostras de fezes estudadas. 51
- Figura 10.** Composição da comunidade bacteriana cultivável presente nas fezes de cordeiro do controlo e do tratamento. (A) Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) realizada com o coeficiente de Bray-Curtis. (B) Abundância relativa de bactérias, ao nível da família. 52
- Figura 11.** Gráfico krona representando a abundância em cada nível taxonómico, desde o filo até ao género, da comunidade bacteriana no total das amostras de fezes analisadas por Illumina..... 53
- Figura 12.** Box-plot da mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores mínimos e máximos da (A) riqueza, (B) Índice de Shannon-Wiener e (C) abundância da comunidade bacteriana presente nas fezes de cordeiro do controlo e do tratamento.

Valores (n=4 ou 3) seguidos seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p < 0,05$).	54
Figura 13. Composição da comunidade bacteriana presente nas fezes de cordeiro do controlo e do tratamento. (A) Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) realizada com o coeficiente de Bray-Curtis. Abundância relativa de bactérias, ao nível do (B) filo, (C) classe e (D) família.	55
Figura 14. Famílias bacterianas que representaram até 50% da contribuição para a dissimilaridade média da composição bacteriana entre fezes controlo e tratamento determinadas pela análise SIMPER.	56
Figura 15. Gráficos krona representando a abundância em cada nível taxonómico, desde o filo até ao género, da comunidade bacteriana no total das amostras de (A) leite e de (B) colostro analisadas por Illumina.	57
Figura 16. Famílias bacterianas que representaram até 30% da contribuição para a dissimilaridade média da composição bacteriana entre amostras de leite e colostro de vaca determinadas pela análise SIMPER. As colunas preenchidas a preto representam famílias que surgiram unicamente nas amostras de colostro.	58
Figura 17. Box-plot da mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores mínimos e máximos da (A) riqueza, (B) Índice de Shannon-Wiener e (C) abundância da comunidade bacteriana presente no total das amostras lácteas (leite + colostro) e das fezes (controlo + tratamento). Valores (n=4-7) seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p < 0,05$).	59
Figura 18. Composição da comunidade bacteriana presente nas amostras lácteas (leite + colostro) e de fezes (controlo + tratamento). (A) Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) realizada com o coeficiente de Bray-Curtis da comunidade bacteriana agrupada por amostras (lácteas, fezes controlo e tratamento). (B) Famílias bacterianas que representaram até 50% da contribuição para a dissimilaridade média da composição bacteriana entre amostra lácteas vs. fezes controlo e amostras lácteas vs. fezes tratamento, determinadas pela análise SIMPER. As colunas preenchidas a preto representam famílias que surgiram unicamente nas amostras lácteas.	60
Figura 19. Diagrama de Venn indicando o número de (A) famílias e (B) géneros bacterianos exclusivos e partilhados entre as diferentes amostras (leite, colostro, fezes controlo e fezes tratamento) identificadas por Illumina.	61

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores médios para peso inicial (PI), peso aos 10 dias de idade (P10), peso aos 17 dias de idade (P17), peso aos 24 dias de idade (P24), peso aos 33 dias de idade (P33). 49

Tabela 2. Atividade enzimática (média da área do halo $\text{mm}^2 \pm$ erro padrão, $n=3$) de bactérias isoladas de fezes de cordeiro controlo e tratamento..... 63

Lista de abreviaturas e siglas

ACOB	Criadores da Raça Churra Galega Bragançana
ANOSIM	Análise de similaridade
ANOVA	Análise de variância
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CIMO	Centro de Investigação de Montanha
CTAB	Cetil-Trimetil-Amónio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESA	Escola Superior Agrária
F	<i>Forward</i>
Fe ³⁺	Ferro no estado Ferroso
FOS	Frutoligossacarídeos
GMD	Ganho médio diário
GOS	Glucoligossacarídeos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ICD	Infeção <i>Clostridium difficile</i>
Ig	Imunoglobulinas
IGC	Instituto Gulbenkian de Ciência
IL	Interleucinas
Inc.	Incorporação
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
LAB	Bactérias do ácido láctico
LB	Luria Bertani
LBA	Luria-Bertani agar
M	Molar
MALT	Tecido linfóide associado à mucosa
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MOS	Mananoligossacarídeo
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMDS	Ordenação não métrica multidimensional
Nº	Número
OTU	Unidades taxonómicas operacionais
PBS	Fosfato de potássio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRrs	Receptores de reconhecimento de padrões codificantes
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
R	<i>Reverse</i>

SH	Sulfidrina
SH	Percentagem de similaridade
SIMPER	Sociedade Portuguesa de Ovinotecnia e Caprinotecnia
SPOC	Tris-Acetato-EDTA
TAE	<i>T helper 1</i>
TH1	<i>T helper 2</i>
TH2	Transplante de microbiota fecal
TMF	Tris – Ácido clorídrico
Tris-HCL	Unidades formadoras de colónias
UFC	Volt
V	
bp	Pares de bases
cm	centímetros
d	dia
dDNT	Desoxinucleotídeos trifosfatos
e.g.	<i>Exempli gratia</i>
g	gramas
g/d	gramas por dia
g/L	gramas por litros
h	hora
i.e.	<i>id est.</i>
kg	kilograma
log	logarítmo
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	miliMolar
ng	nanogramas
ng/μL	nanograma por microlitro
nm	nanómetro
nm	nanomol
<i>p.e.</i>	<i>physical education</i>
p/v	peso por volume
pH	potencial hidrogeniônico
rDNA	DNA ribossómico
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA Ribosomal
v/v	volume por volume
μl	microlitros
μM	micrometro
°C	Graus Celcius

Capítulo 1: Introdução

1.1 ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

Nos ecossistemas de montanha e numa perspetiva sócio económica, a importância das raças autóctones de pequenos ruminantes no desenvolvimento regional é muito elevada, pois eles possibilitam o aproveitamento e a rentabilização das zonas marginais e a fixação das populações (CORREIA; VALENTIM, 2012). Neste sentido, a raça ovina autóctone Churra Galega Bragançana do nordeste de Portugal está bem-adaptada a regimes de produção natural em regiões com recursos alimentares escassos com técnicas de manejo pouco exigentes, associado à grande variabilidade genética, implicam muitas vezes rendimentos produtivos aquém dos desejáveis. No entanto, a vantagem de trabalhar com estes animais, é que por vezes bastam pequenas alterações ambientais ou de manejo para se verificarem efeitos produtivos relevantes (ALMEIDA et al., 2007).

No contexto de exploração acima descrito o colostro assume um papel fulcral para o recém-nascido, uma vez que este vai fortalecer o sistema imune através da transferência da imunidade passiva de forma lenta e gradual e deve ser fornecido o mais breve possível pois, a absorção de imunoglobulina tipo G (IgG) que é o anticorpo principal da resposta imune, diminui com o tempo, visto que após 24h a IgG perde a capacidade de ser assimilada pelo intestino (ALVES et al., 2015). Atualmente sabemos que o colostro poderá fornecer imunidade ao animal de outras formas para além do fornecimento de imunoglobulinas (BARRINGTON; PARISH, 2001). As propriedades do colostro podem influenciar diretamente ou indiretamente o desenvolvimento da microbiota intestinal e conseqüentemente o controlo de alguns agentes patogénicos para o animal (DZIK et al., 2017).

A microbiota intestinal é constituída pela comunidade de microrganismos que vivem em simbiose com o animal, este ambiente contém para além de outros microrganismos (*e.g.*, fungos e protozoários) bactérias aeróbicas e anaeróbicas que são capazes de degradar

alimentos polissacarídeos que são indigestíveis, beneficiar o hospedeiro com a produção de vitaminas, enzimas e outras substâncias (*e.g.*, bacteriocinas) capazes de provocar alterações na microbiota do sistema digestivo e dessa forma favorecer o sistema imune contribuindo para a manutenção do animal saudável (THAISS et al., 2016; ZHANG et al., 2018). Por sua vez, o sistema imune inato deteta informações do estado metabólico da microbiota e transmite sinais ao hospedeiro para adaptar a fisiologia ao nível do tecido digestivo, de modo que possa ajustar a composição e a função da microbiota, portanto, o sistema imunológico pode promover o crescimento de microrganismos benéficos do intestino e contribuir para a manutenção de uma comunidade bacteriana estável (THAISS et al., 2016).

Em estudos de utilização de colostro em humanos na infância e a suplementação do mesmo em adultos, ou seja, em períodos além do pós-nascimento, resultou na prevenção de doenças autoimunes, cancro, alergias e infeção por vírus, além de poder diminuir a incidência de gastrites e melhorar a mucosa gastrointestinal (MARNILA et al., 2003). Da mesma maneira, o colostro em ruminantes é usado apenas nas primeiras horas de vida do animal, mas as propriedades advindas da continuidade da ingestão do colostro, mesmo de espécies próximas como a dos bovinos ainda não são conhecidas, e é possível que possam contribuir para o ganho médio de peso, a menor incidência de diarreias, na medida em que o colostro de vaca possa reforçar ou enriquecer o “*pool*” de bactérias simbiotes capazes de melhorar a digestibilidade e o sistema imune (GONZALEZ; DUS SANTOS, 2017). Hoje em dia sabemos que o colostro poderá fornecer imunidade ao animal de outras formas para além do fornecimento de imunoglobulinas, por possuir factores de crescimento, vitaminas, hormonas e outras substâncias benéficas (GAPPER et al., 2007; YAMAGUISHI, 2013).

Devido ao facto de o colostro possuir diversas funções, poderá entrar na composição de novos alimentos nutracéuticos e funcionais para os seres humanos (YAMAGUISHI, 2013), como uma mais valia nas explorações intensivas, nas quais a maior parte das vezes o colostro é descartado. O nosso objetivo principal é avaliar se a suplementação do colostro de vaca (*Bos taurus*) possui efeito na comunidade bacteriana nas fezes de cordeiros da raça ovina (*Ovis aries*) Churra Galega Bragançana e se esta tem impacto em parâmetros zootécnicos.

Por tudo que foi exposto, o presente estudo teve por objetivos:

1. Avaliar o impacto da suplementação do colostro de vaca no possível aumento de peso e no ganho médio diário (GMD) dos cordeiros;
2. Estudar as comunidades bacterianas presentes nas fezes de cordeiros da raça Churra Galega Bragançana através de métodos dependentes de cultivo;

3. Avaliar a composição bacterianas presentes no colostro de vaca, no leite de ovelha e nas fezes de cordeiros utilizando métodos independentes de cultivo;
4. Explorar as similaridades e as dissimilaridade da composição bacteriana e relacionar o efeito da microbiota do colostro de vaca da microbiota das fezes de cordeiros;
5. Avaliar e comparar a atividade enzimática dos isolados bacterianos encontrados nas fezes.

A avaliação do efeito da suplementação de colostro de vaca Holstein-Frísia na comunidade bacteriana das fezes da raça Churra Galega Bragançana será útil para os futuros trabalhos que almejam a melhoria da produção zootécnica.

Numa outra perspectiva, a suplementação com colostro potencializará a microbiota intestinal a qual poderá ser uma fonte para o isolamento de microrganismos probióticos.

Capítulo 2: Composição microbiana e desenvolvimento do sistema digestivo dos ruminantes

2.1 INTRODUÇÃO

Os ovinos são animais mamíferos (classe - *Mammalia*), da Ordem *Arteriodactyla* (mamíferos com patas e cascos), subordem *Ruminantia*, família *Bovidae*, Subfamília *Caprinae*, Género *Ovis*, Espécie *Ovis aries*. Os ovinos da raça Churra Galega Bragançana são uma raça autóctone com relações filogénicas com *Ovis aries Studert*, os aspetos de produção da área geográfica do nordeste de Portugal (Concelhos de Bragança e Vinhais, e parte dos concelhos de Macedo de Cavaleiros, Vimioso, Mirandela, Chaves e Valpaços), determinam a evolução dum tipo de animal diferenciado, com características genéticas bem ajustadas às condições dos ecossistemas de montanha, de modo que essas adaptações possibilitam o maior aproveitamento e rentabilização de zonas marginais (CORREIA; VALENTIM, 2012; SPOC, s.d).

As modificações dos animais ruminantes, relativamente aos não ruminantes, começam pela sua dentição, visto que não possuem dentes incisivos superiores (KÖNIG; LIEBICH, 2011). Outra modificação dos ruminantes está presente na saliva, pois não possuem a enzima α -amílase e o pH da saliva é alcalino (atua no tamponamento do rúmen) e no esófago, o qual influencia a eructação e a ruminação (BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA; RIBEIRO, 2006; PAGANI, 2008). Os ruminantes também possuem capacidade de aproveitar de forma eficiente os carboidratos fibrosos e compostos nitrogenados não proteicos (NNP) como fonte de energia e fonte de proteína, respetivamente (VALADARES FILHO; PINA, 2006). Isso deve-se ao facto de que o estômago dos ruminantes possuem segmentos distintos, alguns deles, são capazes de fermentar fibras pela relação simbiótica dos organismos ali existentes (*e.g.*, fungos, protozoários e bactérias) (NOSCHANG; BRAUNER, 2019).

No entanto, os investigadores em sua grande maioria, utilizam métodos dependentes de cultivo de estirpes bacterianas para caracterizar a microbiota do sistema digestivo dos ruminantes, porém esse método apenas isola algumas das principais bactérias representativas não sendo suficientes para identificar a grande maioria da microbiota não cultivável do sistema digestivo (WANG et al., 2017). Assim, os métodos dependentes de cultivo são extremamente tendenciosos na avaliação da diversidade microbiana (DOWD et al., 2008). Os métodos não dependentes de cultivo desenvolvidos na última década permitem investigar a diversidade dos microrganismos utilizando o rRNA, sem necessitar de métodos que dependem do crescimento de colônias microbianas em meio de cultivo e ainda torna possível a comparação das sequências publicadas por outros investigadores a nível mundial (DAHLLÖF, 2002).

WANG et al. (2017) encontraram utilizando métodos não dependentes de cultivo, em ovinos adultos os filos bacterianos mais dominantes, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteriano*, nos segmentos do sistema digestivo (*i.e.*, rúmen, retículo, omaso, duodeno, íleo, cécum e cólon). Em geral, as bactérias que compõem o sistema digestivo são, na sua grande maioria, anaeróbicas com ênfase nos géneros bacteroides *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* e *Fusobacterium* (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

2.2 COLONIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA GASTROINTESTINAL

Ao longo do processo evolutivo dos mamíferos, estes estiveram sujeitos a várias pressões de selecção ditadas pelos diversos meios ambientes, que conduziram a diferentes adaptações. Neste caminho e em particular os ruminantes tiveram sempre interacção com diferentes espécies microbianas e embora existisse a possibilidade de encontrarem espécies não favoráveis, prevaleceu uma relação de simbiose com diferentes microrganismos que contribuíram para a nutrição desenvolvimento e benefícios fisiológicos do hospedeiro (TASCHUK; GRIEBEL, 2012). Sendo a superfície das mucosas o local privilegiado que proporciona um ambiente ecológico facilitador do estabelecimento de uma comunidade microbiana, para além de manter uma interface de troca ativa com o resto do organismo. Essa comunidade microbiana pode ser modelada pela dieta e outras macromoléculas

ambientais, para além da genética do hospedeiro e das suas diferentes fases de desenvolvimento do seu sistema imune (TASCHUK; GRIEBEL, 2012).

Os pré-ruminantes são animais que durante o período de amamentação são considerados como monogástricos, por não possuírem os compartimentos funcionais que caracterizam um animal ruminante, os pré-estômagos onde se dá a fermentação (*i.e.*, rúmen, retículo e omaso) ao nascer são pequenos e não-funcionais (figura 1), as papilas rumino-reticulares e as folhas omasais são ainda rudimentares, porém o abomaso já é funcional, mas ainda não secreta o ácido clorídrico (CARVALHO, 2013; MONÇÃO et al., 2013). Nessa altura da vida do animal pré-ruminante, a dieta é exclusivamente de colostro e posteriormente de leite, a atividade gástrica digestiva é efetuada exclusivamente no abomaso, o qual se assemelha ao estômago de não-ruminantes e que possui glândulas capazes de secretar ácido clorídrico, muco e hormonas (CAETANO JÚNIOR; CAETANO; OLIVEIRA, 2016; OLIVEIRA; PINHO; VALENÇA, 2019).

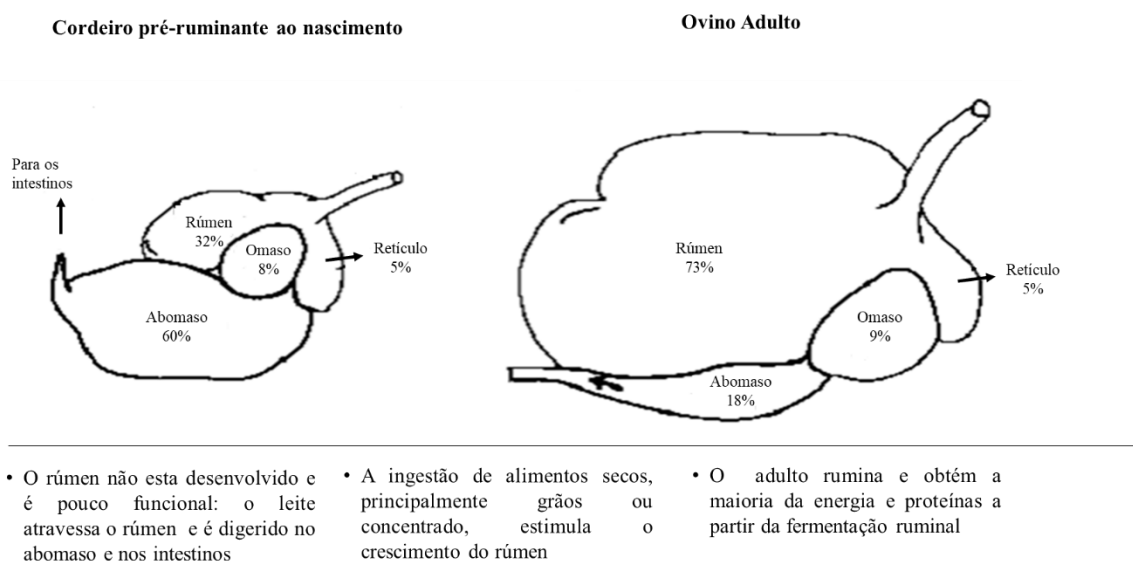


Figura 1. Representação dos compartimentos e desenvolvimento dos estômagos dos ruminantes. Adaptado de WATTIAUX (1997).

O abomaso possui atividade mínima da pepsina gástrica, há presença do factor inibidor de tripsina e baixa atividade proteolítica no primeiro dia de vida do animal, de modo que, as imunoglobulinas (Igs) contidas no colostro atravessam o estômago sem serem degradadas e digeridas para o intestino onde são absorvidas, dessa forma é possível adquirir a imunidade passiva (GOMES et al., 2017; LEEK, 1996). Sendo assim é uma das fases fundamentais para

o desenvolvimento do animal devido à escassez da síntese microbiana exigindo dietas mais complexas (ROCHA et al., 1999; LIMA et al., 2013).

A absorção dessas Igs (*i.e.*, IgA, IgG e IgM) dá-se no chamado de “intestino aberto” referindo-se este à capacidade exclusiva do enterócito do recém-nascido absorver macromoléculas, através de pinocitose pelas células epiteliais do intestino, nessa região as Igs conectam-se com os recetores dos enterócitos que são encarregados pelo transporte ativo do lúmen intestinal para a circulação sanguínea (GODDEN, 2008). A eficiência da absorção de Igs do colostro, num processo chamado “fechamento”, através do epitélio intestinal diminui linearmente com o tempo, esse mecanismo permeável do epitélio intestinal, relativamente às macromoléculas e sua absorção só se dá nas primeiras 18h e 24h de vida, estando esse processo ilustrado na figura 2. Caso o animal continue a alimentar-se com o colostro após esse “fechamento” continua a receber os benefícios da imunidade local do lúmen intestinal e da absorção dos nutrientes presentes no colostro, porém a absorção das Igs na circulação deixa de acontecer (GODDEN, 2008).

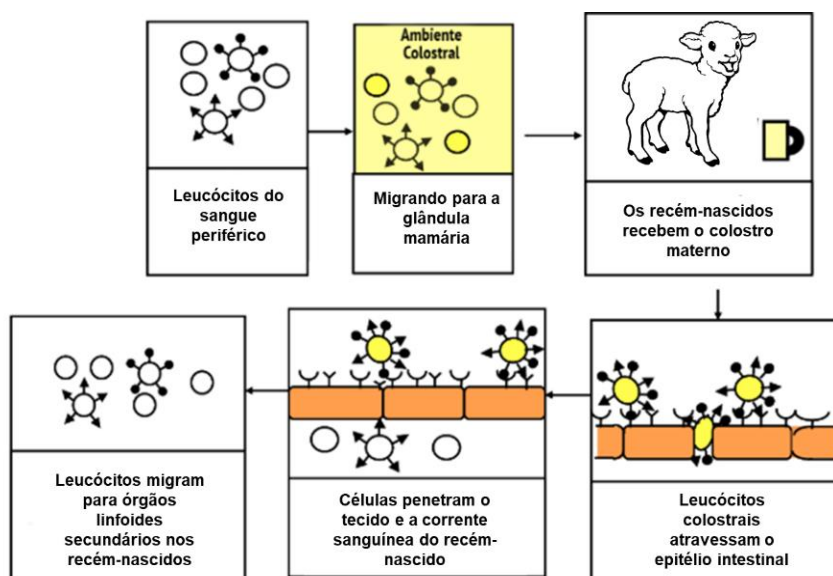


Figura 2. Esquemas da permeabilidade de leucócitos do colostro até a absorção pelo epitélio intestinal de borregos recém-nascidos. Adaptado de CHASE et al. (2008).

Para além disso, a colonização de microrganismos do sistema gastrointestinal dos pré-ruminantes é iniciada no período fetal pela presença de bactérias no líquido amniótico, mecónio e cordão umbilical com concentrações menores e menor diversidade que gradualmente vai aumentar após o nascimento, com a contribuição da microbiota do canal cervical e vaginal (RAABIS; LI; CERSOSIMO, 2019; COSTA, 2016). Os mecanismos do

desenvolvimento da microbiota intestinal é complexo e recebe influências de factores externos tais como: ambiente, aleitamento materno, antibióticos, genética e número da gestação (MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2014). A microbiota do colostro e do leite também podem influenciar a microbiota do rúmen, embora seja esperado que o impacto desses microrganismos no desenvolvimento do rúmen vá ser pequeno (BROWN, 1970). O conhecimento da extensão e do tipo de fermentação no rúmen de cordeiros pode ser útil na compreensão do processo de adaptação à forma adulta do metabolismo de ruminantes (STEWART; FONTY; GOUET, 1988). De modo que, a fase de transição, ou seja, da passagem da alimentação líquida para a sólida, inicia-se quando o animal começa a ingerir de forma progressiva alimentos sólidos em maiores quantidades, este comportamento é responsável por iniciar o desenvolvimento das glândulas salivares e rumino-reticulares (LEEK, 1996). Assim, a colonização da microbiota intestinal é sugerida pela intensificação da região rumino-reticular com a obtenção de microrganismos adquiridos, uma semana após o nascimento, por contaminantes presentes no leite, na pele, na água contaminada com microrganismos ruminais que foram eliminados pela eructação de outros animais adultos e através das fezes dos animais mais velhos que compartilham o mesmo ambiente dos animais mais jovens (LEEK, 1996; MEALE et al., 2016).

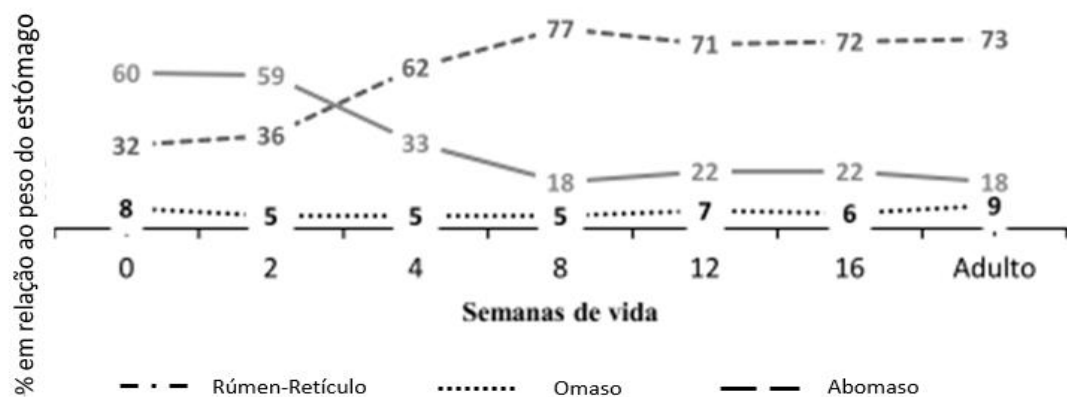


Figura 3. Percentagem do desenvolvimento dos compartimentos estomacais de ovinos em relação ao peso estomacal total, durante o desenvolvimento corporal (Adaptado de LYFORD Jr. (1988) por OLIVEIRA et al. (2019)).

O desenvolvimento dos pré-estômagos dos ovinos, como demonstrado na figura 3 abrange uma série de modificações anatômicas e fisiológicas do sistema digestivo, essas mudanças podem ser divididos em três fases: pré-ruminantes do nascimento até à 2ª semana

de idade, o rúmen-retículo representa 36% em relação ao peso do estômago do animal adulto; o período de transição, que se inicia na 3^o semanas até 4^a semanas de idade e na terceira fase, ou seja, após a 4^o semana de idade o animal torna-se um ruminante funcional (OLIVEIRA; PINHO; VALENÇA, 2019).

2.3 DESENVOLVIMENTO DA MICROBIOTA INTESTINAL E FUNÇÃO DOS MICRORGANISMOS

No intestino dos animais a comunidade composta por microrganismos é variada e complexa, esta microbiota intestinal é denominada por vários autores como “órgão esquecido” sendo também conhecida como o segundo genoma do animal (ZHANG et al., 2018). Alguns estudos indicam que o ambiente intestinal é um centro que integra a entrada de alimentos com sinais genéticos e imunológicos que são capazes de afetar o metabolismo do hospedeiro relativamente à resposta imunitária (THAISS et al., 2016). Além disso, a microbiota intestinal contém espécies microbianas que restringem os patógenos pois produzem substâncias antimicrobianas (*e.g.*, bacteriocinas) que competem por nutrientes luminais e por locais de fixação, adicionando a isso, essas bactérias também são capazes de sinalizar moléculas que podem modular a expressão génica de outras bactérias (STURME et al., 2002; GARCIA-GUTIERREZ et al., 2019). No passado mais de 50% da microbiota intestinal não podia ser cultivada fora do ambiente intestinal, atualmente, com a ajuda da tecnologia molecular e o rápido sequenciamento de DNA oferecem ferramentas convenientes e rápidas para descrever a composição e a relação entre o corpo do animal e a microbiota intestinal (MARX, 2013).

Durante o período de transição, a concentração microbiana (10^9 mL) na fração do fluido microbiano, no ambiente ruminal é atingida rapidamente e as bactérias anaeróbicas estritas tornam-se predominantes logo no segundo dia após o nascimento (LI et al., 2012). Os géneros bacterianos *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, produtores de ácido láctico são mais predominantes no ruminante pré-desmamado devido à abundância de oligossacarídeos no leite (REY et al., 2014).

A microbiota intestinal tem diversas funções que são significativas para a saúde do hospedeiro, sendo importantes para fornecer proteção anti-infeciosa através da resistência à colonização de microrganismos prejudiciais, fortalece o sistema imunológico, pois

possibilita a ativação das defesas imunológicas e por último oferece fontes energéticas e de vitaminas contribuindo para a nutrição dos animais (PAIXÃO; CASTRO, 2016).

De modo geral, a população microbiana, no aspeto nutricional do animal, possui três funções fundamentais para o animal: i) promover a digestão e a fermentação dos carboidratos, como a celulose e o amido; ii) sintetizar aminoácidos a partir do azoto não protéico oriundo da dieta; iii) sintetizar vitaminas do complexo B e vitamina K (ZHANG et al., 2018; BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006). A síntese dessas vitaminas são sintetizadas no intestino e produzidas pelas bactérias *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacilos*, *Clostridium*, *Enterobacterium*, *Veillonella*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (BARBOSA et al., 2010).

Capítulo 3: Composição microbiana e importância do colostro

3.1 COLOSTRO

Durante o período da colostrogênese, mais precisamente alguns dias antes do parto, as células epiteliais mamárias realizam um processo de secreção, que na primeira ordenha após o parto, fornece a secreção chamada colostro (BAUMRUCKER; BRUCKMAIER, 2014). O colostro é um tipo especial de leite, que é formado durante os últimos dias de gestação até aos primeiros dias após o nascimento do animal (LANGER, 2009). Este líquido consiste numa mistura de secreções lácteas, constituído por componentes do soro sanguíneo, imunoglobulinas e outras proteínas séricas que são acumulados na glândula mamária das fêmeas e pode ser recolhido imediatamente antes ou após o parto. É considerado como colostro o primeiro líquido recolhido, depois de 3 a 5 ordenhas após o parto o colostro já é considerado como leite de transição e por último, o animal produz o leite inteiro (YANG et al., 2015). A qualidade do colostro depende de vários factores como a idade da mãe, número de lactações, raça, dieta e possíveis doenças concomitantes (GUERRA et al., 2017).

Quando comparado com o leite, o colostro é uma secreção amarelada, com maior viscosidade, rico em nutrientes essenciais, vitamina A, concentrações altas de caseínas, albuminas e imunoglobulinas (FOLEY; OTTERBY, 1978; BAUMRUCKER; BRUCKMAIER, 2014). Também, o colostro comparado com o leite, tem uma elevada concentrações de proteínas (*i.e.*, albuminas, lactoglobulina e principalmente imunoglobulinas), de hormonas (*i.e.*, insulina, prolactina, hormonas da tireoide e cortisol), de peptidases (*i.e.*, lactoferrina, lactoperoxidase e transferrina), factores de crescimento,

enzimas, citocinas, minerais (*e.g.*, ferro, magnésio e sódio) e vitaminas (*i.e.*, β -caroteno, vitamina A, E,D, B) (BLUM, 2006; GODDEN, 2008; GUERRA et al., 2017).

Outra diferença entre o colostro e o leite é a presença de anticorpos que são os principais componentes do sistema imune adquirido (VETTER et al., 2013) ao fornecer a imunidade e proteção intestinal contra enteropatógenos, esta proteção acontece por causa dos inibidores da tripsina que estão presentes em altas concentrações no colostro, porém essas concentrações são diminuídas de modo acelerado com a produção do leite, reforçando este propósito, a atividade enzimática no sistema digestivo dos animais logo no primeiro dia é muito baixa (VETTER et al., 2013).

3.2 IMPORTÂNCIA DO COLOSTRO NA RESPOSTA IMUNE INATA

O colostro é fundamental para o recém-nascido por ser a primeira fonte de Igs materna, através da transferência imunitária passiva da mãe para o recém-nascido por absorção de Igs (*i.e.*, IgM, IgA e IgG) do colostro intactas por via do intestino delgado, que exercem também ação protetora local contra microrganismos antígenos que podem causar doenças letais (FOLEY; OTTERBY, 1978; GEORGIEV, 2008). Acrescenta-se também, outros compostos antimicrobianos relevantes presentes no colostro para a defesa bacteriana incluindo a lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase (YAMAGUSHI, 2013). Além dos anticorpos de origem materna o colostro contém citocinas e leucócitos, que contribuem para a imunoproteção do recém-nascido (GONZALEZ; DUS SANTOS, 2017).

A citocina é um grupo de proteínas que são produzidas por diferentes tipos celulares as quais contribuem para o mecanismo da resposta imune inata e adaptativa do recém-nascido (GOMES et al., 2017), ainda não é claro se essas citocinas são secretadas na glândula mamária ou se são produzidas por leucócitos encontrados no colostro, ou ambos (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). No que respeita às células do colostro, encontram-se os leucócitos, neutrófilos, macrófagos e algumas células epiteliais (BARRINGTON; PARISH, 2001). Essas células passam através da parede intestinal do recém-nascido, migram para o sistema linfático, chegam à circulação sanguínea sistêmica e circulam para os órgãos mais importantes do sistema imunológico (GONZALEZ; DUS SANTOS, 2017).

Antes do parto as mães produzem estrogênio e cortisol os quais possuem efeito imunossupressor e finalmente, como parte do processo do parto, os recém-nascidos estão

sujeitos a vários efeitos imunomoduladores, uma vez que a placenta produz progesterona, prostaglandina E2 e citocinas (*e.g.*, IL-4 e IL-10) esses componentes afetam o feto e a mãe a curto prazo e limitam as respostas mediadas por células de memória *T-helper* 1 (TH1) que criam citocinas relacionadas com a defesa mediada por fagocitose contra patógenos intracelulares, por outro lado, esses mediadores estimulam a produção de anticorpos das respostas *T-helper* 2 (TH2), como ilustrado na figura 4 (CHASE; HURLEY; REBER, 2008; YU et al., 2018).

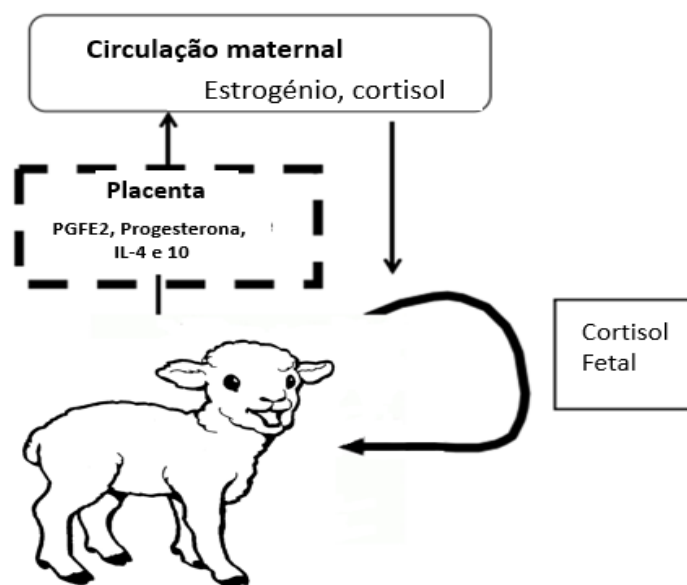


Figura 4. Imunossupressão do recém-nascido. Adaptado de CHASE et. al. (2008).

Ao sair do ambiente estéril uterino, os recém-nascidos são expostos às condições ambientais carregadas de microrganismos, apesar de possuírem uma resposta imune inata, são caracterizados como imune “*náive*”, pois nesta fase o sistema imunitário está imaturo e possui um atraso no início da produção de mecanismos de defesa necessário, o que os tornam suscetíveis as doenças (BARRINGTON; PARISH, 2001; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Portanto os níveis de corticosteroides neonatais devem ser altos para aumentar a absorção do colostro e estimular o transporte de macromoléculas através do intestino delgado do recém-nascido (MOREIN; ABUSUGRA; BLOMQVIST, 2002; SANGILD, 2003).

3.3 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS NÃO BACTERIANAS DO COLOSTRO

A lactoferrina está presente em maiores concentrações no colostro (PAKKANEN; AALTO, 1997) e em menores concentrações no leite (JOSLIN et al., 2002), apresentando-se como um factor imunológico. É uma proteína ligada ao ferro com propriedades antimicrobianas e antivirais, com efetividade na indisponibilização do ferro para a multiplicação bacteriológica, tendo um efeito bacteriostático; pode ser usada para enriquecer e fortalecer o leite, melhorando a qualidade microbiológica e o valor do leite como alimento funcional (RACHMAN; MAHESWARI; BACHROEM, 2015; URUAKPA; ISMOND; AKOBUNDU, 2002). Esta substância tem mostrado inibir o crescimento de diversos microrganismos incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteria*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis* (PAKKANEN; AALTO, 1997). De modo que, a lactoferrina tem a capacidade de aumentar o ganho de peso diário dos animais já que a sua saúde se encontra mais protegida (JOSLIN et al., 2002).

A lisozima é conhecida como agente antimicrobiano e enzima lítica, pode ser encontrada em muitos fluídos corporais nos mamíferos, como por exemplo, no colostro. Atua como barreira bactericida, destruindo a integridade da parede celular da bactéria pois possui uma camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana como substrato natural e a sua degradação resulta em lise da bactéria (PAKKANEN; AALTO, 1997; SILVA et al., 2019). Este agente antimicrobiano é tóxico para alguns microrganismos Gram-positivos e Gram-Negativos como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* (YAMAGUISHI, 2013).

A lactoperoxidase é a enzima antibacteriana mais importante presente no colostro que regula o crescimento bacteriano, esta enzima é constituída por glicoproteína básica contendo um grupo-heme com ferro no estado ferroso (Fe^{3+}) e catalisa a oxidação de tiocianato na presença de peróxido de hidrogénio estes compostos produzem um intermediário tóxico que inibe o metabolismo bacteriano através da oxidação dos grupos de sulfidril (-SH) essenciais nas proteínas (PAKKANEN; AALTO, 1997). O sistema desta enzima é capaz de proteger a glândula mamária do animal de infeções causadas por *Streptococcus sp.*, este sistema também é tóxico para outras bactérias patogénicas Gram-positivas e Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*,

Listeria monocytogenes, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e bactérias psicotróficas do leite (PAKKANEN; AALTO, 1997).

3.4 PROPRIEDADES MICROBIANAS DO COLOSTRO E DO LEITE

As propriedades microbianas, estimulam a ativação do sistema imunológico local da mucosa que compreende vários tecidos organizados, diferentes tipos de células e macromoléculas vigilantes tanto na indução como na supressão da resposta imune. Esta atitude é desencadeada pelas Células M e pelos receptores de reconhecimento de padrões codificantes (PRrs) expressos pelo epitélio da mucosa e pelos leucócitos que constituem o tecido linfóide associado à mucosa (MALT), (*i.e.*, placas de Peyer, revestidas por Células M; linfócitos intraepiteliais/Lâmina própria) (TASCHUK; GRIEBEL, 2012).

Este sistema permite efetuar uma resposta mais ágil contra invasões por bactérias patogênicas (PAIXÃO; CASTRO, 2016). A imediata exposição do animal nas diferentes situações é sustentada com microrganismos que possuem importância para imprimir o perfil de citocinas nas células T da mucosa do sistema gastrointestinal, de modo que, tanto a arquitetura da mucosa como a resposta imune inata podem ser alteradas. Acrescenta-se também que a microbiota do sistema gastrointestinal interfere em diferentes aspectos da homeostase e no desenvolvimento da mucosa intestinal “imune” do animal recém-nascido. Assim, o microbioma é essencial para manter a funcionalidade da barreira da mucosa intestinal e estabelecer o sistema imunológico durante o período neonatal (TASCHUK; GRIEBEL, 2012).

O colostro bovino além de ser rico em nutrientes essenciais, contém factores de crescimento e agentes antimicrobianos que possuem também uma microbiota que é aparentemente benéfica, os membros pertencente a esta microbiota são os géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* que são largamente utilizados como probióticos (SOCCOL et al., 2010). Alguns estudos sobre o cultivo microbiano estão ampliando a compreensão da diversidade microbiana dos mais variados ambientes como por exemplo, o leite humano ou de bovino (LIMA et al., 2017). Apesar de alguns estudos efectuados com bovinos, sobre a composição microbiológica do seu colostro e mesmo após DE DEA LINDNER et al. (2011) ter isolado e sequenciado 29 estirpes bacterianas bovinas, esta microbiota está longe de ser totalmente conhecida e poder ser relacionada de forma fundamentada com a saúde da glândula mamária.

3.4.1 ENZIMAS LÍTICAS

A produção enzimática no metabolismo dos animais ruminantes é realizada por protozoários e fungos do rúmen, mas os microrganismos mais ativos para a produção enzimática são as bactérias (ALVIMDUQUE; LANES; LOPES, 1991). As enzimas são biocatalizadores naturais produzidas por células vivas que provocam reações bioquímicas específicas e possuem a função de acelerar a velocidade da reação química, estas efetuam processos que decompõem macromoléculas de celulose, gorduras, amidos e proteínas (HARGER; SPRADA; HIRATSUKA, 1982). Também podem ser utilizadas como suplementos na alimentação de ruminantes, pois são capazes de catalisar as reações de degradação de substratos alimentares degradados em componentes químicos mais simples ao aumentar a taxa de passagem ruminal e a extensão da hidrólise (MCALLISTER et al., 2001).

Outras funções que as enzimas fornecem aos animais de interesse zootécnico são diversas, como: i) aumentar a eficiência e a conversão alimentar em ruminantes permitindo melhorar os índices zootécnicos (*e.g.*, crescimento, fertilidade e produtividade); ii) as enzimas aceleram o desenvolvimento ruminal nos pré-ruminantes favorecendo a antecipação do desmame; iii) promovem nos animais rápida adaptação ao ambiente; iv) diminuem a ocorrência de diarreias, proporcionando maior resistência do organismo; v) as enzimas reduzem o consumo diário de matéria seca e melhoram a conversão alimentar (CAMPESTRINI; DA SILVA; APPELT, 2005).

As enzimas lipolíticas são encontradas em animais, vegetais e em populações microbianas, capazes de catalisar reações de hidrólise de ésteres de triglicerídeos, reações reversas tais como, esterificação, transesterificação, síntese de aminas e lactonização. Desempenham um papel importante na facilitação da captação de recetores de lipoproteínas mediada no coração, músculo e tecido adiposo (JAEGER et al., 1994; HOLMES; VANDEBERG; COX, 2011; LIU et al., 2012). Em amostras de leite cru de bovinos CHEN et al. (2003) relataram as espécies *Bacillus cereus*, *B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* e *B. coagula* como espécies bacterianas lipolíticas e poucas informações foram publicadas sobre as espécies de *Bacillus* produtoras de enzimas lipolíticas encontradas no leite. São enzimas de natureza omnipresente produzidas por

diversas plantas, animais e microrganismos, possuem aplicações biotecnológicas como na produção de detergentes e a adição de sabor nos alimentos (JAEGER et al., 1994).

As enzimas aminolíticas degradam o amido, que é um polissacarídeo de reserva presente em vegetais na região da raiz, caule, fruto e semente (GUPTA et al., 2003). Os animais ruminantes necessitam da ação dessas enzimas e de processos mecânicos para a degradação do amido, os processos mecânicos são iniciados com a mastigação recebendo a ação da amílase salivar, em seguida recebem a ação da microbiota ruminal, hidrólise ácida no abomaso e a ação de microrganismos produtores de enzimas amilases ao longo do lúmen intestinal (SWENSON, M. J.; REECE, 1986). Os bacteróides que possuem maior capacidade de digerir o amido no rúmen são: *Ruminobacter amylophilus*, que é incapaz de digerir e utilizar a glicose ou outros monossacarídeos, *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*, que são capazes de fermentar o amido e outros açúcares solúveis gerando acetato (COTTA, 1988; KORARSKI; WANISKA; KERRY, 1991). Outras bactérias aminolíticas como: *Acteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Selenomona lactylitica*, *Eubacterium ruminantium*, *Ruminococcus bromii*, *Succinimonas amylolytica* e *Lactobacillus spp* são responsáveis pela fermentação do amido. (COTTA, 1988; KORARSKI; WANISKA; KERRY, 1991).

As enzimas celulolíticas de microrganismos são importantes no processo de fermentação dos animais herbívoros, que possuem adaptações no sistema digestivo, esses são submetidos à uma alimentação rica em fibras e que necessitam da relação simbiótica com microrganismos produtores da enzima celulase para que possa ocorrer a fermentação e a degradação da celulose, que é uma molécula de difícil decomposição (LOPES, 2013). Os microrganismos celulolíticos possuem a característica comum de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares que atacam o polímero da celulose, a degradação da celulose pelos sistemas bacterianos ocorre tanto em bactérias aeróbicas como em bactérias anaeróbicas (ROBSON; CHAMBLISS, 1989; SINGH; HAYASHI, 1995). As bactérias celulolíticas aeróbicas como microrganismos da espécie *Bacillus*, tais como *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, e *B. cereus* são capazes de hidrolisar carboximetilcelulose com cenobiose como produto. Já as bactérias anaeróbicas como *Acetovibrio cellulolyticus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *R. albus* também possuem capacidade de degradar a celulose e produzir a enzima celulase (ROBSON; CHAMBLISS, 1989; SINGH; HAYASHI, 1995; BAYER et al., 1998).

As enzimas proteolíticas peptidases, proteases ou peptídeas são capazes de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e em fragmentos de proteínas, quase todas as enzimas

possuem importância biológicas, pois causam modificações irreversíveis ou degradam seus substratos formando grupos de amina e carboxilo (BARRETT; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001). A população microbiana presente no rúmen possui uma atividade proteolítica considerada moderada quando comparada com outros microrganismos, e até mesmo com as secreções gástricas e pancreáticas do próprio animal, muitas estirpes de espécies de protozoário, bactérias e de fungos anaeróbicos presente no rúmen são capazes de produzir diferentes tipos de enzimas proteolíticas (WALLACE et al., 1996; ALVIMDUQUE; LANES; LOPES, 1991). As espécies predominantes de bactérias proteolíticas que se encontram no rúmen são *Bacteroides Amylophilus* e *Bacteroides ruminicola* (WALLACE et al., 1996; ALVIMDUQUE; LANES; LOPES, 1991). As proteases comerciais, principalmente as proteases neutras e alcalinas são produzidas pelo gênero *Bacillus* (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999).

3.5 HIPÓTESE DA VIA ENTERO-MAMÁRIA

A origem das bactérias benéficas presentes no leite materno e no colostro vem sendo discutidos ao longo dos últimos anos. O leite humano era caracterizado como sendo um fluido estéril e as investigações sobre a importância do leite e/ou colostro como uma fonte de bactérias maternas para o intestino dos recém-nascidos tem sido instigado por duas teorias, a primeira é nomeada como “colonização vertical” e a segunda como “migração ativa” (RODRÍGUEZ et al., 2008; SOEORG et al., 2017).

A primeira teoria aceita, rotulada como “colonização vertical”, refere que o leite materno possui uma microbiota específica proveniente de contaminações da pele ao redor da glândula mamária, assumindo-se a passagem dessas bactérias para a boca do recém-nascido e as bactérias presentes na boca deste para o ducto colonizando a glândula mamária (OSORIO; UMBARILA, 2015; RODRÍGUEZ et al., 2008).

A segunda teoria é rotulada como “migração ativa” em que existe uma via entero-mamária-endógena e que de alguma forma, as bactérias presentes no intestino da mãe colonizam a glândula mamária através de células fagocitárias que depois são transportadas através da amamentação para o recém-nascido, conferindo múltiplos benefícios, como a proteção de algumas doenças infecciosas e a contribuição da maturação do sistema imunológico (BERGMANN et al., 2014; OSORIO; UMBARILA, 2015). Essa migração de bactérias do intestino para a glândula mamária também foi observada em vacas, porém, não

foi demonstrada e, portanto, nesta fase foi apenas uma hipótese (JIMÉNEZ, 2018). Embora bactérias como *Saphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* fossem encontradas no leite, na pele e no sistema digestivo saudáveis (JIMÉNEZ, 2018).

A teoria que suporta uma via entero-mamária têm sido reforçadas com o avanço das tecnologias moleculares e a similaridade da microbiota presente nas fezes e no leite materno, com as fezes dos recém-nascidos na qual as bactérias presentes no intestino são apreendidas pelas células dendríticas e então transferidas para a glândula mamária para serem secretadas (JIMÉNEZ, 2018), como representada na figura 5.

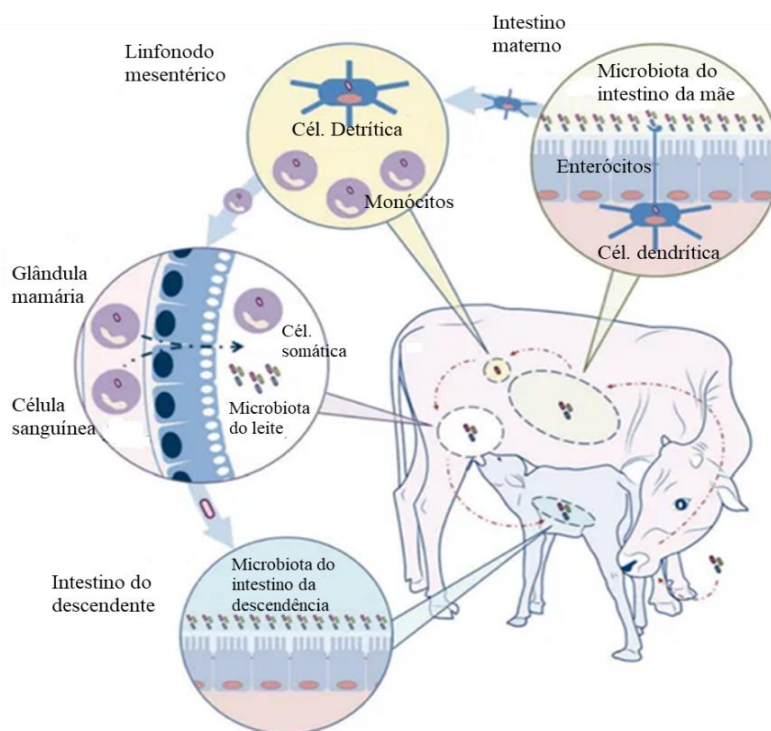


Figura 5. Hipótese da via entero-mamária em ruminantes. Adaptado de JIMÉNEZ, L. M (2018).

Assim, os microorganismos capazes de entrarem na teoria “entero-mamária foram identificados em diferentes géneros como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Weisella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium sp.* que por meio da lactação podem colonizar o intestino de recém-nascidos (OSORIO; UMBARILA, 2015; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Capítulo 4: Outras possibilidades na utilização do colostro e das fezes

4.1 UTILIZAÇÃO DO COLOSTRO NO CONSUMO HUMANO

O colostro bovino possui características nutricionais que estão largamente pesquisadas e documentadas, o colostro é considerado como uma excelente fonte de nutrientes, de proteínas bioativas, factores imunológicos, enzimas que são benéficas para a saúde do Ser humano e do animal (HOUSER et al., 2008). Isso deve-se ao facto de que o colostro bovino não ser só uma fonte antibacteriana ou antiviral, mas também é uma fonte capaz de melhorar e regular os movimentos peristálticos e o sistema digestivo em geral (GAPPER et al., 2007). Além disso, os produtos derivados do colostro bovino têm aumentado a popularidade no mercado de alimentos funcionais e de suplementos diários como uma alternativa tradicional de medicamentos (GAPPER et al., 2007).

As propriedades antibacterianas e o aumento da imunidade passiva contra infeções crónicas, principalmente nas primeiras semanas de vida da criança (SPONSELLER et al., 2015), o uso profilático ou terapêutico do colostro bovino em sintomas da gripe em idosos (CONTE; SCARANTINO, 2013) e também os efeitos benéficos não-imunológicos principalmente na nutrição de desportistas, onde foi relatado efeitos positivos na performance do factor de crescimento semelhante à insulina em atletas treinados (MERO et al., 2002) são exemplos onde o potencial do colostro bovino pode influenciar direta ou indiretamente o crescimento da microbiota intestinal, rica em *Bifidobacteria* e *Lactobacillus*, que são bactérias consideradas como probióticas e ainda acelerar a regeneração das células musculares, da pele, osso ou tecidos nervosos e a utilização de gordura corporal (BHORA et al., 1995).

O colostro bovino também melhora alguns processos terapêuticos de doenças cardiovasculares, alergias, doenças autoimunes, ajudar na coagulação em alguns casos de sangramento, diabetes, tratamentos de imunomodulação associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), propriedades anticancerígenas e isquemia resultante da administração de alguns tipos de medicamento (BAGWE et al., 2015). Além disso, o colostro também pode ter uma ação preventiva ou reduzir os efeitos colaterais de diversos medicamentos utilizados atualmente no tratamento de várias doenças em humanos e em animais como diarreias, efeitos colaterais do uso de antibiótico, nas doenças auto imunes no tratamento quimioterápico, diminuir na incidência de gastrites e finalmente, melhorar a mucosa gastrointestinal (MENCHETTI et al., 2016).

Para a produção de produtos de origem do colostro cru ou recém recolhido de alta qualidade, como por exemplo o colostro em pó ou produtos de IgG em pó, é essencial preservar as funções das proteínas bioativas (*e.g.*, factores de crescimento, Igs, enzimas, citocinas e vitaminas) pois a desnaturação dessas substâncias encontradas no colostro resultam na perda de qualidade da fisiologia funcional e conseqüentemente a perda dos efeitos benéficos dessas proteínas (GAPPER et al., 2007). Embora, existem poucos estudos que avaliem os efeitos bacteriológicos na qualidade do colostro cru sobre a qualidade do produto final do colostro (HOUSER et al., 2008), alguns estudos conduzidos por MARNILA et al. (2003) e TRAN et al. (2010) confirmam que os produtos que são baseados no colostro são capazes de inibir o crescimento da bactéria *Helicobacter pylor* a qual é responsável por doenças estomacais.

Outro produto interessante é a silagem de colostro de vaca que utiliza a fermentação anaeróbica do colostro *in natura* durante 21 dias, em temperatura ambiente numa garrafa de plástico de 2 L, esse processo é capaz de aumentar a conservação do colostro a períodos maiores que 24 meses, é um método de fácil execução e não requer grandes investimentos. Essa silagem de colostro representa uma mais valia para o produtor de leite e que pode ser utilizada para a alimentação animal como um substituto do leite materno, pois os bezerros que foram alimentados com a silagem de colostro obtiveram maiores ganhos de peso. Para além disso, a silagem de colostro também tem sido utilizada como suplemento nutricional para o consumo humano, na produção de queijos, vitaminas e bebidas lácteas (SAALFELD et al., 2013).

4.2 PROBIÓTICOS

O significado da palavra Probiótico é de “para a vida” é uma palavra de origem grega, a história dos probióticos iniciou-se com os gregos e romanos que recomendavam o consumo de queijos e leites fermentados para crianças (SOCCOL et al., 2010). Os probióticos são comumente definidos como sendo microrganismos vivos que são administrados em quantidades suficientes para sobreviver no sistema gastrointestinal e possuindo efeitos benéficos para o hospedeiro (GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI, 1999), também foram descritos por LILLY e STILLWELL (1965) como “substâncias secretadas por um microrganismo que estimula o crescimento de outro” e em 1974, PARKER propôs a seguinte definição para probióticos: “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal”.

Para um microrganismos ser considerado como probiótico é necessário seguir alguns critérios estritos, como: i) ser pertencente a microbiota nativa intestinal por ser compatível ao organismo; ii) ter capacidade de sobrevivência e de colonização de modo rápido no intestino; iii) possuir a capacidade de aderência no epitélio intestinal do hospedeiro; iv) possuir resistência às enzimas digestivas do hospedeiro; v) possuir ação antagônica aos microrganismos patogênicos; vi) não possuir toxicidade e/ou ser patogênico; vii) em escala industrial, os microrganismos devem ser cultivável; viii) estáveis e viáveis comercialmente, e; ix) serem capazes de estimular a imunidade do hospedeiro (FULLER, 1992; REIS; VIEITES, 2019). Esses microrganismos podem ser compostos por uma população com um largo número de uma ou mais estirpes de uma única espécie ou uma mistura de várias espécies (GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI, 1999)

As estirpes bacterianas mais comumente usadas e que são encontradas no colostro são: *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breTe*, *Bifidobacterium cereus*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cereTisiae* (GISMONDO; DRAGO; LOMBARDI, 1999).

No colostro, as bactérias que podem atuar como benéficas e serem dadas como probióticos são indígenas e denominadas de bactérias do ácido-láticas, (LAB), essas bactérias são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (ROOSTITA; KHOTIMAH; SAFITRI, 2015). Os géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais utilizados em

humanos, já as espécies de leveduras, de *Bacillus*, de *Enterococcus* e de *Saccharomyces* são mais utilizados na alimentação animal (REIS; VIEITES, 2019; SALMINEN et al., 1998). Porém, a utilização de alguns microrganismos, como no caso do género *Enterococcus* tem sido interrogada por ser um género que possui factores de virulência e também por possuir genes com resistências a substância antimicrobiana que são transmissíveis a outras bactérias ácido-lácticas (REDONDO, 2008).

4.3 PREBIÓTICOS

GIBSON e ROBERFROID (1995) descreveram pela primeira vez o termo “prebióticos” como “um ingrediente alimentar não-digerível que beneficia o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou um número limitado de bactérias presentes no intestino, e que assim melhora a saúde do hospedeiro”. Para que um substrato presente na dieta do animal seja classificado como prebiótico é necessário seguir por pelo menos quatro critérios: i) não devem resistir aos ácidos gástricos; ii) não devem ser hidrolisados e absorvidos pelas enzimas digestivas do estômago ou na região do intestino delgado; iii) a fermentação do substrato deve ser feita pela microbiota do intestino e estimular os efeitos benéficos locais/sistêmico do hospedeiro; iv) o substrato deve ser seletivo, principalmente para as bactérias simbiotes benéficas do intestino grosso (GIBSON et al., 2004; SOCCOL et al., 2010).

A estimulação seletiva do crescimento e/ou da atividade bacteriana, que é o caso do quarto critério de um substrato ser considerável como prebiótico, é o mais complicado de ser estudado por requerer amostras de estirpes bacterianas anaeróbicas seguida de análises microbiológicas confiáveis e quantitativa de géneros como: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacteria*, *Eubacterium*, e *Lactobacillus*, torna-se difícil descrever a fermentação em culturas de estirpes puras ou um aumento de um número limitado dos géneros bacterianos de misturas complexas (como as fezes) não ser possível confirmar “*in vitro*” o efeito de prébiótico (GIBSON et al., 2004).

As fontes de prebióticos mais identificados são de açúcares absorvíveis ou não, fibras, peptídeos, proteínas, álcoois de açúcares e oligossacarídeos com estruturas moleculares que são normais na dieta de humanos e animais. Os aditivos mais estudados na dieta são os oligossacarídeos de cadeia curta de açúcares simples, como por exemplo, frutoligosacarídeos (FOS), glucoligosacarídeos (GOS) e Mananoligosacarídeos (MOS),

esses componentes são mais utilizados em dietas de não ruminantes (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010; REIS; VIEITES, 2019). Em ruminantes, existem poucos estudos que discutem a associação da dinâmica dos prebióticos com os microrganismos inerentes (UYENO; SHIGEMORI; SHIMOSATO, 2015).

Além disso, os oligossacarídeos com efeito prebiótico estão presentes naturalmente no colostro e podem melhorar o crescimento de microrganismos probióticos como os *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* e fornecer novas oportunidades terapêuticas para o tratamento de doenças gastrointestinais (PLAYFORD, 2001). Desse modo, os benefícios da saúde com a combinação de probióticos e o colostro podem ajudar a compor o mercado de suplementos de alimentos funcionais com novos produtos (HYRSLOVA et al., 2016).

4.4 TRANSPLANTE DE MICROBIOTA FECAL

O transplante de microbiota fecal (TMF) é uma técnica que teve a sua primeira aplicação na medicina moderna em 1958, esse método consiste na introdução do conjunto de bactérias comensais que pertencem ao sistema digestivo de humanos e de animais saudáveis em um paciente portador de doenças infecciosas bacterianas no intestino. Este método tem ganho atenção na medicina moderna humana nos últimos anos devido a uma epidemia reemergente de infecção causada pelo Infeção *Clostridium difficile* (ICD), esta bactéria é uma das principais causas de diarreia associada a antibióticos (VYAS; AEKKA; VYAS, 2015).

A epidemia de ICD causa altas taxas de mortalidade em humanos e esta deve-se principalmente pelo uso de antibióticos convencionais de amplo espectros que produzem o efeito deletério do distúrbio da microbiota comensal intestinal o que permite o estabelecimento de ICD (MESSIAS et al., 2018). A infecção pelo *C. difficile* causa um quadro típico de diarreia aquosa com vários episódios ao dia, dor abdominal, febre baixa, leucocitose, hipoalbuminemia, desidratação e desnutrição. Os pacientes mais acometidos por esta doença são pacientes maiores de 65 anos, uso de medicamentos laxativos, quimioterapias, pacientes que passaram por cirurgias gastrointestinais, hospitalização prolongada e principalmente pacientes medicados por antibióticos (*i.e.*, metronizadol, vancomicina, penicilinas e fluoroquinolonas) (SILVA JÚNIOR, 2012).

Desse modo, o TMF apresenta-se uma das alternativas mais eficazes e adequadas para o tratamento desta doença, principalmente com os resultados dos estudos positivos

realizados recentemente (VYAS; AEKKA; VYAS, 2015). Em adição aos tratamentos alternativos de ICD, a inoculação repetida e frequente na gestação de vacas leiteiras podem estimular a produção de altos níveis de imunoglobulinas colostrais contra um antígeno alvo o que resulta em um colostro bovino hiperimune. Este colostro demonstrou eficácia como a prevenção ou como tratamento contra patógenos, incluindo *C. difficile* (STEELE et al., 2013).

Em cavalos, a TMF foi aplicada para tratar casos de diarreia aguda e crônica e doença inflamatória intestinal (MULLEN et al., 2018). Nos pequenos animais (*i.e.*, cães e gatos), o método é indicado para quando não há outras opções para tratar as desordens do sistema digestivo, este método pode ter potencial para melhorar a saúde de qualquer doença associada com alterações ou disbiose da microbiota intestinal (GARCIA-MAZCORRO et al., 2016).

Nos animais ruminantes, o conceito da transfaunação do rúmen é similar do transplante de microbiota fecal, a transferência da fauna simbiótica do rúmen de um hospedeiro saudável para outro animal doente é uma prática comum (DEPETERS; GEORGE, 2014). WILLIAMS e WITHERS (1993) estudaram a reintrodução de microrganismos (*i.e.*, protozoários) associados a transfaunização ruminal de ovinos desfaunados e após um período da transfaunização ruminal, os microrganismos recolonizaram o rúmen de todos os animais estudados.

Capítulo 5: Materiais e métodos

5.1 AMOSTRAGEM

Este estudo foi realizado no Instituto Politécnico de Bragança - Escola Superior Agrária de Bragança e Centro de Investigação de Montanha (CIMO) da cidade de Bragança - Portugal. O ensaio decorreu de 2 de março a 04 de abril de 2019. Neste estudo utilizaram-se 18 ovinos (*Ovis aries*) da raça Churra Galega Bragançana (Figura 6), pertencentes ao rebanho experimental da Escola Superior Agrária (ESA), os quais foram divididos em dois grupos: o controlo e o grupo tratamento, cada um deles constituído por 3 ovelhas e 6 cordeiros (4 machos, 2 fêmeas no grupo tratamento e 5 machos, 1 fêmea no grupo controlo) de partos duplos. As idades das ovelhas em ambos os grupos rondavam os 3-5 anos, sendo já multíparas. Em termos de alimentação ficou estabelecido que os dois grupos ficariam confinados no ovil e as ovelhas receberiam 350-400g de alimento concentrado comercial (20,5% de proteína bruta, 4,90% de matéria gorda bruta, 14,30% fibra bruta, 7,70% cinza bruta, 0,23% sódio), água, feno e/ou palha “*ad libitum*” de prados naturais (azevém, vicia e trevos), silagem de milho (apenas como suplemento) e suplementação mineral.

Os dois grupos foram constituídos após o parto das ovelhas e separados. Em ambos os grupos os cordeiros ingeriram o colostro nos primeiros dias exclusivamente das suas mães permanecendo até ao fim do ensaio com estas e a ingerir o seu leite. Todos os cordeiros foram pesados à nascença, depois foi feito 4 pesagens aos 10, 17, 24 e 33 dias de idade e calculado o ganho médio diário (GMD) do peso (Kg).

Para além do que já foi referido, para os dois grupos, no do tratamento a partir do terceiro dia de idade os cordeiros foram suplementados com 50ml por dia, durante 4 semanas

de colostro de duas vacas (*Bos taurus*) Holstein-Frísia (administrado com biberon) de 4 anos de idade, múltiparas, pertencente à exploração Escudeiros situada em Braga, com controlo sanitário. O colostro foi congelado a -22°C e posteriormente, era descongelado e administrado para os cordeiros. As vacas recebiam água, feno/silagem de ervas (azevém, vicia e trevos), silagem de milho, concentrado comercial adaptado feito à medida para a exploração, de maneira a cobrir as necessidades energéticas e nutricionais dos animais e distribuído em *unifeed*.



Figura 6. Ovinos da raça Churra Galega Bragançana. Fonte própria.

Recolheram-se amostras do colostro das vacas e que foram guardadas em *falcons* estéreis e imediatamente conservadas a -80°C (para análise da comunidade bacteriana por metagenómica).

Em ambos os grupos foram recolhidas fezes dos doze cordeiros directamente do reto através de massagem nas paredes retais com luva e o dedo lubrificado com vaselina, durante a terceira semana de ensaio, entre o período de 22 a 26 de março de 2019, os animais tinham de 20 a 24 dias de idade. As amostras foram guardadas em duplicado em *falcons* estéreis e imediatamente conservadas a 4°C (para isolamento de bactérias) e a -80°C (para análise da comunidade bacteriana por metagenómica).

No mesmo período referido a cima, procedeu-se ainda à colheita de amostras de leite das seis ovelhas (grupo controlo e tratamento) no dia 25 de março de 2019 após a assepsia

dos tetos com solução de iodo e ordenhado de forma natural. As amostras foram guardadas em *falcons* estéreis e imediatamente conservadas a -80°C (para análise da comunidade bacteriana por metagenómica) no laboratório do CIMO, do Instituto Politécnico de Bragança.

5.2 ANÁLISE DA COMUNIDADE BACTERIANA

A comunidade bacteriana presente nas amostras de fezes, colostro e leite foi avaliada recorrendo a métodos não dependentes do cultivo (*i.e.*, metagenómica). Este método apresenta a vantagem de permitir a identificação de bactérias não cultiváveis e, deste modo, de conhecer a diversidade de uma forma mais completa. Nas amostras de fezes, a diversidade bacteriana foi adicionalmente avaliada por métodos dependentes de cultivo, com o intuito de avaliar nos isolados obtidos a capacidade produtiva de enzimas líticas. Este último método envolve o isolamento de microrganismos seguido pela sua identificação molecular.

5.2.1 MÉTODOS NÃO DEPENDENTES DE CULTIVO – METAGENÓMICA

Neste estudo foi avaliada a comunidade bacteriana presente em oito amostras de fezes de cordeiros (quatro de animais controlo e quatro de animais do tratamento), em duas amostras de colostro (cada uma de vacas diferentes) e em duas amostras compostas de leite de ovelha (uma amostra composta das três mães dos cordeiros do grupo controlo e outra amostra composta das três mães dos cordeiros do grupo tratamento).

5.2.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA das diferentes amostras de fezes, colostro e leite, foi efetuada utilizando o método Brometo de Cetil-Trimetil-Amónio (CTAB). A cerca de 0,1 g de amostra, previamente macerada em azoto líquido, foram adicionados 1200 µl do tampão de extração CTAB [2% (p/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0 e 1,4 M NaCl]. Após mistura da solução em vórtex durante 1 min, incubou-se à temperatura de 70°C

durante 20 min. Recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo por centrifugação a 13000 rpm (4°C) durante 5 min. Adicionou-se de seguida 1 mL de clorofórmio, e homogeneizou-se a solução por inversão durante 5 min. Após centrifugação a 13000 rpm por 10 min a 4°C, recolheu-se o sobrenadante para um novo microtubo. O DNA no sobrenadante foi precipitado com igual volume de isopropanol (-20°C) por inversão suave e, de seguida, incubado a -20°C durante 20 min. O DNA foi recolhido por centrifugação a 13000 rpm (4°C), durante 20 minutos, lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% (-20°C) e seco à temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA foi dissolvido em 50 µl de água ultrapura pré-aquecida a 50°C. A concentração e a qualidade do DNA extraído foi estimada pela determinação do valor da absorvância a 260 nm e da razão absorvância 260/absorvância 280, respetivamente, utilizando um espectrofotómetro microvolume MySPEC (VWR). As amostras de DNA extraídas foram em seguida armazenadas a -80°C até a análise por metagenómica.

5.2.1.2 Sequenciação na plataforma Illumina Miseq

Após a extração de DNA das amostras, procedeu-se à sua diluição em água ultrapura de forma a obter uma concentração final de 100 ng/µl. A identificação de bactérias foi efetuada pela sequenciação da região V4 do gene 16S rRNA utilizando a plataforma de sequenciação Illumina MiSeq, num serviço prestado pela Unidade de Genómica do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC, Oeiras, Portugal). A sequenciação foi feita utilizando o kit MiSeq v2, com um tamanho de leitura 2 × 250 bp (leituras *paired-end*), e usando os *primers* 515f (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3') e 806rB (5' GGACTACNVGGGTWTCTAAT 3') (WALTERS et al., 2015).

5.2.1.3 Análise das sequências obtidas

O processamento dos dados em bruto (demultiplexação, *i.e.*, remoção dos índices/adaptadores) e o pré-processamento (filtragens de qualidade, *p.e.* remoção de quimeras, sequências curtas e *singletons*) das leituras de sequenciação (do inglês, *reads*) foram realizados automaticamente pela pipeline do IGC, o que incluiu também uma análise

dos dados na plataforma bioinformática QIIME (versão 1.9.1) (CAPORASO et al., 2010). O agrupamento das unidades taxonômicas operacionais (OTUs clustering) foi realizado utilizando o valor de 97% de identidade entre sequências, tendo sido utilizada a versão mais recente da base de dados Greengenes (13_8) para a classificação taxonômica (MCDONALD et al., 2012). A tabela de OTUs assim gerada foi alvo de uma segunda etapa de filtragem de qualidade, a partir da qual se removeram potenciais contaminantes ou artefactos. Os parâmetros de remoção foram: (1) eliminar as sequências de 16S que não fossem de eubactérias (*i.e.*, Archaea, mitocôndrias e cloroplastos), (2) eliminar as OTUs que possuíam abundância inferior a 5 identificado no total das amostras, (3) eliminar as OTUs que apareciam 2 vezes ou menos em cada amostra.

5.2.2 MÉTODOS DEPENDENTES DE CULTIVO

5.2.2.1 Isolamento de bactérias

Para cada amostra de fezes foi pesado assepticamente cerca de 1g, que foram transferidas para 9 mL de solução estéril de tampão de fosfato de potássio (PBS) pH 7,0 (5g/L NaCl; 0,20 g/L KCl; 1,44g/L Na₂HPO₄; 0,24g/L KH₂PO₄) (diluição 10⁻¹). Após 1 min de agitação a 200 rpm, à temperatura ambiente, procedeu-se a uma série de diluições decimais da suspensão de microrganismos até 10⁻⁸ em tubos estéreis de *Falcon* contendo 9 mL do mesmo tampão PBS. Uma alíquota de 0,1 mL de cada uma das diluições 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸, foi utilizada para inocular placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura Luria-Bertani agar (LBA) [1% triptona (p/v), 2% agar (p/v), 0,5% extrato de levedura (p/v), 1% cloreto de sódio (p/v)]. Preparou-se no total três placas de Petri para cada diluição que, depois de seladas com *parafilm*, foram postas a incubar à temperatura ambiente (25±3°C). O crescimento bacteriano foi acompanhado diariamente e à medida que as colônias iam crescendo, estas iam sendo contabilizadas e repicadas em meio LBA de forma a obter isolados puros.

5.2.2.2 Identificação molecular das estirpes bacterianas

A identificação dos isolados bacterianos foi feita com base na avaliação das características morfológicas das colónias (*i.e.*, cor, tamanho, forma, margem e elevação das colónias), complementado com a caracterização molecular. As colónias bacterianas com características morfológicas similares foram agrupadas e, um isolado de cada grupo, foi selecionado para se identificar molecularmente. A identificação molecular foi efetuada pela amplificação e sequenciação de uma porção da região 16S do DNA ribossómico (rDNA), nomeadamente a região compreendida entre V1-V4. Para tal, procedeu-se à extração de DNA de bactérias em crescimento em meio LBA durante 24 horas, utilizando o kit REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR (Sigma-Aldrich). Resumidamente, foi retirado cerca de 0,1 g de massa microbiana de colónias em crescimento ativo para um microtubo de 1,5 mL contendo 25µL de tampão de extração. Após a mistura, as amostras foram incubadas a 95°C durante 10 min, adicionando, em seguida, 50µL de tampão de diluição. Após homogeneização, as amostras foram conservadas a -20°C. A amplificação da região V1-V4 do 16S rDNA foi realizada numa reação com o volume final de 50 µL contendo 3 µL de DNA, 0,2 µM de cada *primer* 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') (LANE et al., 1991) e 534R (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3') (WATANABE; KODAMA; HARAYAMA, 2001), 0,2 mM dNTP Mix (Fermentas), 2 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 1x GoTaq® Flexi buffer (Promega) e 0,05 U GoTaq® DNA polimerase (Promega). As amplificações foram realizadas no termociclador MyCycler (BIO-RAD) usando o seguinte gradiente de temperaturas: desnaturação inicial a 95° C durante 5 min, seguido por 25 ciclos de 95° C durante 40s, 55° C durante 1 min, extensão a 72°C por 30s e, por último, apenas um ciclo de uma extensão final a 72° C, durante 7 min. Durante as amplificações de DNA foram efetuados controlos negativos que continham 3 µL de água ultrapura estéril em substituição de DNA bacteriano.

Os produtos de PCR (~507 bp) foram visualizados usando géis de agarose a 0,8% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris pH 7,6, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA). A separação eletroforética foi efetuada a uma diferença de potencial de 100V. Após coloração do gel numa solução de RedGel™ (BIOTIUM 3X) durante cerca de 30 min, o DNA foi visualizado por fluorescência sob radiação ultravioleta utilizando um transiluminador ChemiDoc™ MXRS (BioRad). Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados recorrendo aos serviços da empresa Macrogen Inc. (Madrid, Espanha), utilizando os *primers*

anteriormente descritos. As sequências de DNA obtidas (região 16S) foram analisadas utilizando o software informático BioEdit v.7.2.6.1 (HALL, 1999). Recorrendo ao servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e utilizando o algoritmo BLAST, foi analisada a homologia das sequências obtidas com outras sequências presentes na base de dados GenBank. Para as sequências com valores de grau de identidade maiores que 98%, o género e as espécies foram aceites; para sequências com valores de grau de identidade entre 95 e 97%, apenas o género foi aceite, e para sequências com valores de grau de identidade menores que 95%, os isolados foram classificados como desconhecidos. As sequências com duas ou mais identificações foram identificadas com o nome da família. As sequências obtidas estão disponíveis no GenBank com os seguintes números de acesso: MN915033-MN915066. Cada cultura bacteriana pura identificada foi depositada na coleção de culturas do Centro de Investigação de Montanha do Instituto Politécnico de Bragança.

5.2.2.3 Expressão dos resultados

Os resultados para cada um dos isolados bacterianos identificados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de fezes analisada (UFC/g fezes). Para o seu cálculo foram consideradas as contagens de colónias bacterianas nas diluições 10^{-7} e 10^{-8} , utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{UFC}{g \text{ fezes}} = \frac{\sum C}{[V \times (n1 + 0,1 \times n2) \times d]}$$

Onde:

$\sum C$ – soma das colónias em todas as placas contadas

V – volume de inóculo semeado em cada placa

n1 – número de placas da primeira diluição contada

n2 – número de placas da segunda diluição contada

d – diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens

5.3 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS LÍTICAS

Nos isolados bacterianos obtidos por métodos culturais foi avaliada a capacidade de produção das enzimas líticas amilase, celulase, lipase e protease. Estas enzimas normalmente encontram-se associadas ao metabolismo dos animais e com o aumento da concentração das enzimas pode proporcionar maiores taxas de digestão da parede celular no rúmen juntamente com a atividade microbiana (STIVARI et al., 2014), além disso os ruminantes não possuem enzimas que são capazes de degradar as fibras dos alimentos e os microrganismos assumem este papel na digestão dos alimentos desenvolvendo uma relação simbiótica (MONÇÃO et al., 2013). As bactérias por possuírem uma produção enzimática mais ativa face aos outros grupos de microrganismos (*e.g.*, fungos) apresentam um maior potencial em catalisar as reações de degradação de substratos alimentares em componentes químicos mais simples (ALVIMDUQUE; LANES; LOPES, 1991). A produção destas enzimas foi avaliada qualitativamente pela observação dos halos de degradação do substrato pelas enzimas produzidas pelos isolados bacterianos em meio de cultura LBA (MARIA, G. L., SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, 2005).

O inóculo bacteriano foi obtido a partir de culturas postas a crescer em meio líquido LB, numa incubadora orbital com agitação 100 rpm, à temperatura de 25°C, durante 24 horas. Após a incubação, recolheram-se amostras em ambiente estéril, na câmara de fluxo laminar, e a densidade ótica (DO) foi ajustada no espectrofotometro MySPEC (VWR), usando meio líquido LB, de forma a obter a concentração celular bacteriana de 10^8 células/ml (densidade ótica a 600 nm, $OD_{600} = 0,5$). A determinação de enzimas foi efetuada em Placas de Petri (9 cm diâmetro), contendo meio de cultura LBA ao qual foi previamente incorporado o substrato da enzima a pesquisar. Estas placas foram inoculadas no centro com uma rodela de papel de filtro estéril (3 mm diâmetro) impregnado com 5 µL de suspensão de células bacterianas (10^8 células/mL). Ao fim de 7 dias de incubação, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro, foi registado o raio da colónia bacteriana e o raio da colónia bacteriana + halo formado à sua volta, em mm. Realizaram-se três repetições para cada enzima. A atividade da **amilase** foi determinada pela incorporação no meio de cultura de 2% (p/v) de amido solúvel (Riedel-de-Haën). Após a incubação as placas foram submersas com uma solução de 1% (p/v) de iodo (Analar) em 2% (p/v) de iodeto de potássio (Prolabo). A formação de uma zona mais clara junto da colónia indica a atividade da amilase. A atividade da **celulase** foi avaliada pela adição ao meio de cultura de 0,5% (p/v) de carboximetilcelulose de sódio (Alfa Aesar). Após a incubação as placas foram submersas com uma solução de 0,2% (p/v) de vermelho de

Congo (Merck) e lavadas com 1M NaCl (Merck) por 15 minutos. Uma zona incolor junto à colónia é indicativa da atividade da celulase. Na atividade da **lipase** foi usado meio suplementado com 1% (v/v) de Tween 20 (Aldrich). Uma zona mais clara circundando a colónia indica uma atividade lipase-positiva pelo fungo. Para a atividade da **protease** foi adicionado gelatina a 0,4% (p/v) (Prolab) a pH 6,0. Após a incubação as placas foram submersas com uma solução de ácido tri-cloro acético 1M e a formação de uma zona mais clara ao redor da colónia identificou a atividade de protease.

5.3.1.1 Expressão dos resultados

A produção de cada enzima foi estimada com base na área do halo de degradação do substrato, utilizando-se para o efeito a seguinte fórmula:

$$\text{Área do halo (mm}^2\text{)} = (\text{área da colónia bacteriana} + \text{halo}) - (\text{área da colónia bacteriana})$$

em que as áreas foram estimadas com base nos raios das colónias e halos formados à sua volta. Os resultados para cada enzima foram expressos pela média da área do halo (n=3) seguida pelo erro padrão.

5.4 ANÁLISE DE DADOS DA COMUNIDADE BACTERIANA

A diversidade bacteriana avaliada por métodos dependentes e não dependentes do cultivo para cada uma das amostras analisadas foi estimada ao nível da abundância (UFC/g fezes ou *reads*), riqueza de espécies (Nº total de OTUs), e índice de diversidade de Shannon–Wiener, utilizando-se para o efeito o software *Species Diversity and Richness* v. 4.0 (SEABY; HENDERSON, 2007). Os resultados são apresentados como a média para cada uma das amostras (fezes, colostro e leite). As diferenças entre médias foram determinadas por análise de variância a um factor (ANOVA one-way) no excel, para probabilidades $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ considerando-se, respetivamente, como significativas, muito significativas e altamente significativas.

Para avaliar se existem diferenças na composição da comunidade bacteriana entre as várias amostras estudadas (*i.e.*, fezes, colostro e leite), efetuou-se uma análise multivariada utilizando-se o software *Community Analysis Package* v. 5.0 (SEABY; HENDERSON,

2014). Nesta análise procedeu-se à elaboração de uma ordenação não métrica multidimensional (NMDS) com 999 permutações, combinada com uma análise de similaridade (ANOSIM), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray-Curtis (MAGURRAN, 2004). A matriz utilizada nestas análises consistiu nas abundâncias dos diferentes OTUs, que foi previamente transformada ($\log_{10}(x+1)$). O ANOSIM gera um valor p , que avalia o nível significativo ($p < 0,05$), e um valor R (variando de 0 - indistinguível a 1 - completamente dissimilar) que avalia o nível de similaridade/dissimilaridade na composição da comunidade bacteriana entre as diferentes amostras. Nos casos em que se verificaram diferenças significativas, procedeu-se a uma análise de percentagem de similaridade (SIMPER) com o intuito de identificar as famílias bacterianas que apresentaram a maior contribuição na diferenciação/dissimilaridade. Esta análise foi realizada usando o mesmo software para o NMDS. Adicionalmente foram elaborados diagramas de *Venn* para mostrar o número de famílias e géneros bacterianos exclusivos e partilhados entre as diferentes amostras (fezes, leite e colostro).

Capítulo 6: Resultados

6.1 PESO DOS CORDEIROS

Os resultados encontrados na tabela 1 mostram os valores do peso inicial e peso médio da 1º, 2º, 3º e 4º pesagem. O peso ao nascer ou peso inicial para ser considerado bom é necessário recorrer aos padrões zootécnicos dos animais e às condições nutricionais das mães no terço final da gestação. O peso ao nascimento está diretamente relacionado com a genética do animal, a idade e nutrição das mães, sexo e números de animais nascidos (COIMBRA FILHO, 1992). De acordo com Associação Nacional de Criadores da Raça Churra Galega Bragançana (ACOB), o peso ao nascer para a raça Churra Galega Bragança é de 3 a 3,5 kg para machos e fêmeas.

Tabela 1. Valores médios para peso inicial (PI), peso aos 10 dias de idade (P10), peso aos 17 dias de idade (P17), peso aos 24 dias de idade (P24), peso aos 33 dias de idade (P33).

Variáveis	Controlo	Tratamento	Valor - p
PI (kg)	3,38 ^a	3,17 ^a	0,181
P10 (Kg)	4,68 ^a	5,54 ^a	0,051
P17 (Kg)	5,83 ^a	6,45 ^a	0,128
P24 (Kg)	6,82 ^a	7,64 ^a	0,168
P33 (Kg)	8,35 ^a	8,77 ^a	0,627

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem ($p < 0,05$).

Ao longo deste ensaio, a idade e o peso correlacionaram-se e não tiveram diferenças significativas entre os cordeiros do controlo e do tratamento (figura 7). Relativamente ao GMD dos cordeiros, verificou-se que o grupo dos animais

relativamente ao 1º período de pesagem, quando tinham 10 dias de idade, obteve diferença significativa ($p=0,031$) sendo o peso dos animais do grupo tratamento superior (0,232g/d) aos animais do grupo controlo (0,127g/d) e passou a não ser observados diferenças significativas do GMD aos 17 dias ($p=0,236$), aos 24 dias ($p=0,290$) e aos 33 dias ($p=0,421$) de idade (figura 8).

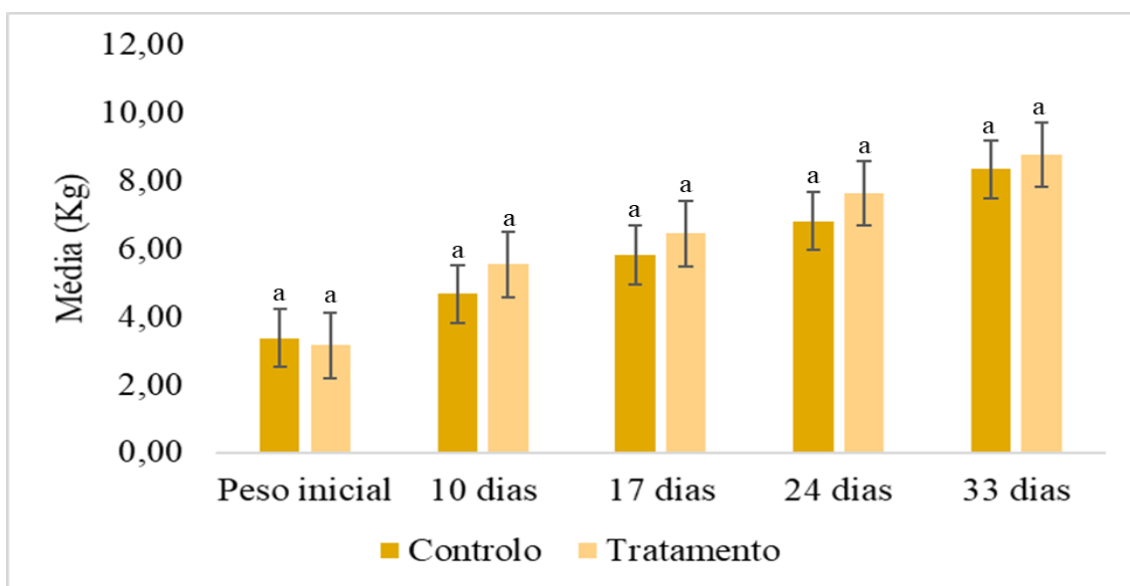


Figura 7. Peso médio (kg) dos cordeiros do controlo e do tratamento das quatro semanas. Valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p<0,05$).

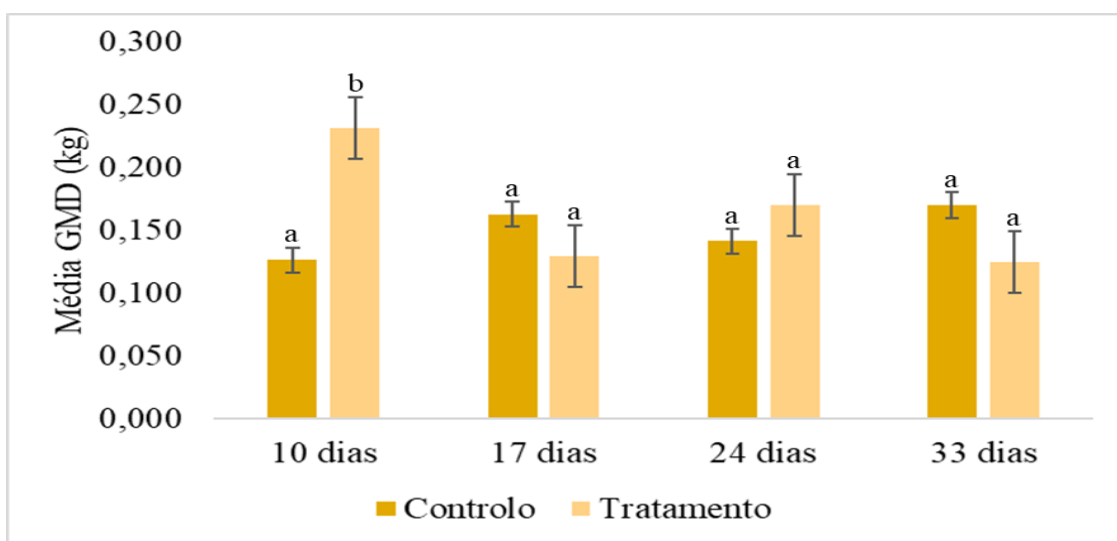


Figura 8. Ganho médio diário (kg) dos animais do grupo controlo e do grupo tratamento no período de 10, 17, 24 e 33 dias de idade. Valores seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p<0,05$).

6.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA

A comunidade bacteriana presente nas amostras de fezes, colostro e leite foi avaliada recorrendo a métodos não dependentes do cultivo (*i.e.*, metagenómica). Nas amostras de fezes, a comunidade bacteriana foi adicionalmente estudada recorrendo a métodos culturais.

6.2.1 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA NAS FEZES POR MÉTODOS CULTURAIS

O isolamento das estirpes bacterianas em meio de cultura LBA de todas as amostras de fezes recolhidas dos cordeiros pesquisados permitiu a identificação de 13 OTUs, dos quais 6 foram identificados até à família, 3 até ao género e 4 até à espécie. Os isolados mais abundantes na comunidade bacteriana, no total das amostras de fezes analisadas, pertenciam ao filo *Proteobacteria* (71% do total de isolados bacterianos), classe *Gammaproteobacteria* (71%), ordem *Enterobacterales* (69%) e família *Enterobacteriaceae* (69%) (Figura 9).

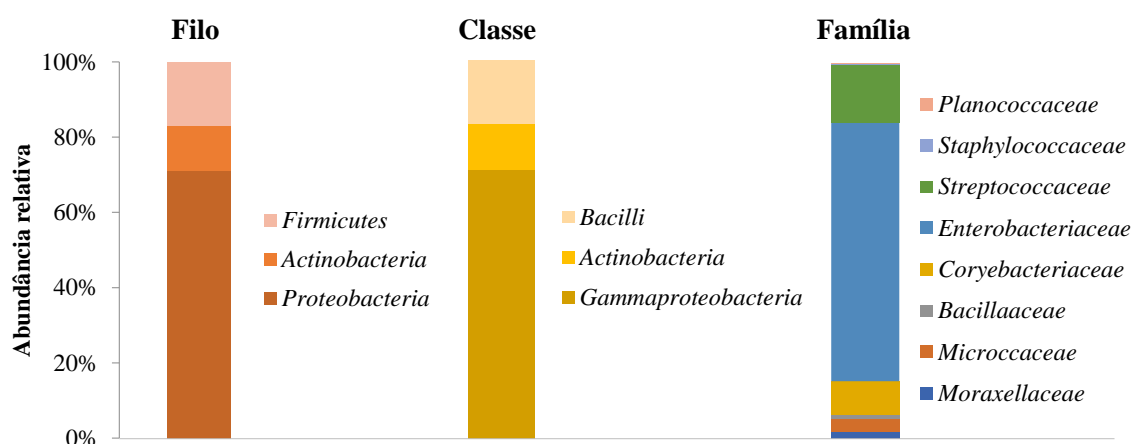


Figura 9. Abundância ao nível do filo, classe e família da comunidade bacteriana cultivável no total das amostras de fezes estudadas.

A comunidade bacteriana associada às fezes dos cordeiros controlo (sem ingestão suplementar de colostro) e tratamento (ingestão suplementar de colostro de vaca) não mostraram diferenças significativas ao nível da diversidade (Nº OTUs $p=0,373$; Shannon – Wiener $p=0,778$), abundância (UFC/g fezes $p=0,852$) e composição (Figura 10). Os resultados obtidos na ordenação NMDS mostram uma fraca separação entre fezes controlo e tratamento indicando que apresentam uma composição bacteriana similar (Figura 10A). Este resultado foi corroborado pela análise ANOSIM ($R = -0,106$; $p=0,801$). Verificou-se que a comunidade bacteriana das fezes controlo e tratamento eram dominadas por membros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (67% e 71%, respetivamente), seguida por *Streptococcaceae* (15% e 16%, respetivamente) (Figura 10B).

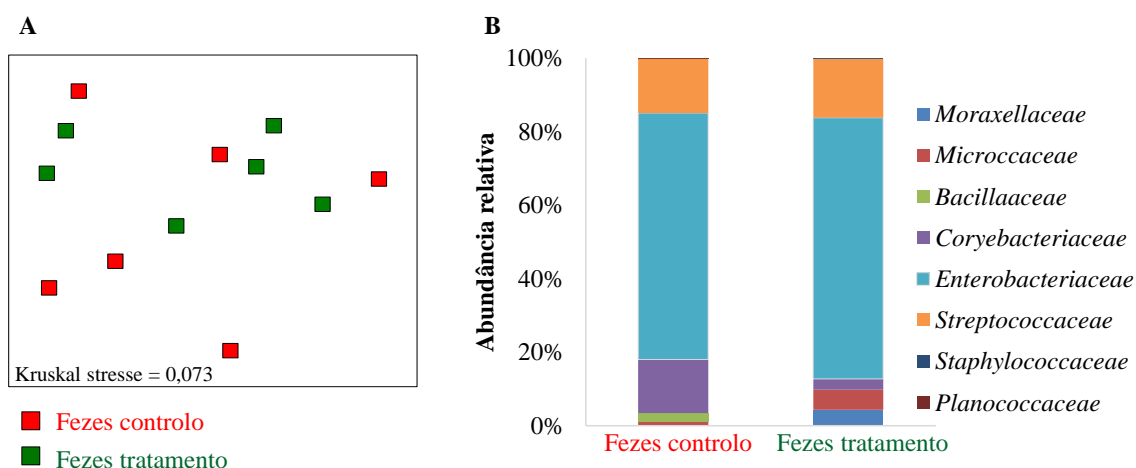


Figura 10. Composição da comunidade bacteriana cultivável presente nas fezes de cordeiro do controlo e do tratamento. (A) Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) realizada com o coeficiente de Bray-Curtis. (B) Abundância relativa de bactérias, ao nível da família.

6.2.2 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA NAS FEZES POR MÉTODOS NÃO DEPENDENTES DO CULTIVO

Das oito amostras de fezes analisadas por Illumina (4 de cordeiro controlo e 4 de cordeiro tratamento) foi eliminada uma amostra do tratamento para a análise de dados,

por ter originado um reduzido número de OTUs (6 no total). Assim, nas sete amostras de fezes analisadas foi identificado um total de 329,321 sequências (*reads*) e 1,939 OTUs, pertencentes a 12 filos, 27 classes, 38 ordens, 63 famílias e 93 géneros. Os elementos mais abundantes no total das amostras pertenciam aos filos *Firmicutes* (58% do total de *reads*) e *Bacteroidetes* (33%), classes *Clostridia* (50%) e *Bacteroidia* (33%), ordens *Clostridiales* (50%) e *Bacteroidales* (33%), família *Bacteroidaceae* (32%) e género *Bacteroides* (32%) (Figura 11).

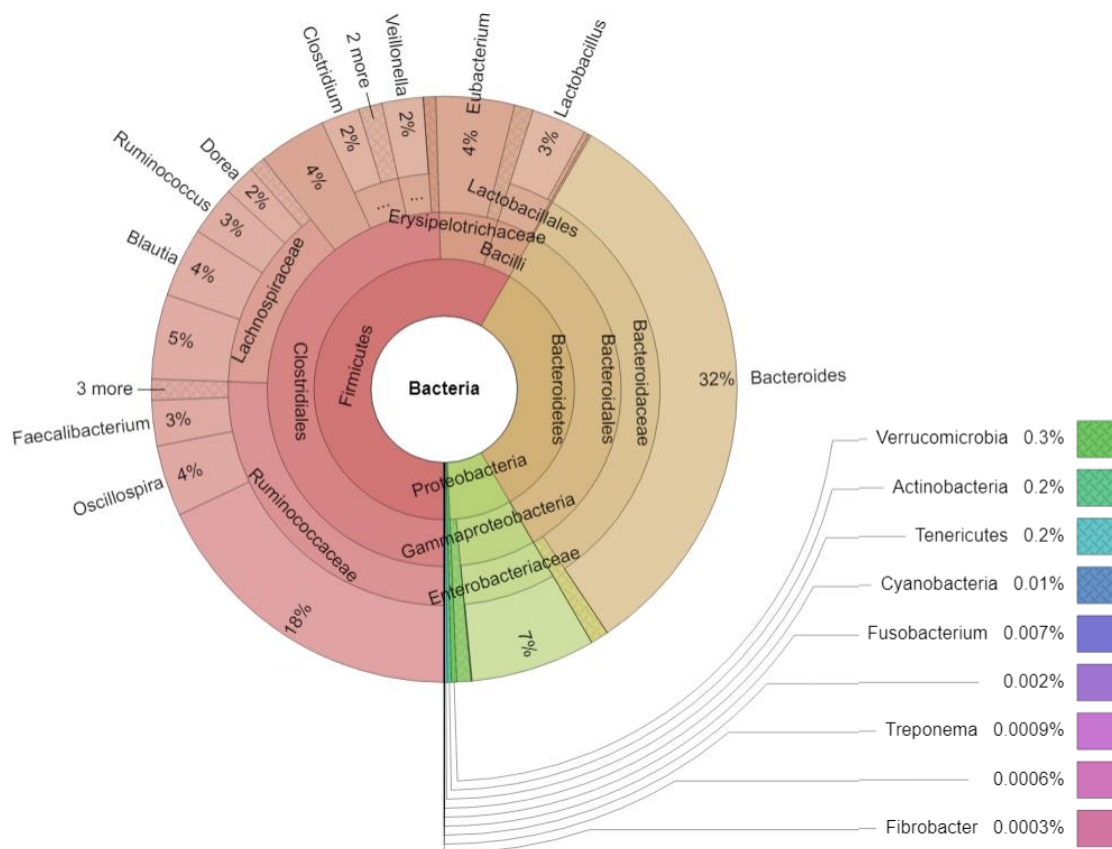


Figura 11. Gráfico krona representando a abundância em cada nível taxonómico, desde o filo até ao género, da comunidade bacteriana no total das amostras de fezes analisadas por Illumina.

A diversidade bacteriana avaliada ao nível da riqueza (nº OTUs) e índice de diversidade de Shannon-Wiener foi significativamente ($p < 0,05$) superior nas fezes dos cordeiros controlo face às fezes dos cordeiros que receberam um suplemento de colostro de vaca (Figura 12). Por sua vez, a abundância (*reads*) bacteriana foi muito similar entre

estes dois tratamentos ($p=0,22$). Curiosamente verificou-se a existência de uma maior variação na riqueza e na abundância bacteriana entre os cordeiros do tratamento do que entre os do controlo.

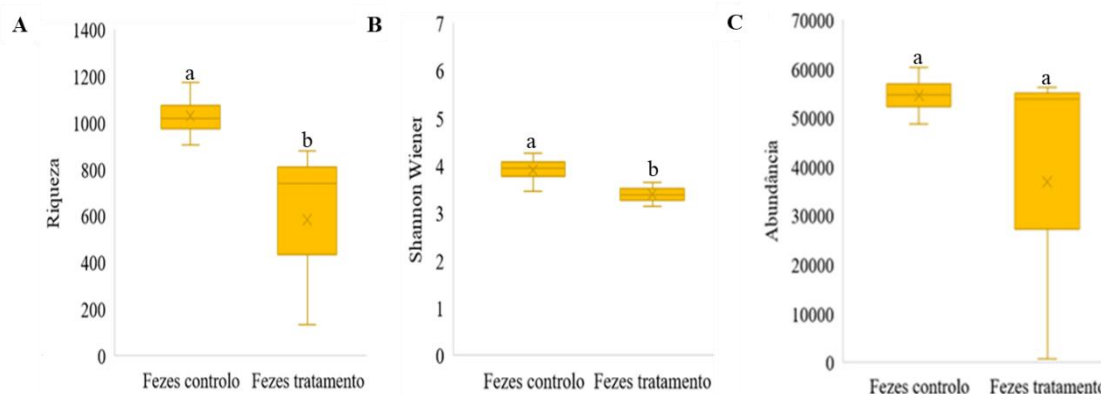


Figura 12. Box-plot da mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores mínimos e máximos da (A) riqueza, (B) Índice de Shannon-Wiener e (C) abundância da comunidade bacteriana presente nas fezes de cordeiro do controlo e do tratamento. Valores (n=4 ou 3) seguidos seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p<0,05$).

Os resultados obtidos na ordenação NMDS (Figura 13A) associada ao ANOSIM indicam que a composição da comunidade bacteriana das fezes dos cordeiros controlo é significativamente diferente ($R=0,48$; $p=0,029$) da comunidade presente nas fezes dos cordeiros que ingeriram colostro de vaca. Apesar da comunidade bacteriana de ambas as amostras ser dominada por membros pertencentes ao mesmo filo, classe e família, verificam-se diferenças ao nível das suas proporções. Por exemplo, a população bacteriana das fezes do tratamento quando comparado à do controlo apresentava uma maior abundância de elementos pertencentes ao filo *Proteobacteria* (2,0 vezes mais), classe *Gammaproteobacteria* (2,4 vezes mais), famílias *Clostridiaceae* (10,8 vezes mais), *Veillonellaceae* (3,8 vezes mais) e *Enterobacteriaceae* (2,4 vezes mais), e uma menor abundância de elementos pertencentes ao filo *Bacteroidetes* (2,9 vezes menos), classes *Bacilli* (4,7 vezes menos), *Erysipelotrichi* (3,7 vezes menos) e *Bacteroidia* (2,9 vezes menos), e famílias *Lactobacillaceae* (6,2 vezes menos), *Lachnospiraceae* (4,1 vezes menos) e *Bacteroidaceae* (2,8 vezes menos) (Figuras 13B, C e D). A análise SIMPER permitiu identificar as famílias bacterianas que mais contribuíram para a dissimilaridade da composição da comunidade bacteriana entre as fezes controlo e tratamento (Figura 14). No total, 14 famílias determinaram 50% de dissimilaridade. De entre estas, as

famílias *Lactobacillaceae* e *Odoribacteraceae*, foram as que apresentaram uma maior contribuição (9,8% no conjunto), devido à sua maior abundância nas fezes controle, seguida por membros da família *Veillonellaceae* (3,8%), por estar presente em maior abundância nas fezes tratamento (Figura 13D; Figura 14).

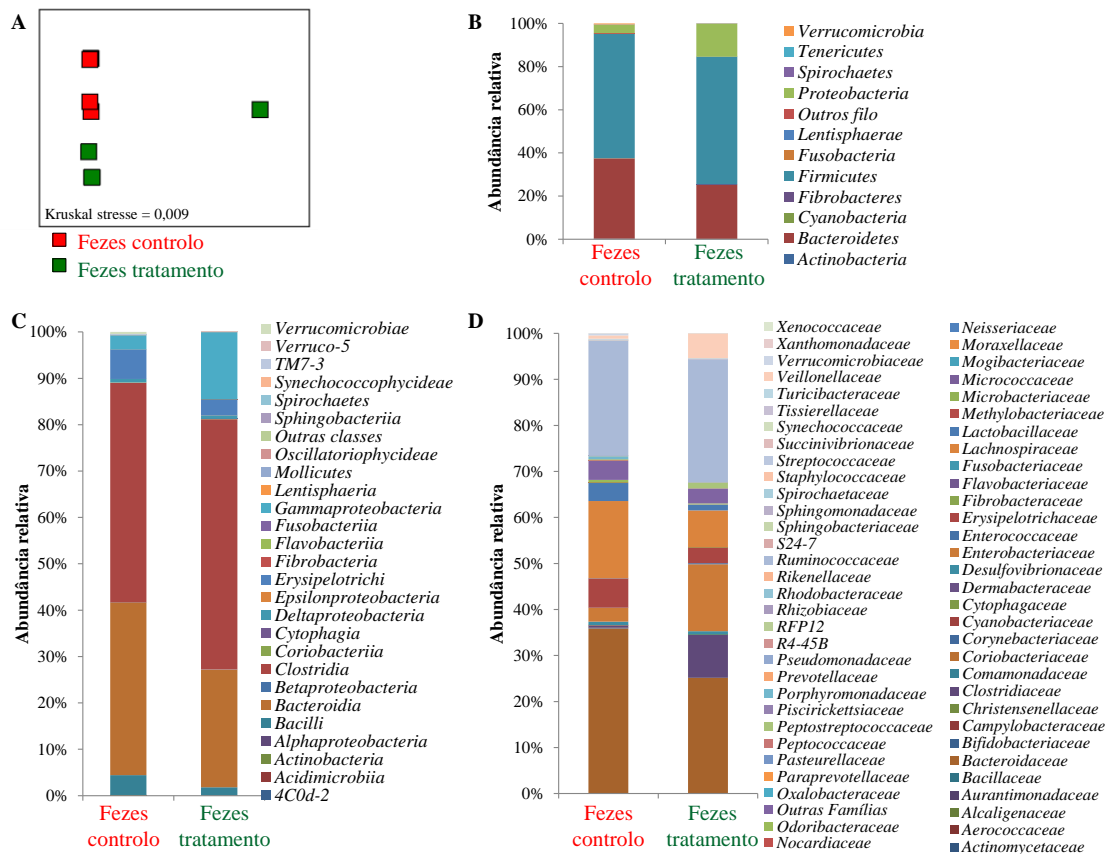


Figura 13. Composição da comunidade bacteriana presente nas fezes de cordeiro do controle e do tratamento. (A) Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) realizada com o coeficiente de Bray-Curtis. Abundância relativa de bactérias, ao nível do (B) filo, (C) classe e (D) família.

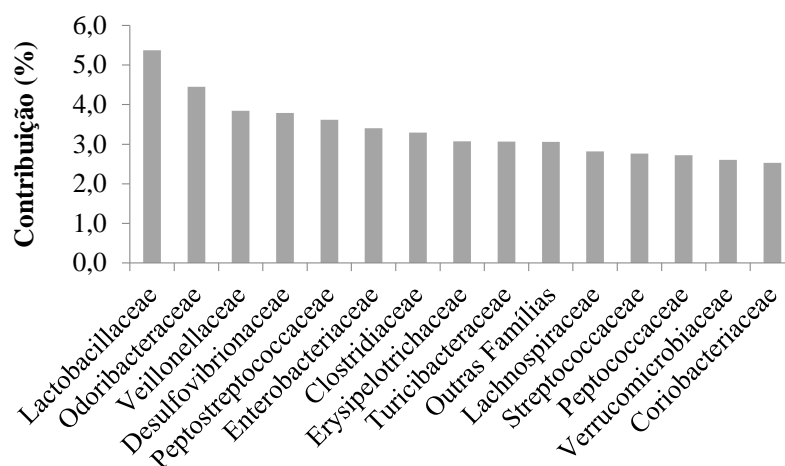


Figura 14. Famílias bacterianas que representaram até 50% da contribuição para a dissimilaridade média da composição bacteriana entre fezes controlo e tratamento determinadas pela análise SIMPER.

6.2.3 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA NO LEITE E COLOSTRO POR MÉTODOS NÃO DEPENDENTES DO CULTIVO

No total de amostras de leite das ovelhas mães (duas amostras) e de colostro de vaca (duas amostras), foi possível identificar através do método de sequenciação por Illumina 73,992 *reads* e 1,909 OTUs, pertencentes a 17 filos, 37 classes, 64 ordens, 131 famílias e 231 géneros. Os elementos mais abundantes no total das amostras de leite pertenciam aos filos *Firmicutes* (47% do total de *reads*) e *Proteobacteria* (26%), classes *Clostridia* (29%) e *Gammaproteobacteria* (18%), ordens *Clostridiales* (29%), *Pseudomonadales* (12%) e *Bacteroidales* (12%), família *Ruminococcaceae* (15%) e géneros *Acinetobacter* (8%) e *Bacteroides* (8%) (Figura 15A). Por sua vez, as bactérias mais abundantes nas amostras de colostro pertenciam aos filos *Firmicutes* (40% do total de *reads*) e *Proteobacteria* (30%), classes *Clostridia* (24%) e *Gammaproteobacteria* (19%), ordens *Clostridiales* (24%), *Pseudomonadales* (12%) e *Actinomycetales* (11%), família *Ruminococcaceae* (10%) e géneros *Acinetobacter* (5%), *Bacteroides* (4%) e *Corynebacterium* (4%) (Figura 15B).

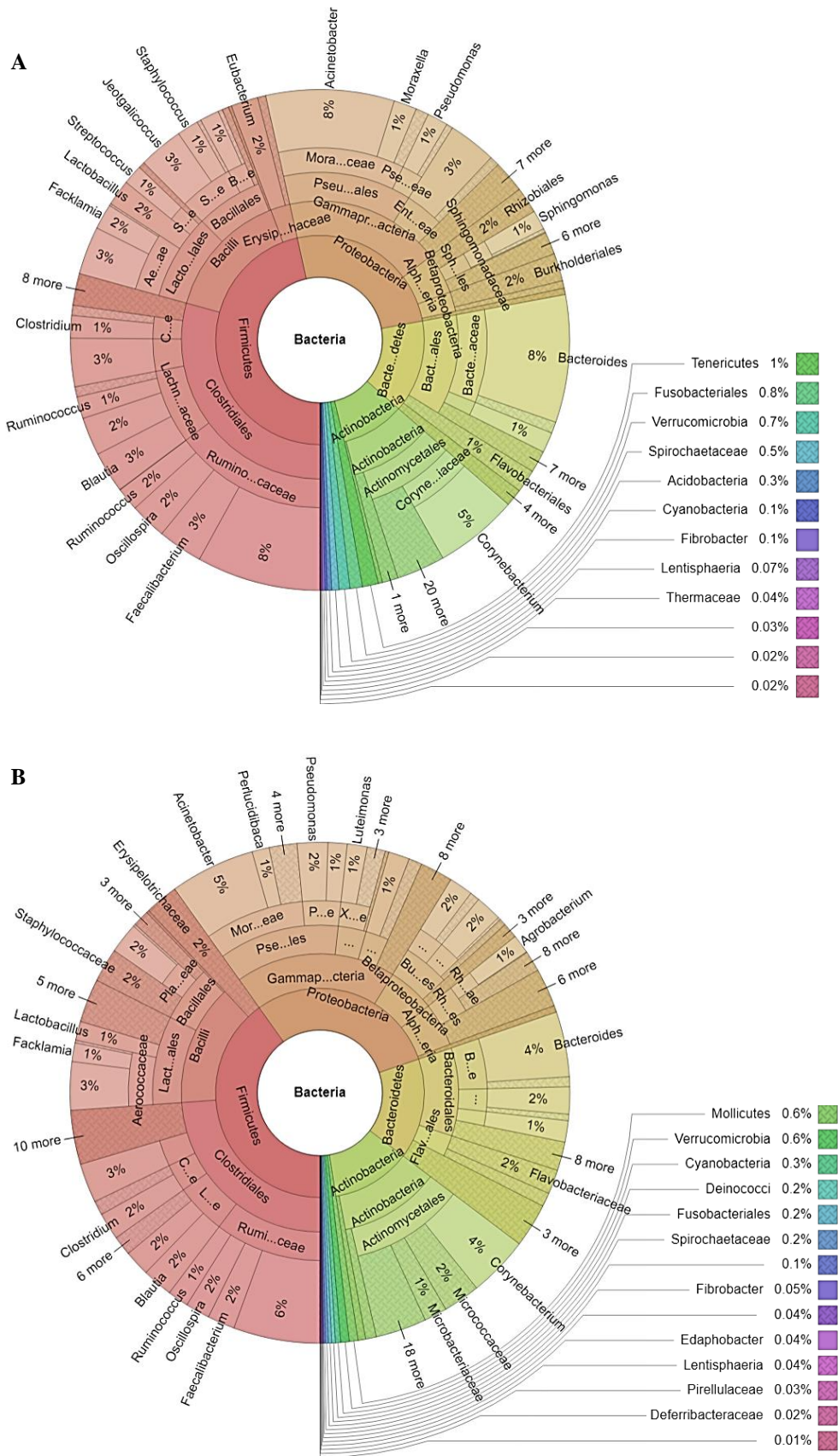


Figura 15. Gráficos krona representando a abundância em cada nível taxonômico, desde o filo até ao gênero, da comunidade bacteriana no total das amostras de (A) leite e de (B) colostro analisadas por Illumina.

Não se registraram diferenças significativas ao nível da riqueza ($p=0,997$), índice de diversidade de Shannon-Wiener ($p=0,683$) e abundância ($p=0,811$) bacteriana entre as amostras de leite (941,5 OTUs, 5,25 Shannon e 19720,5 *reads*, respectivamente) e de colostro (943,0 OTUs, 5,52 Shannon, 17275,5 *reads*, respectivamente). De igual modo, a composição da comunidade bacteriana do leite foi muito similar à do colostro ($R_{ANOSIM}=0,25$, $p=0,500$). Apesar disto, verificou-se que bactérias pertencentes a 22 famílias contribuíram até 30% para a dissimilaridade na composição bacteriana entre amostras de leite e colostro (Figura 16). A maioria destas famílias surgiu em maior abundância ou exclusivamente nas amostras de colostro, à exceção das famílias *Fusobacteriaceae*, *RFP12* e *Fibrobacteraceae*, que estavam presentes em maior abundância nas amostras de leite.

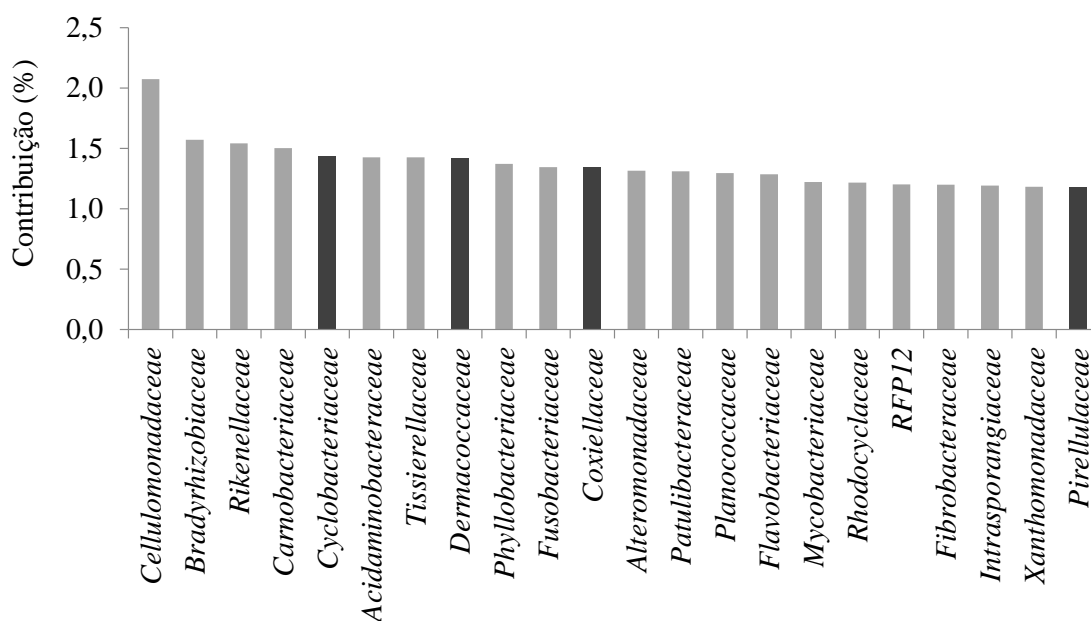


Figura 16. Famílias bacterianas que representaram até 30% da contribuição para a dissimilaridade média da composição bacteriana entre amostras de leite e colostro de vaca determinadas pela análise SIMPER. As colunas preenchidas a preto representam famílias que surgiram unicamente nas amostras de colostro.

3.2 Comparação da comunidade bacteriana entre amostras lácteas e de fezes

A comunidade bacteriana analisada por Illumina nas amostras lácteas (leite + colostro) e de fezes (controle + tratamento) foi comparada ao nível da diversidade, abundância e composição (Figuras 17 e 18). O índice de diversidade de Shannon-Wiener do total das amostras lácteas foi significativamente superior ($p=1,91839e^{-06}$) face ao total das amostras de fezes, verificando-se o resultado oposto para a abundância (*reads*) tendo sido significativamente superior ($p=0,004$) nas fezes face às amostras lácteas (Figura 17). Por sua vez, a riqueza de OTUs foi similar entre os dois tipos de amostras ($p=0,508$).

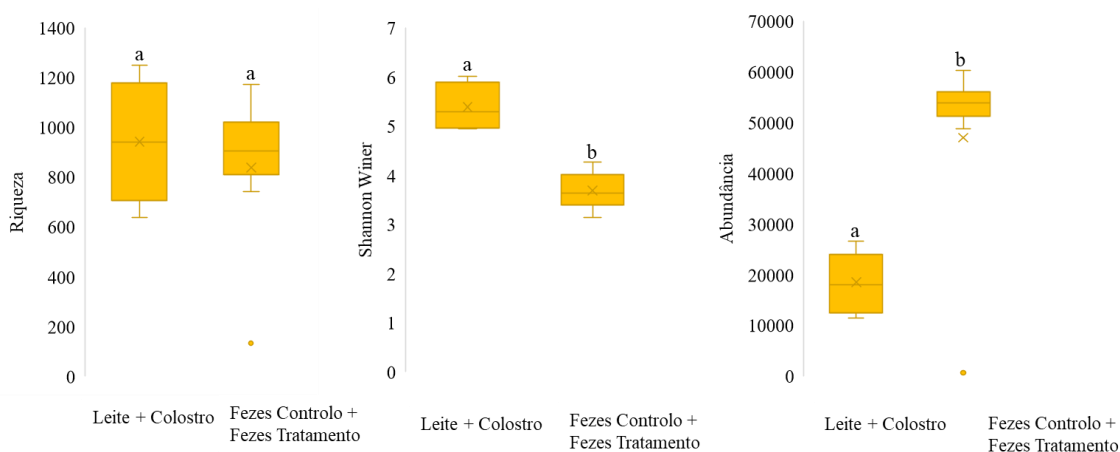


Figura 17. Box-plot da mediana, primeiro e terceiro quartil, e valores mínimos e máximos da (A) riqueza, (B) Índice de Shannon-Wiener e (C) abundância da comunidade bacteriana presente no total das amostras lácteas (leite + colostro) e das fezes (controle + tratamento). Valores ($n=4-7$) seguidos por letras diferentes são estatisticamente significativos (pelo menos $p<0,05$).

A ordenação NMDS (Figura 18A) associada ao ANOSIM indicam que a composição da comunidade bacteriana do leite+colostro é significativamente ($R=0,70$, $p=0,001$) diferente das fezes (controle+tratamento), sendo esta diferença superior quando comparado com as fezes controle ($R=1$, $p=0,014$) face às fezes tratamento ($R=0,65$, $p=0,029$). No total, 14 famílias contribuíram até 50% para a dissimilaridade na composição bacteriana entre amostras lácteas e fezes controle, tendo as famílias *Bacteroidaceae*, *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* apresentado a maior contribuição (23,3% no conjunto) (Figura 18B). Por sua vez, 50% da dissimilaridade encontrada na composição da comunidade bacteriana entre amostras lácteas e fezes tratamento foi

devido a 17 famílias, sendo *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* e *Enterobacteriaceae* as que mais contribuiram (16,0 % no seu conjunto) (Figura 18B).

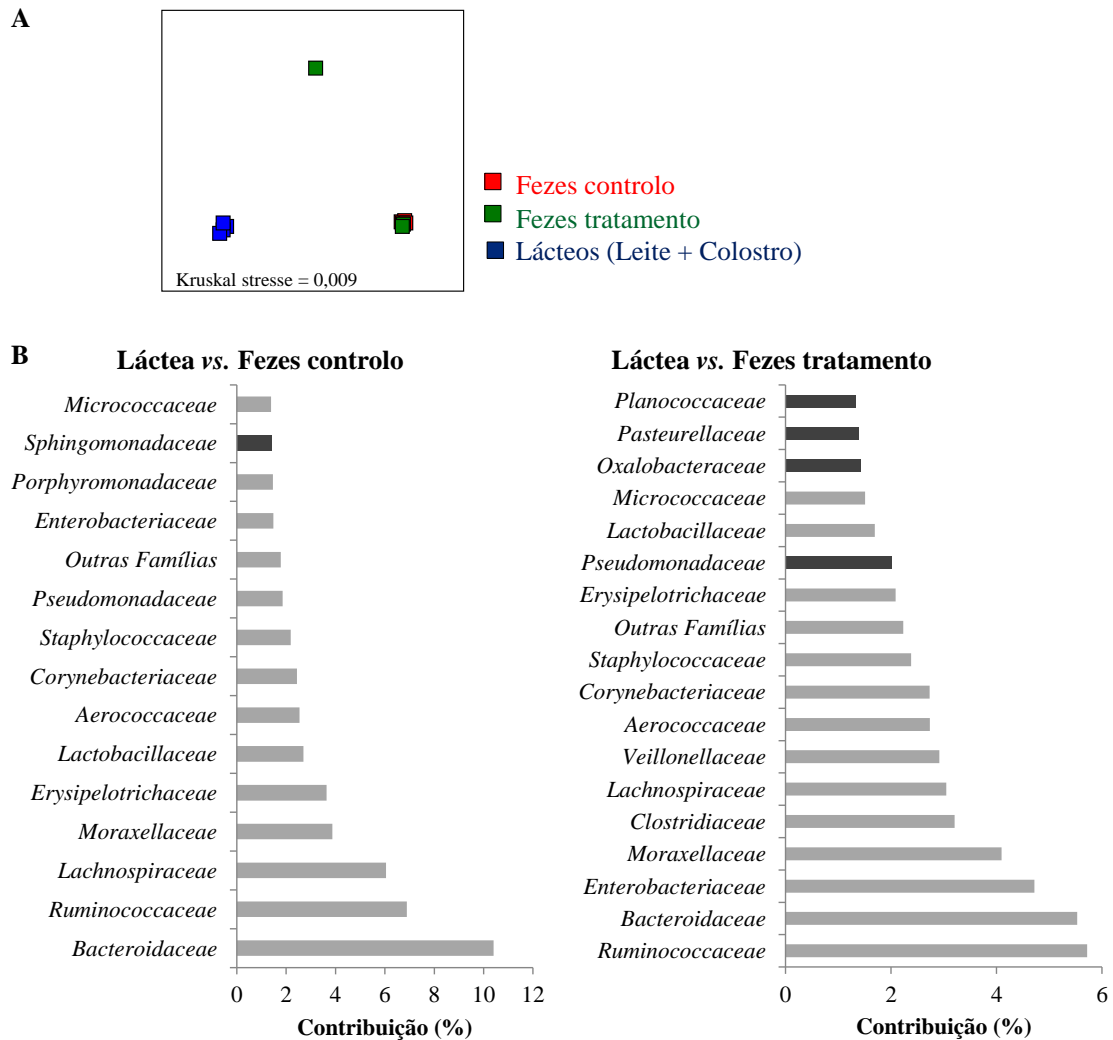


Figura 18. Composição da comunidade bacteriana presente nas amostras lácteas (leite + colostro) e de fezes (controlo + tratamento). (A) Ordenação não métrica multidimensional (NMDS) realizada com o coeficiente de Bray-Curtis da comunidade bacteriana agrupada por amostras (lácteas, fezes controlo e tratamento). (B) Famílias bacterianas que representaram até 50% da contribuição para a dissimilaridade média da composição bacteriana entre amostra lácteas vs. fezes controlo e amostras lácteas vs. fezes tratamento, determinadas pela análise SIMPER. As colunas preenchidas a preto representam famílias que surgiram unicamente nas amostras lácteas.

Identificou-se um grande número de famílias e géneros bacterianos exclusivos das amostras lácteas (colostro: 19 famílias e 44 géneros; leite: 6 famílias e 21 género) quando comparado com as amostras de fezes (apenas as amostras de controlo apresentaram 3 géneros exclusivos) (Figura 19). O número de famílias e géneros comuns entre amostras lácteas e fezes foi superior para as fezes controlo (9 famílias e 16 géneros) face às fezes tratamento (4 famílias e 8 géneros). Em particular, não se registaram géneros bacterianos comuns entre colostro e fezes tratamento. Do total de géneros identificados, apenas 21,6% eram comuns às quatro amostras biológicas estudadas (leite, colostro, fezes controlo e tratamento).

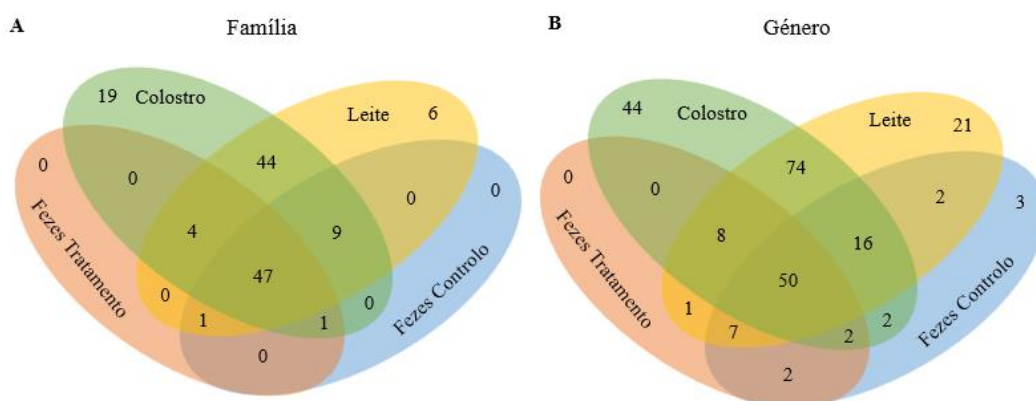


Figura 19. Diagrama de Venn indicando o número de (A) famílias e (B) géneros bacterianos exclusivos e partilhados entre as diferentes amostras (leite, colostro, fezes controlo e fezes tratamento) identificadas por Illumina.

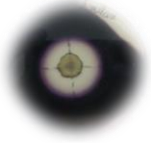
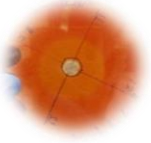

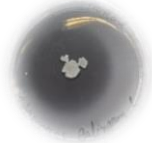
6.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS BACTÉRIAS PRESENTES NAS FEZES

No total dos isolados bacterianos obtidos das amostras de fezes por métodos culturais (16 isolados, dos quais 13 oriundos das fezes do tratamento e 3 oriundos das fezes do controlo), foi avaliada a sua capacidade em sintetizar as enzimas amílase, celulase, lípase e protéase. Os resultados obtidos mostram que do total dos isolados provenientes das fezes do tratamento, 12 apresentaram capacidade em produzir amílase,

3 produziram celulase, 7 produziram lípase e por fim, 11 produziram protéase (Tabela 2). Dos 3 isolados provenientes das fezes dos cordeiros do controlo, *Bacillus* sp. revelou a capacidade em produzir amílase, celulase, lípase e protéase, e os isolados *Enterobacteriaceae* 1 e 3 produziram protéase.

De entre os isolados bacterianos testados no presente estudo, *Acinetobacter* sp., foi o que exibiu uma maior atividade amilásica, celulásica e lipásica (Tabela 2). Por sua vez, o isolado *Jeotgalicus* sp. foi o que apresentou uma maior capacidade produtiva de protéase.

Tabela 2. Atividade enzimática (média da área do halo mm²± erro padrão, n=3) de bactérias isoladas de fezes de cordeiro controle e tratamento

Isolado bacteriano	Fezes do				
		Amílase	Celulase	Lípase	Protéase
<i>Bacillus sp. 1</i>	Controlo	35,41 ± 6,12	84,15 ± 9,77	26,9 ± 5,12	266,6 ± 15,72
<i>Enterobacteriaceae 1</i>	Controlo	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	7,26 ± 4,17
<i>Enterobacteriaceae 3</i>	Controlo	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Acinetobacter sp.</i>	Tratamento	76,3 ± 3,48	104 ± 12,4	166 ± 0,51	264,5 ± 49,49
<i>Arthobacter sp.</i>	Tratamento	17,03 ± 3,69	0 ± 0	101 ± 1,85	14,33 ± 0,46
<i>Bacillus sp. 1</i>	Tratamento	33,69 ± 6,26	66,75 ± 3,77	23,2 ± 4,56	217,6 ± 21,84
<i>Corynebacter sp.</i>	Tratamento	6,04 ± 3,02	0 ± 0	22,4 ± 6,55	160,4 ± 142,2
<i>Enterobacteriaceae 1</i>	Tratamento	4,44 ± 1,19	0,62* ± 0	0 ± 0	128,3 ± 47,79
<i>Enterobacteriaceae 2</i>	Tratamento	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	146,4* ± 0
<i>Enterobacteriaceae 3</i>	Tratamento	32,75 ± 9,28	6,64 ± 3,35	0 ± 0	29,85* ± 0
<i>Enterobacteriaceae 4</i>	Tratamento	2,75 ± 1,91	0 ± 0	0 ± 0	8,83 ± 6,95
<i>Enterobacteriaceae 5</i>	Tratamento	2,75 ± 1,91	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Enterobacteriaceae 6</i>	Tratamento	14,02* ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<i>Enterococcus galinarum</i>	Tratamento	27,39 ± 2,95	90,27 ± 5,08	6,5 ± 2,13	202,4 ± 5,34
<i>Jeotgalicus sp.</i>	Tratamento	32,66 ± 4,6	0 ± 0	4,52* ± 0	313,2 ± 60,79
<i>Planococcus sp.</i>	Tratamento	43,21 ± 5,66	0 ± 0	4,81* ± 0	188,3 ± 20,32

*Resultado relativo a 1 repetição

Capítulo 7: Discussão

7.1 PESO DOS ANIMAIS

Embora não se tenham observado diferenças significativas na evolução do peso ao longo do ensaio quando se compara o grupo tratamento com o controlo em termos de ganho médio diário o grupo tratamento mostrou uma vantagem significativa nos primeiros dez dias de vida dos cordeiros. Como não se verificaram diferenças significativas entre o peso ao nascimento no grupo controlo e tratamento, essa vantagem em termos de GMD de peso, pelo grupo tratamento poderá ser explicada pelo maior aporte nutricional fornecido pelo colostro de vaca, que se revelou ser muito importante nesse período de vida dos cordeiros.

Este facto ganha consistência quando constatamos que os cordeiros são todos de partos duplos e que por isso o colostro/leite das ovelhas pode não ter sido suficiente para os animais do controlo expressarem o seu potencial de crescimento. Sabemos que a partir do 3º dia de vida os cordeiros já não têm a capacidade de absorver imunoglobulinas, que poderiam estar presentes no colostro de vaca (GODDEN, 2008), mas em termos nutricionais e de acordo com a bibliografia este revela-se muito superior ao leite em termos de proteínas, gorduras, hidratos de carbono, vitaminas, hormonas e factores de crescimento como a lactoferrina (BLUM, 2006), não sendo também de descorar a ação que estes factores possam ter a nível local, na microbiota intestinal.

Podemos questionar o porquê de o maior GMD de peso não ter sido significativo no grupo tratamento quando comparado com o controlo nos restantes períodos do ensaio. Quanto a esta questão gostaríamos de referir que embora o aumento de peso ao longo do ensaio, no grupo tratamento não se tenha revelado significativamente diferente este peso foi sempre superior ao do controlo, mas aqui tivemos dois factores que poderão ter sido decisivos para este resultado, em primeiro lugar o número de animais do ensaio ser pequeno e a quantidade de colostro que deveria ter sido aumentada progressivamente, ao longo do ensaio, já que as necessidades nutricionais também aumentam com a idade dos cordeiros.

Não foi possível aumentar o colostro de vaca ingerido por dia ao longo do ensaio pelo grupo tratamento, pois os cordeiros como se encontravam junto das mães mamavam sempre que podiam, não estando receptivos a acréscimos da dose de colostro administrada. Para aumentar a ingestão do colostro teríamos que ter separado os cordeiros das mães por alguns períodos durante o dia.

No que se refere à espécie ovina e à temática do nosso estudo a bibliografia é escassa. Nessa perspectiva citaremos alguns estudos realizados em bovinos. Assim, num trabalho realizado por SAALFELD, et al. (2013) com 31 bezerros da raça Holstein-Frísia no qual foi utilizada silagem de colostro (4,5L dividido em duas tomas do 5º dia de vida até ao 15º dia de vida a partir desta data e até ao desmame reduziu-se a quantidade de silagem de colostro para 3,5L administrada uma vez ao dia) como substituto do leite, durante o período de aleitamento, ressaltando que também a partir do 7º dia do nascimento foi introduzida em ambos os grupos (controlo e tratamento) 50 g de ração comercial sendo esta dobrada a cada cinco dias até aos 800g. O autor verificou que o grupo que recebeu a silagem de colostro como substituto do leite obteve durante o período de aleitamento um ganho médio de peso diário superior ao do controlo.

Num estudo realizado por JOSLIN *et al.*, (2002) que avaliaram a adição de lactoferrina a um substituto de leite para bezerros, foi constatada a prevenção de doenças neonatais e o aumento do GMD de peso no período de aleitamento. Como no nosso trabalho para além do colostro de ovelha utilizado em ambos os grupos (controlo e tratamento), adicionamos colostro de vaca, ao grupo tratamento, que possui maior percentagem de lactoferrina quando comparado com o leite (PAKKANEN; AALTO, 1997), este pode ter sido um dos factores a interferir no maior ganho de peso até aos 10 dias de idade dos cordeiros do grupo tratamento.

7.2 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS FEZES DE CORDEIROS

A composição e estrutura da comunidade bacteriana presente nas fezes dos cordeiros estudados foi avaliada por dois métodos diferentes, *i.e.*, métodos dependentes e não dependentes do cultivo. No primeiro método, a comunidade bacteriana foi caracterizada através do isolamento das bactérias em meio de cultura seguida pela identificação molecular dos isolados obtidos. Por sua vez, no método independente de cultivo, a diversidade bacteriana foi estimada através da extração do DNA total das amostras de fezes seguida pela

amplificação e sequenciação de nova geração de uma porção do gene que codifica o rRNA 16S (*i.e.*, metagenómica). É conhecido que o método dependente de cultivo é limitado pelo facto de permitir estimar apenas a diversidade de bactérias com capacidade de crescer rapidamente em meio de cultura. De facto, estima-se que somente uma pequena percentagem dos microrganismos (cerca de 1%) podem ser detectados por este processo (BRULC et al., 2010), apresentando a maioria incapacidade de crescer em meio de cultura. Apesar desta limitação, a obtenção da fração cultivável continua a ser importante por permitir conhecer melhor a função destes microrganismos num determinado ambiente. Por exemplo, no presente estudo, a coleção de isolados bacterianos obtida foi caracterizada em termos da sua capacidade em sintetizar enzimas líticas (aspeto que será abordado mais à frente).

O método independente de cultivo ao identificar, potencialmente, todas as espécies/estirpes presentes nas amostras de fezes permite ultrapassar o problema dos microrganismos não cultiváveis. De facto, este método permitiu detetar uma maior diversidade taxonómica (12 filos, 27 classes, 38 ordens, 63 famílias e 93 géneros) face ao método dependente de cultivo (3 filos, 3 classes, 6 ordens, 8 famílias e 7 géneros). No entanto, verificou-se que alguns géneros foram somente detetados pelo método dependente de cultivo, tais como o género *Planococcus*. Adicionalmente verificou-se que, apesar dos filos detetados no método dependente de cultivo também surgirem no método independente de cultivo, houve diferenças consideráveis ao nível da sua abundância. Face a estes resultados podemos concluir que estes dois métodos são complementares na caracterização da diversidade bacteriana fecal.

Estudos focados na diversidade taxonómica de comunidades microbianas presente nas fezes de cordeiros são muito escassos. No total das amostras de fezes analisadas pelo método dependente de cultivo foi identificado uma predominância de bactérias pertencentes ao filo *Proteobacteria* e famílias *Enterobacteriaceae* e *Streptococcaceae*. O filo *Proteobacteria* é comumente encontrado como o mais abundante do rúmen, do cólon e das fezes de vacas pré-desmamadas (MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2015) e do rúmen de ovinos (MORGAVI et al., 2015). Membros da família *Enterobacteriaceae* (filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria* e ordem *Enterobacterales*) são encontrados frequentemente no ambiente e compõem a microbiota do sistema digestivo de ruminantes e de não ruminantes (*e.g.*, humanos e cavalos) (JENKINS et al., 2017). Esta família inclui alguns géneros patogénicos, tais como *Salmonella*, *Shigella* e a espécie *Escherichia coli* capazes de causar doenças digestivas (JENKINS et al., 2017). A presença de membros da família *Streptococcaceae* (filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Lactobacillales*) tem sido

observada em diversos habitats, incluindo o sistema digestivo humano e mais frequentemente em fezes de animais ruminantes, onde parecem ter a função de participar no estabelecimento da microbiota normal do rúmen (REY et al., 2014). Alguns membros desta família, quando em altas concentrações, podem causar doenças em humanos (*e.g.*, mastite e pneumonia) e em animais (LORY, 2014a).

A análise independente de cultivo detetou, no total das amostras de fezes analisadas, uma comunidade bacteriana dominada por membros pertencentes ao filo *Firmicutes*, que possui a capacidade de degradar a fibra e a celulose em ruminantes, e ao filo *Bacteroidetes*, que são conhecidos por degradar hidratos de carbono complexos (WANG et al., 2017). Similarmente, estes dois filios foram detetados como os mais abundantes da microbiota fecal de cordeiros da raça *Arcott* canadense alimentados com trevo roxo do prado (*Dalea purpurea* Vent.) e alfafa (*Medicago sativa*) (HUANG et al., 2018). Bactérias destes dois filios foram também encontradas em grande abundância em amostras do ceco, reto e fezes de ovinos adultos (MAMUN et al., 2020; ZHANG et al., 2018), em fezes de bovinos de carne (DURSO et al., 2010) e de cavalos (STEELMAN et al., 2012), indicando a importância destes filios na composição da microbiota intestinal.

A diversidade e composição da comunidade bacteriana variou significativamente entre amostras de fezes de cordeiros alimentados sem (controlo) e com (tratamento) suplemento de colostro de vaca. Ao contrário do expectável, as fezes dos cordeiros controlo apresentavam uma maior diversidade bacteriana face às fezes dos cordeiros alimentados com um suplemento de colostro. O colostro possui um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune, que impede o crescimento de microrganismos patogénicos pela indução da secreção de substâncias antimicrobianas (*e.g.*, lactoferrina) (PAKKANEN; AALTO, 1997; RACHMAN; MAHESWARI; BACHROEM, 2015). Este mecanismo de proteção pode ter impedido e/ou reduzido o crescimento de alguns grupos bacterianos, justificando a reduzida diversidade de bactérias nas amostras de fezes do tratamento face ao controlo.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a administração do colostro influenciou a composição bacteriana das fezes. As fezes do controlo distinguiam-se das fezes do tratamento por possuir uma menor abundância de bactérias do filo *Proteobacteria* e uma maior abundância de bactérias do filo *Bacteroidetes*. Em bovinos pré-ruminantes alimentados com substitutos de leite, observou-se que durante a fase de transição (quando o pré-ruminante começa gradualmente a alimentar-se de alimentos sólidos) a abundância do filo *Proteobacteria* diminuía e a do filo *Bacteroidetes* aumentava no rúmen dos animais (Li et al. 2012). Similarmente, MEALE et al. (2016), verificaram que a abundância relativa

destes dois filos no rúmen de vacas leiteiras variava de acordo com o estágio do desenvolvimento ruminal e com o tipo de dieta. De uma maneira geral, os estudos que abordam a composição bacteriana ao longo do sistema digestivo e o estabelecimento da microbiota do rúmen indicam diferenças na composição microbiana, sendo o ambiente do estômago do ruminante (*i.e.*, rúmen, retículo, omaso e abomaso) e o ambiente intestinal distal (*i.e.*, ceco, cólon e reto) do ruminante mais complexo na composição bacteriana quando comparado com o ambiente intestinal proximal (*i.e.*, duodeno, jejuno e íleo) devido à presença de concentrações altas da bile e de enzimas digestivas que impedem o crescimento bacteriano (MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2015; WANG et al., 2017). Estas diferenças na composição bacteriana presente ao longo do trato gastro intestinal do ruminante sugerem que os estudos baseados em amostras fecais não revelam a verdadeira microbiota do sistema digestivo (MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2014, 2015). Apesar disto, a alteração da abundância dos filos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* entre fezes controlo e tratamento observadas no presente estudo, sugerem que, à semelhança do descrito para os bovinos, a administração do colostro nos ovinos possa contribuir para um atraso do desenvolvimento das papilas ruminais do grupo tratamento, pois o desenvolvimento funcional do rúmen é estimulado com o consumo de alimentos sólidos (*e.g.*, grãos) e em pequenos ruminantes alimentados com a dieta líquida (*e.g.*, leite) por tempo prolongado, pode retardar a maturação do rúmen e das papilas ruminais (COSTA et al., 2003). Esta hipótese carece, no entanto, de confirmação através do estudo da microbiota alojada no trato gastro intestinal.

A nível taxonómico mais baixo verificaram-se igualmente diferenças na composição bacteriana entre fezes controlo e tratamento. As fezes dos cordeiros controlo distinguiram-se das fezes dos cordeiros tratamento por possuírem uma maior abundância de elementos pertencentes às famílias *Lactobacillaceae* e *Odoribacteraceae*, e uma menor abundância de isolados da família *Veillonellaceae*. As bactérias da família *Lactobacillaceae* são conhecidas por produzirem ácido láctico, um composto comumente utilizado como probiótico (SOCCOL et al., 2010). Bactérias desta família foram encontradas em grande abundância no ceco e no reto de ovinos (ZHANG et al., 2018). Membros da família *Odoribacteraceae* são comumente encontrados na microbiota fecal de humanos e de ratos (CHENG et al., 2019; LU et al., 2019). Bactérias desta família encontram-se descritas como produtoras de butirato, um composto essencial para a manutenção da saúde de colónias microbiana da mucosa do cólon, e de induzir a diferenciação das células T do sistema imune o que ajuda a manter a microbiota intestinal saudável (FURUSAWA et al., 2013). Diversos membros da família

Veillonellaceae têm sido identificados, em grande abundância, em todas as seções do sistema digestivo de ovelhas (WANG et al., 2017), bovinos de leite (REY et al., 2014) e em humanos (LU et al., 2019). São conhecidos devido à sua capacidade em exibir várias respostas de resistência a agentes antimicrobianos (MARCHANDIN; JUMAS-BILAK, 2014) e também pelas suas propriedades probióticas de alguns géneros (OUWERKERK; KLIEVE; FORSTER, 2002). Neste âmbito, a espécie *Megasphaera elsdenii*, tem tido particular interesse na prevenção ou redução da acidose em bovinos, devido à capacidade de fermentar 74-97% de lactato ruminal (OUWERKERK; KLIEVE; FORSTER, 2002). Adicionalmente, verificou-se que os géneros *Lachnospira*, *Succiniclasicum* e *Coprobacillus* surgiram exclusivamente nas amostras de fezes controlo. O género *Lachnospira* é raramente encontrado noutros ambientes que não o rúmen, tendo sido porém detetado de forma ocasional nas fezes de porcos e humanos (CORNICK et al., 1994; HARMSEN et al., 2002). Membros deste género apresentam propriedades em degradar pectina e alguns compostos relacionados em diversos substratos (COTTA; FORSTER, 2006). O género *Succiniclasicum* é normalmente o mais abundante no ambiente ruminal de animais adultos, novilhas (LIU et al., 2017) e cordeiros (YU et al., 2020). Este grupo de bactérias é especializado em fermentar o succinato, convertendo-o em propionato, que é o precursor mais importante da glicose em ruminantes, contribuindo deste modo para uma melhoria da conversão alimentar nestes animais (LIU et al., 2017; VAN GYLSWYK, 1995; YU et al., 2020). O género *Coprobacillus* é um membro do subfilo *Clostridium*, tendo sido já descrita a sua presença em fezes humanas (KAGEYAMA; BENNO, 2000). Não se sabe muito bem qual é a origem destes 3 géneros nas fezes dos cordeiros controlo. No entanto, pensa-se que estes possam ter tido origem da água contaminada com microrganismos ruminais que foram eliminados pela eructação e/ou através do contacto das fezes dos animais adultos. De facto, estes constituem processos normais da colonização da microbiota intestinal e do desenvolvimento dos pré-estômagos (*i.e.*, rúmen, retículo e omaso) (LEEK, 1996; MEALE et al., 2016). Apesar das diferenças encontradas ao nível da diversidade e composição bacteriana entre fezes controlo e tratamento, é necessário investigar mais sobre o efeito da suplementação do colostro na composição bacteriana das fezes.

7.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NAS AMOSTRAS LÁCTEAS

A maioria dos estudos que focam a diversidade taxonômica das comunidades microbianas no colostro e no leite de animais de produção, têm-se centrado no grupo de microrganismos patogênicos (*e.g.*, mamite) (LIMA et al., 2017) e bactérias lácticas (*i.e.*, *Bifidobacterium sp.*, *Bacillus sp.* e *Lactobacillus sp.*), que podem ser utilizadas como probióticos (YAMAGUISHI, 2013). Para além disso, a maioria destes estudos utilizaram métodos dependentes de cultivo que possuem grandes limitações na identificação da composição microbiana total. O leite de ovelha e o colostro de vaca apresentaram uma diversidade e composição bacteriana muito similar, sendo dominada por membros pertencentes aos filos *Firmicutes* e *Proteobacteria*, e géneros *Acinetobacter* e *Bacteroides*. Similarmente, no estudo de LIMA et al. (2017), foi observado uma predominância dos géneros *Bacteroides* e *Acinetobacter* na microbiota do colostro bovino associado com a mamite clínica em vacas da raça Holstein-Frísia múltíparas e primíparas. O género *Bacteroides* (filo *Bacteroidetes*, classe *Bacteroidetes*, ordem *Bacteroidales*, família *Bacteroidaceae*) é frequentemente encontrado na microbiota normal do sistema digestivo do homem e de animais mamíferos; Mas alguns membros deste género quando presente em altas concentrações podem tornar-se patogênicos oportunistas (PATRICK, 2014), como a espécie oportunista *Bacteroides fragilis* que pode causar diarreias em cordeiros recém-nascidos (MYERS et al., 1984). Algumas espécies de *Bacteroides* possuem ainda a capacidade de hidrolisar o amido no rúmen, (COTTA, 1988), e de sintetizar enzimas celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas (PATRICK, 2014). O género *Acinetobacter* (filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales*, família *Moraxellaceae*) encontra-se normalmente no leite humano como uma bactéria comensal (MOUGHAN et al., 1992), mas também no colostro humano (TOSCANO et al., 2017) e no intestino delgado de novilhas desmamadas (MALMUTHUGE; GRIEBEL; GUAN, 2014).

Apesar da similaridade na composição bacteriana entre o leite de ovelha e o colostro de vaca, este último apresentou um conjunto de famílias exclusivas. A família *Cyclobacteriaceae* é normalmente encontrada em diversos habitats (*e.g.*, águas marinhas e fontes termais) e algumas espécies desta família apresentam a capacidade de degradar polissacarídeos e outras macromoléculas (*e.g.*, caseína e lipídios) (PINNAKA; TANUKU, 2014). A família *Coxiellaceae*, inclui bactérias que são normalmente transmitidas por insetos (*e.g.*, carraças) e algumas espécies desta família causam abortos em ovelhas (LORY, 2014b;

GONZÁLEZ et al., 2020). Por fim, membros da família *Pirellulaceae* são frequentemente encontrados no solo (HERMANS et al., 2017), enquanto que a família *Dermacoccaceae* é geralmente encontrada na pele humana (STACKEBRANDT, 2015) e no leite de bovinos (QUIGLEY et al., 2013). Adicionalmente, as amostras de leite de ovelha apresentavam uma maior abundância de bactérias pertencentes às famílias *Fusobacteriaceae*, *RFP12* e *Fibrobacteraceae*, face às amostras de colostro de vaca. Estas três famílias são frequentemente encontradas no ambiente ruminal e em amostras fecais, e geralmente apresentam capacidades fermentativas e enzimáticas. Por exemplo, algumas espécies da família *Fusobacteriaceae* foram já identificadas na microbiota intestinal normal de animais ruminantes e não ruminantes (OLSEN, 2014) e também na microbiota fecal de humanos (LU et al., 2019). Estas bactérias são conhecidas por degradarem hidratos de carbono, aminoácidos e peptídeos, com formação de ácidos orgânicos (e.g., ácido acético, propiónico, fórmico e succíneo) (OLSEN, 2014). De igual modo, foi observada a presença de bactérias da família *RFP12* no rúmen de vacas de leite da raça Holstein-Frísia pré-desmamadas (MEALE et al., 2016), em amostras fecais de cavalos (STEELMAN et al., 2012) e sistema digestivo da raça ovina Han de cauda pequena (WANG et al., 2017). Bactérias da família *Fibrobacteraceae* foram já encontradas no rúmen de vários animais, incluindo vacas leiteiras (REY et al., 2014), cordeiros na fase de transição (MORGAVI et al., 2015; WANG; MCALLISTER, 2002) e ovinos adultos (LOPES, 2013), e são, na sua maioria, bactérias com atividade celulolítica (RANSOM-JONES et al., 2012).

7.4 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO BACTERIANA PRESENTE ENTRE AS AMOSTRAS LÁCTEAS E FEZES

Estudos que relacionam o efeito da suplementação do colostro ingerido para além das primeiras horas ao nascer com a microbiota das fezes em animais são escassos, sendo este, o primeiro estudo a avaliar este efeito da suplementação do colostro bovino na composição da microbiota fecal dos cordeiros da raça Churra Galega Bragançana. A importância do colostro como fonte de bactérias de origem materna no processo de colonização do sistema digestivo dos recém-nascidos tem vindo a ser discutido (PEREZ et al., 2007). No presente estudo verificou-se que a composição bacteriana das amostras lácteas era distinta das amostras fecais, sugerindo que a comunidade presente nas fezes não teve origem a partir do leite/colostro ingerido pelos cordeiros. No entanto, verificou-se que a

diferença face às amostras lácteas era superior nas fezes do controlo do que nas do tratamento. A similaridade (ou dissimilaridade) das espécies bacterianas entre estas amostras foram medidas com o índice Bray-Curtis que tem em consideração a abundância relativa das espécies (MAGURRAN, 2004). Este resultado sugere que a composição da comunidade bacteriana relativa das fezes é influenciada pela administração do colostro bovino; E que este efeito parece ser sobretudo ao nível da abundância e não tanto na presença/ausência de espécies. Este resultado foi corroborado pelos diagramas de venn que mostraram não haver famílias/géneros bacterianos comuns entre o colostro e as fezes tratamento.

Apesar da reduzida similaridade na composição bacteriana entre amostras lácteas e fezes, alguns dos grupos bacterianos identificados nas amostras lácteas são normalmente encontrados no sistema digestivo das mães (*i.e.*, *Bifidobacteria*, *Bacteroidaceae* e *Ruminococcaceae*) (ADDIS et al., 2016; LIMA et al., 2017) sugerindo a existência potencial de uma via entero-mamária endógena. Esta hipótese pode explicar a presença de microrganismos intestinais das mães nas amostras lácteas e sugere que estes microrganismos possam colonizar o intestino dos recém nascidos através da amamentação, contribuindo para a maturação do sistema imunológico e da microbiota intestinal (ADDIS et al., 2016).

No presente estudo verificou-se que a diversidade bacteriana das amostras lácteas (colostro + leite) foi superior face às amostras das fezes (controlo + tratamento). Apesar de não ser comparável, estes resultados foram similares aos obtidos por MURPHY et al. (2017), onde detectaram uma maior diversidade bacteriana no leite materno quando comparado às amostras fecais dos bebés avaliados. Do mesmo modo, ELLINGER et al. (1980) observaram uma redução de bactérias coliformes em fezes de bezerros de bovinos da raça Holstein-Frísia alimentados com um suplemento de colostro fermentado (silagem de colostro) quando comparados com o grupo controlo. É reconhecido o papel que o colostro e o leite têm na eliminação de microrganismos patogénicos do intestino dos recém-nascidos, no fortalecimento do sistema imunitário, e ainda como uma fonte probiótica (LIMA et al., 2017). É provável que a administração de colostro de vaca e de leite possa ter o mesmo efeito nos borregos analisados, sendo necessário confirmar com estudos futuros.

7.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA BACTERIANA

Os isolados bacterianos obtidos das fezes dos cordeiros do controle e do tratamento foram testados quanto à sua capacidade em sintetizar enzimas líticas. No caso dos ruminantes, estas enzimas apresentam particular importância, não só por acelerarem as reações químicas, mas também por decomporem macromoléculas de açúcares, gorduras, celulose e proteínas, em moléculas mais simples. Devido à sua capacidade em melhorar a eficiência da conversão dos alimentos, estas enzimas são consideradas como um aditivo na alimentação de animais ruminantes (RANGEL et al., 2008).

De entre os isolados bacterianos testados, a espécie *Acinetobacter sp.* obtida das fezes dos cordeiros do tratamento, foi a que exibiu a maior atividade amilásica, celulásica e lipásica. Estas enzimas são responsáveis pela digestão do amido, da celulose e dos lípidos, respetivamente (GUPTA et al., 2003; HOLMES; VANDEBERG; COX, 2011; LOPES, 2013). Estudos anteriores, observaram igualmente a capacidade de várias estirpes de *Acinetobacter* de produzirem amilase (CUI et al., 2020), celulase (RAMIN; ALIMON; ABDULLAH, 2009) e lipase (JUNG; PARK, 2015). Estas estirpes foram encontradas em amostras do rúmen de bezerras, do intestino de cupins e no ambiente (*e.g.*, solo e água), respetivamente. Devido à sua capacidade em sintetizar enzimas líticas, algumas espécies do género *Acinetobacter* têm vindo a ser aplicadas em vários processos industriais (*e.g.*, degradação de petroquímicos, produção de biopolímeros e produção de adjuvantes imunológicos) (TEIXEIRA; MERQUIOR, 2014). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que esta espécie bacteriana poderá igualmente ser favoráveis na síntese de aditivos enzimáticos que possam ser incorporados na alimentação animal. A sua utilização, em particular em animais jovens que possuem um sistema enzimático imaturo, poderá otimizar a atividade enzimática endógena e melhorar a digestibilidade dos nutrientes presente na dieta do animal.

O isolado *Jeotgalicoccus sp.*, oriundo das fezes dos cordeiros do tratamento, foi o que mais produziu protease. Esta enzima pode degradar todas as proteínas do leite, à exceção da β -lactoglobulina (SILVA; DE CAMPOS, 1986). A ação desta enzima ocorre no abomaso de pré-ruminantes que, após a degradação das proteínas do leite, o produto formado é libertado para o duodeno e digerido rapidamente (LONGENBACH; HEINRICHS, 1998). Mesmo que o isolado *Jeotgalicoccus sp.* seja pouco conhecido, existem várias evidências da sua presença em diversos habitats (*e.g.*, solo salino e leite de cabra) (SCHWAIGER et al.,

2010). A grande atividade proteolítica exibida por vários membros deste gênero, tem incentivado a sua exploração e aplicação como agente bioativo na indústria de detergentes (MOKASHE et al., 2015).

Ao comparar a atividade enzimática de isolados da mesma espécie, mas com origens diferentes, verificou-se que os oriundos das fezes do tratamento apresentavam uma maior atividade enzimática face aos provenientes das fezes do controle. Esta situação foi observada em particular para as espécies *Enterobacteriaceae* 1 e 3, e para a atividade da amilase. Este resultado sugere que o tipo de dieta alimentar do cordeiro (*i.e.*, com ou sem suplemento de colostro bovino) poderá influenciar a fisiologia da microbiota presente nas suas fezes. O colostro parece induzir/estimular a produção de enzimas bacterianas. Esta hipótese, carece, no entanto, de confirmação. A família *Enterobacteriaceae* é conhecida por incluir diversas espécies com capacidade em produzir protéase (DAUTIN, 2010). Algumas estirpes bacterianas desta família, também demonstraram a capacidade em sintetizar celulase (RAMIN; ALIMON; ABDULLAH, 2009). Membros desta família surgem frequentemente na microbiota intestinal normal (*e.g.*, intestino delgado e fezes) de humanos e animais (tanto ruminantes como não- ruminantes), e em laticínios (KABLE et al., 2016; PATERSON, 2011; WANG et al., 2017).

Para além dos isolados mencionados, foram identificados nas fezes dos cordeiros outras espécies bacterianas que exibiam atividade enzimática considerável. De entre estas destaca-se a espécie *Bacillus sp.* 1, obtida das fezes dos cordeiros do controle como das fezes dos cordeiros do tratamento, por ter revelado a capacidade em produzir amilase, celulase, lípase e protéase. Estudos anteriores tinham já demonstrado a capacidade de membros deste gênero de sintetizarem uma diversidade de enzimas líticas, tais como α -amilase, β -amilase, celulase, galactase, protéase e lípase (JAEGER et al., 1994; PRIEST, 1977). Algumas espécies do gênero *Bacillus* têm sido utilizadas comercialmente na alimentação de animais de produção (*e.g.*, suínos e ruminantes), com o objetivo de melhorar a digestibilidade de nutrientes (FIREMAN; FIREMAN, 1998; MCALLISTER et al., 2001). As preparações enzimáticas para ruminantes são comercializadas principalmente com base na degradação das paredes celulares da planta, no entanto nenhum desses produtos comerciais são preparações de enzimas únicas, as atividades secundárias enzimáticas (*i.e.*, amilase, protéases ou pectinases) estão presentes devido à variação da atividade enzimática microbiana (*e.g.*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*), que mesmo dentro da mesma espécie a produção enzimática varia conforme a estirpe selecionada, o substrato de crescimento e as condições de crescimento (SUJANI; SERESINHE, 2015).

Capítulo 8: Conclusão

8.1 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em conclusão, o presente estudo mostrou pela primeira vez que a comunidade bacteriana nas fezes dos cordeiros da raça Churra Galega Bragançana, bem como no leite de ovelha e colostro de vaca é muito rica e diversa. Para a avaliação desta comunidade bacteriana, recorreu-se a métodos dependentes e não dependentes de cultivo (metagenómica) que mostraram ser complementares. No total, os dois métodos permitiram identificar 93 géneros nas fezes e de 231 géneros nas amostras lácteas, sendo *Bacteroides* e *Acinetobacter* os géneros mais abundantes na comunidade bacteriana, respetivamente.

Os resultados obtidos sugerem que a suplementação da dieta dos cordeiros com colostro de bovino em períodos além do pós-nascimento influencia a composição da comunidade bacteriana relativa das fezes. A administração do colostro mostrou diminuir a diversidade bacteriana das fezes, e alterar a composição da comunidade bacteriana através do aumento da abundância de bactérias do filo *Proteobacteria* e diminuição da abundância de bactérias do filo *Bacteroidetes*. Os resultados sugerem que o colostro atua sobretudo ao nível da alteração da abundância de determinados grupos de microrganismos e não tanto como fonte de origem microrganismos (*i.e.*, transmissão de microrganismos do colostro para as fezes).

O leite de ovelha e o colostro de vaca apresentaram uma diversidade e composição bacteriana muito similar, sendo dominada por membros pertencentes aos filios *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Alguns membros identificados em grande abundância nestas amostras encontram-se descritos como tendo um papel importante na colonização do sistema digestivo e no estabelecimento da microbiota ruminal de diversos animais. É expectável que a administração de colostro possa ter um efeito similar nos cordeiros estudados.

O colostro pode influenciar também o ganho de peso dos animais por possuir factores de crescimento, vitaminas, hormonas e outras substâncias benéficas. O que foi observado no nosso trabalho, relativamente ao GMD dos cordeiros do grupo tratamento nos 10 dias de idade, diferença significativa superior aos animais do grupo controlo.

Dos isolados bacterianos obtidos das fezes, foram identificados três OTUs (*Acinetobacter* sp., *Jeotgalicoccus* sp. e *Bacillus* sp.) que mostraram capacidade em produzir uma série de enzimas digestivas, tais como amílase, celulase, lípase e protéase. Desta forma, estes isolados apresentam um potencial enorme na nutrição animal e adicionalmente como adjuvantes imunológico e/ou probiótico.

Apesar dos resultados obtidos no presente estudo serem muito promissores o efeito da suplementação com o colostro além da ingestão do período natural deverá ser estudado em trabalhos futuros, mas com as seguintes sugestões:

1. Aumentar o volume de ingestão do colostro após o período natural gradualmente até o animal atingir a idade de desmame;
2. Aumentar a amostragem dos animais estudados;
3. Separar as mães dos cordeiros em determinadas alturas para que o animal consiga ingerir maiores quantidade de colostro do que de leite;
4. Avaliar a influência da suplementação com o colostro na qualidade da carcaça dos cordeiros e;
5. Avaliar o impacto bacteriano da suplementação do colostro na composição microbiana do rúmen dos cordeiros.

Capítulo 9: Referências

- ACOB. Associação nacional de criadores da raça churra galega Bragançana. Disponível em <<http://www.sprega.com.pt/conteudo.php?idesp=ovinos&idraca=Churra%20Galega%20Bragan%20E7ana%20Branc>>.
- ADDIS, M. F. et al. The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from -omics studies. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 8, p. 2359–2372, 2016.
- ALMEIDA, J. C. et al. Melhoria da eficiência reprodutiva nas raças autóctones. **I Jornadas Científicas do CECAV**, 2007.
- ALVES, A. C. et al. Colostrum composition of Santa Inês sheep and passive transfer of immunity to lambs. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3706–3716, 2015.
- ALVIMDUQUE, A. C. ; LANES, E. C. M. D.; LOPES, F. C. F. **Estudo dos principais microorganismos do rúmen** *Revista Cultivar*, 1991. Disponível em: <<https://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo-estudo-dos-principais-microorganismos-do-rumen%3E>>.
- BAGWE, S. et al. Bovine colostrum: An emerging nutraceutical. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 3, p. 175–185, 2015.
- BARBOSA, F. H. F. et al. Microbiota indígena do trato gastrintestinal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 1, p. 78–93, 2010.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n. 2–3, p. 95–102, 2001.
- BARRINGTON, G. M.; PARISH, S. M. Bovine neonatal immunology. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 17, n. 3, p. 463–476, 2001.
- BAUMRUCKER, C. R.; BRUCKMAIER, R. M. Colostrogenesis: IgG1 transcytosis mechanisms. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 19, n. 1, p. 103–117, 2014.
- BAYER, E. A. et al. Cellulosomes - Structure and ultrastructure. **Journal of Structural Biology**, v. 124, n. 2–3, p. 221–234, 1998.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G.; RIBEIRO, M. V. C. **Nutrição De Ruminantes** (FUNEP, Ed.) Jaboticabal, Brazil, 2006. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=RwL8GgAACAAJ>>.
- BERGMANN, H. et al. Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: A workshop report. **British Journal of Nutrition**, v. 112, n. 7, p. 1119–1128, 2014.
- BHORA, F. Y. et al. Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin. **Journal of Surgical Research**, 1995.
- BLUM, J. W. Nutritional physiology of neonatal calves. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 1–2, p. 1–11, 2006.
- BROWN, R. E. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 9, p. 1304, 1970.
- BRULC, J. M., et al. Emerging methods in rumen microbiology. In: Proc. 4th Grazing Livestock Nutrition Conference. HESS, B.W., DELCURTO, T., BOWMAN, J.G.P., e WATERMAN, R.C. ed. West. Sect. Am. Soc. Anim. Sci., Champaign, IL. 2010. p. 10-21.
- CORNICK, N. A. et al. *Lachnospira pectinoschiza* sp. nov., an anaerobic pectinophile from the pig intestine. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 1, p. 87–93, 1994.

CAETANO JÚNIOR, M. B.; CAETANO, G. A. DE O.; OLIVEIRA, M. D. DE. A INFLUÊNCIA DA DIETA NO DESENVOLVIMENTO RUMINAL DE BEZERROS Bezerros, dieta, desenvolvimento ruminal. **Nutri Time**, v. 13, n. 6, p. 4902–4918, 2016.

CAMPESTRINI, E.; DA SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259–272, 2005.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data J. **Nat Methods**, v. 7(5), p. 335–336, 2010.

CARVALHO, C. T. G. Perfil metabólico e desempenho produtivo de ovelhas santa inês suplementadas com ionóforo durante o período de transição. p. 62, 2013.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87–104, 2008.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 255–275, 2003.

CHENG, S. et al. Copper Changes Intestinal Microbiota of the Cecum and Rectum in Female Mice by 16S rRNA Gene Sequencing. **Biological Trace Element Research**, n. 1101, 2019.

COIMBRA FILHO, A. **Técnicas de criação de ovinos**. 2.ed. Guaíba: Agropecuária. 1992. 102p

CONTE, F.; SCARANTINO, S. A study on the quality of bovine colostrum: Physical, chemical and safety assessment. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 925–931, 2013.

CORNICK, N. A. et al. *Lachnospira pectinoschiza* sp. nov., an anaerobic pectinophile from the pig intestine. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 1, p. 87–93, 1994.

CORREIA, T. M.; VALENTIM, R. Contributo para a melhoria da eficácia reprodutiva de ovinos da raça Churra Galega. **Fórum CIMO - Ciência e Desenvolvimento**, 2012.

COSTA, J. DOS R. **Influência dos leucócitos do colostro no desenvolvimento da microbiota intestinal, resposta imune inata e incidência de diarreias em bezerras recém-nascidas**. São Paulo, 2016.

COSTA, R. G. et al. Características morfológicas e volumétricas do estômago de caprinos submetidos a diferentes períodos de aleitamento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 118–125, 2003.

COTTA, M. A. Amylolytic Activity of Selected Species of Ruminal Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 772–776, 1988.

COTTA, M.; FORSTER, R. The Family Lachnospiraceae, Including the Genera *Butyrivibrio*, *Lachnospira* and *Roseburia*. **The Prokaryotes**, p. 1002–1021, 2006.

CUI, Z. et al. From Maternal Grazing to Barn Feeding During Pre-weaning Period: Altered Gastrointestinal Microbiota Contributes to Change the Development and Function of the Rumen and Intestine of Yak Calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–14, 2020.

DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 213–217, 2002.

DAUTIN, N. Serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and function. **Toxins**, v. 2, n. 6, p. 1179–1206, 2010.

DE DEA LINDNER, J. et al. Recovery and identification of bovine colostrum microflora using traditional and molecular approaches. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 364–368, 2011.

-
- DEPETERS, E. J.; GEORGE, L. W. Rumens transfaunação. **Immunology Letters**, v. 162, n. 2, p. 69–76, 2014.
- DOWD, S. E. et al. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1–8, 2008.
- DURSO, L. M. et al. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4858–4862, 2010.
- DZIK, S. et al. Properties of bovine colostrum and the possibilities of use. **Polish Annals of Medicine**, v. 24, n. 2, p. 295–299, 2017.
- ELLINGER, D. K.; MULLER, L. D.; GLANTZ, P. J. Influence of Feeding Fermented Colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on Fecal Flora of Dairy Calves. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 3, p. 478–482, 1980.
- FIREMAN, F. A. T.; FIREMAN, A. K. B. A. T. **Enzimas na alimentação de suínos. Ciência Rural**, 1998.
- FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, Storage, Treatment, Composition, and Feeding Value of Surplus Colostrum: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 8, p. 1033–1060, 1978.
- FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis. Springer Science**. 1. ed. Londres: Springer Science & Business Media, 1992.
- FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 2013.
- GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. SUPPL., p. S15–S28, 2010.
- GAPPER, L. W. et al. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 93–109, 2007.
- GARCIA-GUTIERREZ, E. et al. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. **Gut Microbes**, v. 10, n. 1, p. 1–21, 2019.
- GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Commentary on key aspects of fecal microbiota transplantation in small animal practice. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, p. 71, 2016.
- GEORGIEV, I. P. Differences in Chemical Composition Between Cow Colostrum and Milk. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 11, n. 1, p. 3–12, 2008.
- GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259–275, 2004.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.
- GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; LOMBARDI, A. **Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. International Journal of Antimicrobial Agents**, 1999.
- GODDEN, S. Colostrum Management for Dairy Calves. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19–39, 2008.
- GOMES, V. et al. Colostrum bovino: muito além das imunoglobulinas. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, n. Suppl 2, p. 99, 2017.
- GONZALEZ, D. D.; DUS SANTOS, M. J. Bovine colostrum cells—the often forgotten component of colostrum. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 250, n. 9, p. 998–1005, 2017.
- GONZÁLEZ, J. et al. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Legionellales: Coxiellaceae) Infection among Wildlife Species and the Tick *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in
-

a Meso-Mediterranean Ecosystem. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 2, p. 551–556, 2020.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.-R. Gut flora in health and disease. **The lancet**, v. 360, p. 512–519, 2003.

GUERRA, G. A. et al. Neonatologia em bezerros: a importância do colostro. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 3, p. 32–41, 2017.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 30 jun. 2003.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.

HALL, T. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARGER, C. ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. p. 56, 1982.

HARMSSEN, H. J. M. et al. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2982–2990, 2002.

HERMANS, S. M. et al. crosssm Condition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 1–13, 2017.

HOLMES, R. S.; VANDEBERG, J. L.; COX, L. A. Comparative studies of vertebrate lipoprotein lipase: A key enzyme of very low density lipoprotein metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 6, n. 2, p. 224–234, 2011.

HOUSER, B. A. et al. of Salmonella in Raw Bovine Colostrum. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 5, n. 6, 2008.

HUANG, Q. et al. Fecal microbiota of lambs fed purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.) and alfalfa (*Medicago sativa*). **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 1, p. 137–145, 2018.

HYRSLOVA, I. et al. Goat and Bovine Colostrum as a Basis for New Probiotic Functional Foods and Dietary Supplements. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 08, n. 02, p. 56–59, 2016.

JAEGER, K. E. et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.

JENKINS, C. et al. Clinical Microbiology: Bacteria - Enterobacteriaceae. **Infectious Diseases**, p. 1565- 1578.e2, 2017.

JIMÉNEZ, L. M. **La Microbiota de la Glándula Mamaria Bovina** Producción Animal, 2018. Disponível em: <<https://www.produccionanimal.com/la-microbiota-de-la-glandula-mamaria-bovina/>>.

JOSLIN, R. S. et al. Lactoferrin supplementation to dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1237–1242, 2002.

JUNG, J.; PARK, W. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 6, p. 2533–2548, 2015.

KABLE, M. E. et al. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–13, 2016.

KAGEYAMA, A.; BENNO, Y. Coprobacillus a New Genus from Human cateniformis and Species Feces Gen . Isolated Nov ., v. 44, n. 1, p. 23–28, 2000.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido. p. 824, 2011.

-
- KORARSKI, S. F.; WANISKA, R. D.; KERRY, K. T. Starch Hydrolysis by Ruminant Microflora. **The Journal of nutrition**, v. 122, n. 1, p. 178–190, 1991.
- KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.
- LANE, D. J. et al. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. **John Wiley and Sons**, v. New York, p. 115–175, 1991.
- LANGER, P. Differences in the Composition of Colostrum and Milk in Eutherians Reflect Differences in Immunoglobulin Transfer. **Journal of Mammalogy**, v. 90, n. 2, p. 332–339, 2009.
- LEEK, B. F. Digestão no estômago dos ruminantes. In: IN: SWENSON, M. J.; REECE, W. (Ed.). **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. . Rio de Janeiro: Dukers, 1996. p. 353–379.
- LI, R. W. et al. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 129–139, 2012.
- LILLY, D. .; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747–748, 1965.
- LIMA, R. N. DE et al. Limitações da fisiologia dos animais em transição Renata. **PUBVET**, v. 7, 2013.
- LIMA, S. F. et al. The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 3031–3042, 2017.
- LIU, C. et al. Age-Related Response of Rumen Microbiota to Mineral Salt and Effects of Their Interactions on Enteric Methane Emissions in Cattle. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 3, p. 590–601, 2017.
- LIU, Z. Q. et al. Cloning, expression and characterization of a lipase gene from the *Candida antarctica* ZJB09193 and its application in biosynthesis of vitamin A esters. **Microbiological Research**, v. 167, n. 8, p. 452–460, 2012.
- LONGENBACH, J. I.; HEINRICHS, A. J. A review of the importance and physiological role of curd formation in the abomasum of young calves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 73, n. 1–2, p. 85–97, 1998.
- LOPES, L. D. Sequenciamento do microbioma do rúmen de ovinos utilizando a plataforma Ion Torrent (PGM). 2013.
- LORY, S. The Family Streptococcaceae. In: ROSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACKEBRANDT E., T. F. (Ed.). **The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014a. p. 367–370.
- LORY, S. The Family Coxiellaceae. In: ROSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACKEBRANDT E., T. F. (Ed.). **The Prokaryotes: Gammaproteobacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014b. p. 197–198.
- LU, H. F. et al. Fecal microbiome data distinguish liver recipients with normal and abnormal liver function from healthy controls. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, p. 1–13, 2019.
- LYFORD JR., S. J. Growth and development of the ruminant digestive system. In: CLIFFS, E. (Ed.). **The Ruminant Animal. Digestive Physiology**. 1. ed. New Jersey: Prentice Hall: Digestive Physiology and Nutrition, 1988. p. 44–63.
- MAGURRAN, A. . Measuring biological diversity. **Blackwell Publishing**, 2004.
- MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. Taxonomic identification of commensal bacteria associated with the mucosa and digesta throughout the gastrointestinal tracts of preweaned calves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 2021–2028, 2014.
- MALMUTHUGE, N.; GRIEBEL, P. J.; GUAN, L. L. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract.
-

Frontiers in Veterinary Science, v. 2, n. SEP, p. 1–10, 2015.

MAMUN, M. A. A. et al. The composition and stability of the faecal microbiota of Merino sheep. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 1, p. 280–291, 2020.

MARCHANDIN, H.; JUMAS-BILAK, E. The Family Veillonellaceae. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 433–453.

MARIA, G. L., SRIDHAR, K. R., AND RAVIRAJA, N. S. Antimicrobial and Enzyme Activity of Mangrove Endophytic Fungi of Southwest Coast of India. **Journal of Agricultural Technology**, v. 1, n. pH 7, p. 67–80, 2005.

MARNILA, P. et al. Prevention and suppression of *Helicobacter felis* infection in mice using colostrum preparation with specific antibodies. **Helicobacter**, v. 8, n. 3, p. 192–201, 2003.

MARX, V. The Genome Jigsaw. **Nature**, v. 501, p. 263–268, 2013.

MCALLISTER, T. A. et al. Enzymes in Ruminant Diets. **Enzymes in farm animal nutrition**, p. 273–298, 2001.

MCDONALD, D. et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 610–618, 2012.

MEALE, S. J. et al. Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 1–16, 2016.

MENCHETTI, L. et al. Potential benefits of colostrum in gastrointestinal diseases. **Frontiers in Bioscience - Scholar**, v. 8, n. 2, p. 331–351, 2016.

MERO, A. et al. IGF-I, IgA, and IgG responses to bovine colostrum supplementation during training. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 2, p. 732–739, 2002.

MESSIAS, B. A. et al. Fecal microbiota transplantation in the treatment of *Clostridium difficile* infection: State of the art and literature review. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 45, n. 2, p. 1–10, 2018.

MOKASHE, N.; CHAUDHARI, A.; PATIL, U. Optimal production and characterization of alkaline protease from newly isolated halotolerant *Jeotgalicoccus* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 235–243, 2015.

MONÇÃO, F. P. et al. Desenvolvimento Da Microbiota Ruminal De Bezerros: Revisão De Literatura. **Unimontes científica**, v. 15, n. 1, p. 76–89, 2013.

MOREIN, B.; ABUSUGRA, I.; BLOMQUIST, G. Immunity in neonates. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3–4, p. 207–213, 2002.

MORGAVI, D. P. et al. Rumen microbial communities influence metabolic phenotypes in lambs. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–13, 2015.

MOUGHAN, P. J. et al. The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. **World review of nutrition and dietetics**, v. 67, p. 40–113, 1992.

MULLEN, K. R. et al. Equine faecal microbiota transplant: Current knowledge, proposed guidelines and future directions. **Equine Veterinary Education**, v. 30, n. 3, p. 151–160, 2018.

MURPHY, K. et al. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. **Scientific Reports**, v. 7, n. July 2016, p. 1–10, 2017.

MYERS, L. L. et al. *Bacteroides fragilis*: A possible cause of acute diarrheal disease in newborn lambs. **Infection and Immunity**, v. 44, n. 2, p. 241–244, 1984.

NOSCHANG, J. P.; BRAUNER, C. C. *Saccharomyces cerevisiae* na nutrição de ruminantes: Revisão. **PUBVET**, v. 13, n. n.2, p. 1–8, 2019.

-
- OLIVEIRA, V. DA S.; PINHO, A. C.; VALENÇA, R. DE L. Desenvolvimento e fisiologia do trato digestivo de ruminantes. **Ciência Animal**, v. 29, n. 3, p. 114–132, 2019.
- OLSEN, I. The Family Fusobacteriaceae. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 109–132.
- OSORIO, L. M.; UMBARILA, A. S. Microbiota de la glándula mamaria. **Pediatría**, v. 48, n. 1, p. 1–8, 2015.
- OUWERKERK, D.; KLIEVE, A. V.; FORSTER, R. J. Enumeration of Megasphaera elsdenii in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 4, p. 753–758, 2002.
- PAGANI, J. A. B. Timpanismo Em Ruminantes. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v. 10, n. 6, p. 1–6, 2008.
- PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. DOS S. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, 2016.
- PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 285–297, 1997.
- PARKER, B. R. **Probiotics, the other half of the antibiotics story** *Animal Nutrition Health*, 1974.
- PATERSON, D. L. **Infections Due to Other Members of the Enterobacteriaceae, Including Management of Multidrug-Resistant Strains**, 2011.
- PATRICK, S. **Bacteroides**. Belfast, UK: Elsevier Ltd, 2014. v. 2–3.
- PEREZ, P. F. et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? **Pediatrics**, v. 119, n. 3, 2007.
- PINNAKA, A. K.; TANUKU, N. R. S. The Family Cyclobacteriaceae. In: ROSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACKEBRANDT E., T. F. (Ed.). **The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 551–575.
- PLAYFORD, R. J. Peptide therapy and the gastroenterologist: Colostrum and milk-derived growth factors. **Clinical Nutrition**, v. 20, n. SUPPL. 1, p. 101–106, 2001.
- PRIEST, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 3, p. 711–753, 1977.
- QUIGLEY, L. et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664–698, 2013.
- RAABIS, S.; LI, W.; CERSOSIMO, L. Effects and immune responses of probiotic treatment in ruminants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 208, n. December 2018, p. 58–66, 2019.
- RACHMAN, A. B.; MAHESWARI, R. R. A.; BACHROEM, M. S. Composition and Isolation of Lactoferrin from Colostrum and Milk of Various Goat Breeds. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 200–210, 2015.
- RAMIN, M.; ALIMON, A. R.; ABDULLAH, N. Identification of cellulolytic bacteria isolated from the termite *Coptotermes curvignathus* (Holmgren). **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 103–116, 2009.
- RANGEL, A. H. et al. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes Ionophores in ruminant production. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 173–182, 2008.
- RANSOM-JONES, E. et al. The Fibrobacteres: An Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 267–281, 2012.
- REDONDO, N. C. **Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416**. Araraquara, 2008.
-

REIS, T. L.; VIEITES, F. M. Antibiótico, prebiótico, probiótico e simbiótico em rações de frangos de corte e galinhas poedeiras. **Ciência Animal**, v. 29, n. 3, p. 133–147, 2019.

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

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, n. 10, p. 626–644, 1989.

ROCHA, E. D. O. et al. Influência da Idade de Desmama e de Início do Fornecimento do Volumoso a Bezerros sobre a Digestibilidade de Nutrientes e o Balanço de Nitrogênio, Pós-desmama. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 1, p. 143–147, 1999.

RODRÍGUEZ, J. M. et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. **Acta Pediátrica Espanola**, v. 66, n. 2, p. 77–82, 2008.

ROOSTITA, L. B.; KHOTIMAH, K.; SAFITRI, R. Characterization of Enterococcus bacteria isolated from bovine colostrum as probiotics. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 19, p. 202–205, 2015.

SAALFELD, M. H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1636–1641, 2013.

SALMINEN, S. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. S1, p. S147–S171, 1998.

SANGILD, P. T. Uptake of colostrum immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. **Acta Veterinaria Scandinavica, Supplement**, n. 98, p. 105–122, 2003.

SCHWAIGER, K. et al. Notes on the almost unknown genus Jeotgalicoccus. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 441–444, 2010.

SEABY, R.; HENDERSON, P. Community Analysis Package 5.0. **Searching for structure in community data.**, 2014.

SEABY, R. M. H.; HENDERSON, P. A. SDR-IV. Measuring and understanding biodiversity. **Pisces Conservation**, p. 42, 2007.

SILVA, A.; DE CAMPOS, O. Fisiologia da digestão da proteína em bezerros durante o período pré-ruminante: Revisão da literatura. **Pesq. agropec. bras.**, v. 21, n. 7, p. 777–784, 1986.

SILVA, E. G. D. S. O. et al. Bovine colostrum: Benefits of its use in human food. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 355–362, 2019.

SILVA JÚNIOR, M. Recentes mudanças da infecção por Clostridium difficile Recent changes in Clostridium difficile infection. **Einstein**, v. 10701, n. 10811, p. 105–9, 2012.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial Cellulases: Protein Architecture, Molecular Properties, and Biosynthesis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 40, n. C, p. 1–44, 1995.

SOCCOL, C. R. et al. The potential of probiotics: A review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413–434, 2010.

SOEORG, H. et al. The role of breast milk in the colonization of neonatal gut and skin with coagulase-negative staphylococci. **Pediatric Research**, v. 82, n. 5, p. 759–767, 2017.

SPOC. **Sociedade Portuguesa De Ovinotecnia E Caprinotecnia**. Disponível em: <<http://www.ovinosecaprinos.com/algarvia.html>>.

SPONSELLER, J. K. et al. Hyperimmune bovine colostrum as a novel therapy to combat clostridium difficile infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 8, p. 1334–1341, 2015.

STACKEBRANDT, E. Dermacoccus. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–6, 2015.

STEELE, J. et al. Hyperimmune bovine colostrum for treatment of GI infections: A

review and update on clostridium difficile. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 9, n. 7, p. 1565–1568, 2013.

STEELMAN, S. M. et al. Pyrosequencing of 16S rRNA genes in fecal samples reveals high diversity of hindgut microflora in horses and potential links to chronic laminitis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 1–11, 2012.

STEWART, C. S.; FONTY, G.; GOUET, P. The establishment of rumen microbial communities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 21, n. 2–4, p. 69–97, 1988.

STIVARI, T. S. S. S. et al. Aditivos enzimáticos na alimentação de ruminantes: estratégia para a produção animal. **PUBVET**, v. 8, n. 11, p. Art. 1728, jun. 2014.

STURME, M. H. J. et al. Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 81.1, n. 4, p. 233–243, 2002.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 3, p. 85–99, 2015.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. D. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

TASCHUK, R.; GRIEBEL, P. J. Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. **Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases**, v. 13, n. 1, p. 129–141, 2012.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C. M. The Family Moraxellaceae. In: OSENBERG E., DELONG E.F., LORY S., STACKEBRANDT E., T. F. (Ed.). **The Prokaryotes: Gammaproteobacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. p. 443–476.

THAISS, C. A. et al. The microbiome and innate immunity. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 65–74, 2016.

TOSCANO, M. et al. Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.

TRAN, C. D. et al. Novel combination therapy for the eradication of *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 45, n. 12, p. 1424–1430, 2010.

URUAKPA, F. O.; ISMOND, M. A. H.; AKOBUNDU, E. N. T. Colostrum and its benefits: A review. **Nutrition Research**, v. 22, n. 6, p. 755–767, 2002.

UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 2, p. 126–132, 2015.

VALADARES FILHO, S. C. .; PINA, D. S. Fermentação ruminal. **Nutrição de ruminantes**, v. 2, p. 161–189, 2006.

VAN GYLSWYK, N. O. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 2, p. 297–300, 1995.

VETTER, A. et al. Short communication: Fractional milking distribution of immunoglobulin G and other constituents in colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 9, p. 5919–5922, 2013.

VYAS, D.; AEKKA, A.; VYAS, A. Fecal transplant policy and legislation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 6–11, 2015.

WALLACE, R. et al. The proteolytic systems of ruminal microorganisms To cite this version : HAL Id : hal-00889635. **Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences**, v. 45, p. 301–308, 1996.

WALTERS, W. et al. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. **mSystems**, v. 1, n. 1, p. e0009-15, 2015.

WANG, J. et al. Characterization of the microbial communities along the gastrointestinal tract of sheep by 454 pyrosequencing analysis. **Asian-Australasian Journal**

of Animal Sciences, v. 30, n. 1, p. 100–110, 2017.

WANG, Y.; MCALLISTER, T. A. Rumen microbes, enzymes and feed digestion-A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 11, p. 1659–1676, 2002.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. v. 44, p. 253–262, 2001.

WATTIAUX, M. A. **Elevage des génisses laitières**Madson, USA., 1997.

WILLIAMS, A. G.; WITHERS, S. E. Changes in the rumen microbial population and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 61–69, 1993.

YAMAGUISHI, C. T. Valorização biotecnológica de compostos bioativos e prospecção de bactérias lácticas presentes no colostro bovino para aplicações em produtos funcionais e nutracêuticos. 2013.

YANG, M. et al. Colostrum quality affects immune system establishment and intestinal development of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 7153–7163, 2015.

YU, J. C. et al. Innate Immunity of Neonates and Infants. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. July, p. 1759, 2018.

YU, S. et al. Repeated inoculation with fresh rumen fluid before or during weaning modulates the microbiota composition and co-occurrence of the rumen and colon of lambs. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2020.

ZHANG, H. et al. The dynamic distribution of small-tail Han sheep microbiota across different intestinal segments. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JAN, p. 1–10, 2018.