



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JOSÉ ANTONIO BESSEGATTO

**MUDANÇAS NA MICROBIOTA FECAL DE BOVINOS DE  
CORTE CAUSADAS PELO CONFINAMENTO E PELA  
INGESTÃO DE VIRGINIAMICINA**

---

Londrina  
2016

JOSÉ ANTONIO BESSEGATTO

**MUDANÇAS NA MICROBIOTA FECAL DE BOVINOS DE  
CORTE CAUSADAS PELO CONFINAMENTO E PELA  
INGESTÃO DE VIRGINIAMICINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina – UEL para obtenção ao título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor  
Lisbôa

Londrina  
2016

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B557m Bessegatto, José Antonio.

Mudanças na microbiota fecal de bovinos de corte causadas pelo confinamento e pela ingestão de virginamicina / José Antonio Bessegatto - Londrina, 2016.

73 f.: il.

Orientador: Júlio Augusto Naylor Lisboa.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016. Inclui bibliografia.

1. Bovino de corte – Teses. 2. Bovino x Alimentação e rações - Teses. 3. Antibióticos na nutrição animal – Teses. I. Lisboa, Júlio Augusto Naylor. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.085

JOSÉ ANTONIO BESSEGATTO

**MUDANÇAS NA MICROBIOTA FECAL DE BOVINOS DE CORTE  
CAUSADAS PELO CONFINAMENTO E PELA INGESTÃO DE  
VIRGINIAMICINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina – UEL para obtenção ao título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Júlio Augusto Naylor  
Lisbôa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Amauri Alcindo Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Marcio Carvalho da Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a minha irmã  
Emanuela Zanette Bessegatto  
(*in memoriam*)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por tudo.

Aos meus pais Irdes e Adelmo, por todo o incentivo, paciência e amor que sempre dispuseram a mim. Muito obrigado, amo muito vocês.

Agradeço ao professor Júlio Lisbôa, por ter aceitado me orientar, aos conselhos, ao exemplo de bom profissional, bom professor, por todo o conhecimento repassado e principalmente pela amizade.

Agradeço aos meus familiares que sempre me apoiaram e me encorajaram, vó Lourdes, minhas tias, tios e primos.

À minha namorada, Fernanda, muito obrigado pelo companheirismo, a amizade e a paciência.

Ao Marcio por todo o conhecimento compartilhado e principalmente pela amizade, muito obrigado.

Obrigado às minhas amigas Laís e Bruna, pela amizade e auxílio durante o trabalho.

Gostaria de agradecer ao Carlos Montemor, proprietário dos animais, pelo auxílio na execução deste projeto.

À Universidade Estadual de Londrina - UEL e as pessoas envolvidas com o programa de pós-graduação em Ciência Animal, pela dedicação ao programa e a ciência.

Agradeço o apoio financeiro ao projeto através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

À bolsa concedida pela Capes e Araucária, muito obrigado.

BESSEGATTO, J. A. **Mudanças na microbiota fecal de bovinos de corte causadas pelo confinamento e pela ingestão de virginiamicina.** 2016. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina.

## RESUMO

Antibióticos são frequentemente fornecidos como promotores de crescimento para animais de produção. Entretanto, as consequências desta prática sobre a microbiota intestinal e as mudanças ao longo do tempo são pouco entendidas. O objetivo deste estudo foi caracterizar as mudanças na microbiota intestinal de bovinos de corte induzidas pelo confinamento e pelo uso da virginiamicina como antibiótico promotor de crescimento (APC). Dois grupos de bovinos em início de confinamento (G1 e G2) foram divididos em dois lotes de tratamento: um deles com virginiamicina (ATB) e outro como controle (CON) recebendo a mesma alimentação, sem o antibiótico. O G1 era composto por 50 animais (machos e fêmeas) e o G2 por 36 animais, todos machos. Amostras fecais foram coletadas na chegada, no meio (após período de adaptação de 25 dias) e na saída para o abate. Cento e quarenta e quatro amostras foram utilizadas para a extração de DNA e sequenciamento da região V4 do gene 16S bacteriano utilizando a plataforma Illumina MiSeq. Os animais foram pesados na entrada e na saída do confinamento para o cálculo de ganho médio diário (GMD), usado para comparação entre os animais CON e ATB de cada grupo. Uma alíquota de cada amostra da chegada (36) e da saída (36) dos animais do G2 foi utilizada para determinar a susceptibilidade da bactéria *Escherichia coli* a diferentes antibióticos. As bactérias do filo Firmicutes foram as mais abundantes durante todo o período experimental. O filo Verrucomicrobia apresentou alta abundância relativa na chegada ao confinamento, mas foi suprimido pelas mudanças da dieta. Proteobactérias aumentaram estatisticamente até o momento da saída. Houve maior abundância relativa de Spirochaetes no meio do confinamento nos animais que recebiam virginiamicina no G1, enquanto no G2 Actinobacteria teve maior abundância relativa no meio e na saída nos animais do CON. No G1, maior abundância relativa no meio do confinamento dos generos *Treponema* spp., *Clostridium sensu stricto* spp. e *Clostridium XI* spp. foi presente nos animais do ATB. Enquanto no G2, maior abundância relativa de *Bifidobacterium* spp. e menor de *Clostridium XIVA* spp. foi observada no meio do confinamento nos animais que recebiam a dieta sem virginiamicina. Na saída, houve maior abundância relativa das bactérias Clostridiales, Ruminococcaceae e *Clostridium XIVA* spp. e menor abundância de *Bifidobacterium* spp. nos animais que recebiam virginiamicina. O confinamento causou mudanças importantes na composição e na estrutura da microbiota fecal, porém, a virginiamicina teve efeito mais evidente na composição, sugerindo que o antibiótico afetou as espécies raras presentes no intestino dos bovinos, mas não as espécies mais abundantes. O GMD e o peso final não diferiram entre os animais suplementados com virginiamicina e os animais que não recebiam antibiótico. Apenas 2% das *E. coli* isoladas da chegada e 0,2% da saída apresentaram resistência a algum antibiótico, sendo que o uso de virginiamicina não influenciou a taxa de resistência. As diferenças encontradas entre os grupos G1 e G2 sugerem que as variações nas condições do estudo são importantes e podem afetar a microbiota intestinal. Portanto, deve-se ter cautela quando da interpretação e da extrapolação dos resultados de diferentes estudos.

**Palavras-chave:** antibiótico, gene 16S rRNA, confinamento, microbiota, resistência.

BESSEGATTO, J. A. **Changes in the Fecal Microbiota of Beef Cattle caused by Confinement and the Use of Virginiamycin as Growth Promoter**. 2016. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina.

### ABSTRACT

Low doses of antibiotics are commonly given to food animals in some regions for growth promotion. However, the consequences of this practice on the intestinal microbiota and how these changes occur overtime are poorly understood. This study aimed to investigate the effects of virginiamycin used as antibiotic growth promoter (AGP) and the consequences of confinement on the fecal microbiota of feedlot cattle. Two batches of beef cattle entering a feedlot operation (G1 and G2) were divided into two pens: one receiving virginiamycin (ATB) and one control (CON) receiving the same feeding without the antibiotic. Group 1 was composed by 50 animals (steers and heifers) and G2 by 36 animals (only steers). Fecal samples were collected at arrival, mid feedlot (25 days after arrival) and at exit to slaughter. One hundred forty-four samples had DNA extracted and the V4 region of 16S rRNA gene was amplified and sequenced with an Illumina MiSeq platform. Body weight at arrival and exit was measured and used to calculate average daily gain (ADG). Final body weight and ADG were used to compare CON with ATB within each group. Samples from arrival (36) and exit (36) of G2 were used to address antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains. The phylum Firmicutes was the most abundant at all moments. Verrucomicrobia has higher relative abundance at the beginning of feedlot, but decreased drastically with feedlot diet. Proteobacteria significantly increased until the exit. Spirochaetes has higher relative abundance in ATB than CON at mid of G1, while in G2 Actinobacteria has higher relative abundance at mid and exit feedlot in animals receiving control diet. In G1, higher abundance relative at mid of genera *Treponema* spp., *Clostridium sensu stricto* spp. and *Clostridium XI* spp. in animals receiving virginiamycin than CON. While in G2, higher relative abundance of *Bifidobacterium* spp. and smaller of *Clostridium XIVa* spp. at mid was observed in animals fed control diet, at exit higher relative abundance of Clostridiales, Ruminococcaceae and *Clostridium XIVa* spp. and smaller of *Bifidobacterium* spp. in animals receiving virginiamycin was observed. Marked changes in composition and structure of fecal microbiota occurred following entrance into the feedlot, but virginiamycin significantly affected only membership, suggesting that the antibiotic has a stronger effect on the rare species present in the distal gut of feedlot cattle, but not on the most abundant species. ADG and final body weight did not differ between ATB and CON animals. Only 2% of *E. coli* strains at arrival and 0,2% at exit were resistant to at least one antibiotic. The use of virginiamycin as AGP had no effect on antibiotic resistance. The differences found between batches are suggestive that variations in study conditions are important and can strongly affect the intestinal microbiota. Therefore, caution should be taken when interpreting and extrapolating results from different studies.

**Key words:** antibiotic, 16S rRNA, feedlot, microbiota, resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Rarefaction curves representing the mean number of genera per number of reads found in feces of cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid period and exit from a feedlot operation at two different groups (G1 and G2) .....50
- Figura 2** – Relative abundances of bacterial communities found in feces of two groups of cattle (G1 and G2) receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit. A and B: G1 and G2 at the phylum level, respectively; C and D: G1 and G2 at the genus level, respectively .....51
- Figura 3** – Dendrograms representing the similarity between membership (Jaccard) and structure (Yue & Clayton) of bacterial communities found in feces of cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit in two groups (G1 and G2). A and B: membership in samples from G1 and G2, respectively; C and D: structure in samples from G1 and G2, respectively. Colors identify the moment of sampling and treatment, CON Arrival: light green; ATB Arrival: green; CON Mid: light blue; ATB Mid: blue; CON Exit: red and ATB Exit: purple .....52
- Figura 4** – Principal coordinate analysis (PCoA) representing the dissimilarity between membership (Jaccard) and structure (Yue & Clayton) of microbial communities in feces of feedlot cattle fed with ratio containing virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit in two groups (G1 and G2). A and B: bacterial membership in samples from G1 and G2, respectively; C and D: community structure in samples from G1 and G2, respectively .....53

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Mean number of different genera, richness (Chao) and diversity (Simpson) indexes and average body weight (kg) with standard deviations (SD) found in beef cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit.....54
- Tabela 2** – Results of P values obtained from statistical comparison of bacterial membership (Jaccard) and structure (Yue & Clayton) present in feces of beef cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit .....55
- Tabela 3** – Main genera constituting each enterotype found in feedlot cattle.....56
- Tabela 4** – Mean decrease accuracy (MDA) of the main genera responsible for differences in fecal samples from feedlot cattle .....57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Antibióticos promotores de crescimento
SNG	Sequenciamento de nova geração
OTU	Unidade taxonômica operacional
PCR	Reação em cadeia da polimerase
GMD	Ganho médio de peso diário
G:F	Conversão alimentar
IMS	Ingestão de matéria seca
MS	Matéria seca
AGP	Antibiotic growth promoter
G1	Group 1
G2	Group 2
ATB	Antibiotic
CON	Control
BCS	Body condition score
ADG	Average daily gain
DMI	Dry matter intake
G:F	Gain-to-feed ratio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1	CONCEITOS E TERMINOLOGIA APLICADOS AO ESTUDO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS .....	13
2.2	MÉTODOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS .....	14
2.3	IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL .....	16
2.4	MICROBIOTA DO SISTEMA DIGESTÓRIO DOS BOVINOS .....	20
2.4.1	Microbiota Ruminal.....	21
2.4.2	Microbiota Intestinal.....	22
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4</b>	<b>ARTIGO – CHANGES IN THE FECAL MICROBIOTA OF BEEF CATTLE CAUSED BY CONFINEMENT AND THE USE OF VIRGINIAMYCIN AS GROWTH PROMOTER .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O corpo humano alberga cerca de 10 vezes mais bactérias do que células somáticas e germinativas (SAVAGE, 1977), possuindo capacidade genética 100 vezes maior que o genoma humano. Ao longo dos anos, a espécie humana tem evoluído com a presença das bactérias (HOOPER; GORDON, 2001). Existem mais de 1000 espécies de bactérias presentes no intestino humano e mais de 150 destas espécies podem ser compartilhadas entre os indivíduos (QIN et al., 2010). Dentre estas, apenas 20% são conhecidamente cultiváveis em meios de cultura tradicionais (ECKBURG et al., 2005).

Há evidências de que as bactérias estejam relacionadas com o desenvolvimento do sistema imune (HOOPER et al., 2001), com o processamento de componentes indigeríveis da dieta (BÄCKHED et al., 2004), associadas ao desenvolvimento de doenças entéricas (MORGAN et al., 2012; ROUSSEAU et al., 2011), asma e alergias (KÄÄRIÖ et al., 2016), além de estarem envolvidas com o aumento de peso e aparecimento de obesidade em humanos (TURNBAUGH et al., 2009a), evidenciando sua importância na homeostase do hospedeiro.

O desenvolvimento e aprimoramento das tecnologias de sequenciamento genético e da bioinformática permitiram a descoberta e o catálogo de muitos micro-organismos ainda não conhecidos (CONSORTIUM, 2012). Essas técnicas permitem o estudo de comunidades microbianas complexas (EDWARDS et al., 2006) e a investigação de várias amostras de grande número de indivíduos sem a necessidade de meios de cultivo (QIN et al., 2010).

Os estudos com emprego dessas técnicas buscam identificar a composição da microbiota e entender quais são as suas funções; como as bactérias se organizam e se interrelacionam, vivendo em mutualismo com o hospedeiro; quais são as bases que sustentam a simbiose e a competição entre os micro-organismos; quais são as características em cada nicho específico; e quais são os impactos da microbiota sobre a manutenção da saúde e sobre o desenvolvimento de doenças no hospedeiro (WEINSTOCK, 2012).

Os bovinos, como as outras espécies ruminantes, mantem interação complexa com os micro-organismos, particularmente os que habitam os pré-estômagos, dependendo da degradação de polímeros complexos, realizada por

bactérias, para a obtenção de energia (MACKIE, 2002). Estudos usando tecnologias de sequenciamento de nova geração vem sendo, nos últimos anos, realizados em bovinos para aumentar o conhecimento sobre essa interação entre a microbiota e o hospedeiro. Algumas investigações demonstram que as bactérias estão envolvidas com o ganho de peso, a incidência de doenças (OIKONOMOU et al., 2013), a composição do leite (JAMI et al., 2014) e a eficiência alimentar (MYER et al., 2015a; MYER et al., 2015b). Entretanto, as bactérias podem estar sujeitas a fatores externos que alterem as comunidades microbianas, como o efeito de antibióticos (OIKONOMOU et al., 2013) e, principalmente, de diferentes substratos e nutrientes que são fornecidos por meio de composições diferentes da dieta (SHANKS et al., 2011).

Antibióticos promotores de crescimento (APCs) são utilizados para melhorar os índices de desempenho em animais de produção (BROWN et al., 1975; FEIGHNER; DASHKEVICZ, 1987; ROGERS et al., 1995). Há evidências de que os antibióticos podem interferir com as populações bacterianas e acredita-se que a seleção de algumas bactérias auxiliem no ganho de peso e acúmulo de gordura em animais de laboratório (CHO et al., 2012). Bactérias mais eficientes na extração de nutrientes já foram descritas e acredita-se que o uso de antibióticos nos animais de produção possa estar associado a maiores índices de obesidade em humanos (MILLION et al., 2013). A descoberta de bactérias mais eficientes na extração de energia dos alimentos e que contribuem para o ganho de peso em animais, pode substituir os antibióticos na alimentação, como melhoradores de desempenho.

O aumento de bactérias resistentes a diversas classes de antibióticos e causadoras de infecções hospitalares em humanos, tem sido associado ao uso de APCs em animais de produção (CHANG et al., 2015). Desta forma, métodos alternativos visando diminuir o uso de antibióticos na alimentação animal são necessários para reduzir o desenvolvimento de resistência bacteriana a antimicrobianos. Portanto, as pesquisas que gerem novos meios de incrementar o ganho de peso dos animais são fundamentais.

Esse estudo teve como objetivos caracterizar as mudanças na microbiota intestinal de bovinos de corte induzidas pelo confinamento e pelo uso da virginiamicina como promotor de crescimento, utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CONCEITOS E TERMINOLOGIA APLICADOS AO ESTUDO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS

Para o entendimento adequado e a interpretação de resultados obtidos pelas análises que avaliam as comunidades bacterianas, é necessário que se defina alguns conceitos básicos utilizados neste campo.

O termo “microbiota” refere-se aos micro-organismos que se encontram em um ambiente. Enquanto, “microbioma” refere-se aos micro-organismos e o seu conjunto de genes (MARCHESI; RAVEL, 2015).

Com a enorme quantidade de dados gerados através do sequenciamento de nova geração (SNG), métodos e conceitos empregados em ecologia foram agregados a esta tecnologia para descrever as comunidades microbianas, com maior fidelidade. Dentre eles, os conceitos de riqueza e de diversidade que, respectivamente, determinam qual é o número de espécies e qual a distribuição de frequência (igualdade) de cada espécie presente em um ambiente. Outro conceito utilizado é a *operational taxonomic unit* (OTU), que se trata da unidade básica de classificação das bactérias e é adotada nas análises populacionais podendo ser utilizada nos diferentes níveis taxonômicos. Por exemplo, considerando a similaridade de 97% da sequência genética analisada com o genoma de referência, tem-se uma unidade taxonômica classificada no nível de espécie (WEINSTOCK, 2012).

A riqueza de um ambiente trata-se de uma contagem direta ou estimativa da quantidade de espécies diferentes de bactérias presentes naquele ambiente, ou em uma amostra. A maneira como estas espécies estão distribuídas no ambiente determina a sua igualdade. Por exemplo, duas comunidades bacterianas podem ser compostas pelas mesmas 100 espécies (riqueza), mas em uma delas, uma única espécie representa 90% das bactérias (igualdade). Para que esta diferença fosse levada em conta, foram criados vários índices matemáticos, chamados de diversidade. Um exemplo de estimador de riqueza seria o índice de Chao (CHAO et al., 2005). Vários índices podem ser empregados para a análise de  $\alpha$ -diversidade, a qual refere-se as características individuais presentes em um ambiente (riqueza e diversidade de cada amostra). Ao contrário, a  $\beta$ -diversidade é

utilizada para comparar as características das populações microbianas entre as amostras. Dentre os índices de diversidade mais utilizados estão os de Shannon e de Simpson, que levam em conta a riqueza e a igualdade das espécies presentes em uma amostra (LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

Além da interpretação por meio dos índices de riqueza e de diversidade que permitem a aplicação de métodos estatísticos para comparar uma população com outra, estes parâmetros podem ser representados graficamente por meio das curvas de rarefação. Essas demonstram o número de OTUs das amostras (riqueza) em função do número de sequências genéticas (esforço de amostragem) e determinam se a quantidade de leituras extraídas de determinada amostra foi suficiente para caracterizar a população adequadamente.

Alguns coeficientes podem ser utilizados para gerar matrizes matemáticas que estimam a distância da similaridade da riqueza ou diversidade entre as comunidades das amostras, podendo ser representados graficamente por meio de dendrogramas. Os índices de Jaccard e Yue & Clayton, são frequentemente adotados para descrever respectivamente a composição e a estrutura de cada amostra, já que levam em conta a riqueza e a diversidade encontrada nas mesmas (LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

O termo abundância relativa é o mais apropriado para se expressar a proporção em que os tipos bacterianos estão distribuídas em uma comunidade, pois não se trata de uma abundância absoluta, já que a contagem real das bactérias se perde durante o processo de amplificação na PCR convencional (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2011). Por esse motivo, o termo abundância relativa é comumente empregado para expressar as porcentagens de cada nível taxonômico que se quer detalhar, incluindo filo, classe, ordem, família, gênero e espécie.

## 2.2 MÉTODOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Tradicionalmente o método mais utilizado para o estudo das bactérias é o cultivo em meios de crescimento enriquecidos com nutrientes. No entanto, este método permite o crescimento de apenas uma porcentagem pequena das bactérias presentes em uma amostra. Estima-se que apenas 20% das bactérias cresçam em meios de cultura tradicionais (ECKBURG et al., 2005), o que torna

impossível estimar a riqueza e a diversidade real das espécies bacterianas. A principal vantagem do método, está no uso de meios seletivos para o isolamento de determinados organismos, que são favorecidas pelos nutrientes e antibióticos disponíveis no meio de cultura (LAGIER et al., 2015).

A culturas de bactérias fecais de bovinos tem recebido menos importância em comparação ao rúmen. No entanto, ainda hoje, grande quantidade de bactérias providas de amostras de fezes isoladas em meios de cultura enriquecidos, não possuem o mapeamento genético nos bancos de dados (ZIEMER, 2014), demonstrando que os meios de cultura podem auxiliar na catalogação de bactérias desconhecidas ou raras, difíceis de serem detectadas com métodos moleculares.

A revolução do sequenciamento genético teve sua expansão com o método de dideoxynucleotídeo, no qual nucleotídeos modificados adicionados à reação em cadeia da polimerase (PCR) interrompem o alongamento quando são inseridos na sequência de nucleotídeos. Assim, sequências de mesmo tamanho formam bandas em gel, que indicam a base na qual a reação foi interrompida conforme o tamanho do fragmento. Desta maneira, pode-se fazer a leitura das bases e identificar a sequência do DNA (SANGER et al., 1977).

Métodos moleculares para caracterizar comunidades bacterianas, como eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e eletroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE) podem ser empregados para estudar a dinâmica populacional das bactérias. Utilizando-se gel de poliacrilamida para separar as sequências de acordo com o gradiente ou com a temperatura, as fitas de DNA desnaturam parcialmente e param de acordo com as características físico químicas, permitindo a visualização das bandas (MUYZER, 1999). Estas técnicas são conhecidas como *fingerprinting*, que auxiliam no acompanhamento da dinâmica populacional e na estimativa da diversidade (MUYZER, 1999). No entanto, a sobreposição de bandas ou a baixa abundância de algumas espécies podem mascarar a diversidade real das amostras analisadas. Além disso, não possuem especificidade para determinar quais espécies estão presentes e sendo avaliadas (VALLAEYS et al., 1997).

O advento do sequenciamento de nova geração, diminuiu o tempo de sequenciamento e o custo tornou-se reduzido em comparação aos métodos que utilizam a tecnologia da incorporação dos dideoxynucleotídeos (EDWARDS et al., 2006). A tecnologia utilizada na plataforma 454 da Roche, também conhecida como pirosequenciamento, faz a leitura do sinal luminoso no momento da incorporação do nucleotídeo quando este é inserido na reação (MARGULIES et al., 2005).

A plataforma Illumina, utiliza o sequenciamento que consiste no alongamento da sequência por síntese, na qual um sinal luminoso com coloração diferente é emitido no momento da incorporação de cada base (ILLUMINA, 2014).

Com o lançamento da plataforma Illumina, o custo em relação ao número de bases utilizadas e a quantidade de sequências produzidas tornou-se mais baixo em relação as outras plataformas (BENTLEY et al., 2008). No entanto, cada tecnologia possui suas vantagens e desvantagens, sendo mais ou menos apropriadas para delineamentos diferentes de estudos. Assim, deve-se considerar o tamanho do fragmento a ser sequenciado, a complexidade da comunidade, bem como o tipo de estudo (sequenciamento de fragmentos ou total).

O gene 16S rRNA tem sido o mais utilizado para a caracterização de bactérias. O número de bases e a conservação de regiões do gene, o tornam preferível em relação a outras subunidades, como a 5S ou 23S. A presença das regiões conservadas permite a confecção de primers comuns a todas as bactérias e as regiões hipervariáveis permitem a diferenciação entre as espécies (LANE et al., 1985; OLSEN; WOESE, 1993). São nove regiões variáveis (V1-V9) do gene, com diferentes números de bases entre elas. O fragmento da região V4 possui aproximadamente 250 pares de base, e o sequenciamento desta região comparado a outras, demonstra melhor relação custo benefício com boa especificidade na classificação dos organismos e estimativas satisfatórias de riqueza e diversidade (MIZRAHI-MAN et al., 2013; YOUSSEF et al., 2009).

### 2.3 IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL

A colonização do intestino ocorre a partir do primeiro contato com o ambiente externo ao útero e sofre interferência desde os primeiros momentos de vida. Por exemplo, crianças que nascem de parto normal são colonizadas com

bactérias diferentes daquelas que nascem por cesariana (AZAD et al., 2013a). As primeiras são colonizadas por bactérias presentes na vagina da mãe, adquiridas durante o parto, enquanto as que nascem por cesariana são colonizadas com bactérias comumente presentes na pele (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010).

A microbiota passa por um processo de modificação constante durante o primeiro ano de vida. Embora algumas bactérias estejam sempre presentes durante a fase de desenvolvimento, outras habitam o intestino somente por determinados períodos (PALMER et al., 2007). A diversidade da microbiota intestinal aumenta com a idade (MONIRA et al., 2011; YATSUNENKO et al., 2012). Esses índices podem sofrer influência de fatores externos, como a presença de irmãos mais velhos ou animais de estimação no convívio diário (AZAD et al., 2013b).

A alimentação é o principal fator que influencia a composição e a estrutura da microbiota intestinal. Crianças que recebem leite materno tem índices menores de riqueza e de diversidade do que aquelas que recebem leite em pó reconstituído (AZAD et al., 2013a). Entretanto, a colonização por bactérias patogênicas é menor (AZAD et al., 2013a) e a alimentação exclusiva com leite materno está associada a menores índices de obesidade na adolescência (AZAD et al., 2014). Na infância, a ingestão de dieta variada, com diferentes fontes de nutrientes, cria condições para que a diversidade seja maior, o que reduz a chance de colonização por bactérias que podem causar doenças entéricas. Em comparação, aquelas que não tem acesso a dietas variadas e saudável possuem chance maior de ser colonizadas por bactérias da família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella* spp. e *Escherichia* spp. (MONIRA et al., 2011).

Estudos demonstram, ainda, que a colonização bacteriana está envolvida em expressões comportamentais, como ansiedade (DIAZ HEIJTZ et al., 2011) e autismo. Crianças autistas possuem alta riqueza e diversidade da microbiota intestinal em comparação aos controles e irmãos (FINEGOLD et al., 2010). Um fator que está envolvido na expressão comportamental é a existência do eixo intestino-cerebral, que conduz impulsos originários do intestino até o encéfalo através no nervo vago. O grupo de camundongos submetidos a vagotomia e que tinham o intestino colonizado por bactérias demonstraram, menor ansiedade do que aqueles animais que tinham o nervo vago intacto. Esse comportamento era semelhante ao do grupo de camundongos não vagotomizados e sem microbiota intestinal (*germ*

*free*) (BERCIK et al., 2011). O uso de antibióticos na infância também interfere com a colonização intestinal (PALMER et al., 2007). A diminuição da diversidade da microbiota, resultante da terapia com antimicrobianos pode predispor ao desenvolvimento de doenças alérgicas, como asma (RUSSELL et al., 2013) e ainda pode estar associado ao aparecimento da obesidade na adolescência (AZAD et al., 2014).

A teoria da higiene propõe, que o excesso de cuidados com a higiene na infância pode afetar a colonização intestinal diminuindo a diversidade, já que o contato com ambientes de maior diversidade de bactérias na infância está relacionada ao amadurecimento do sistema imune (KUO et al., 2013). Camundongos jovens expostos a lipopolissacarídeos, que constituem a parede celular das bactérias, tiveram menor resposta inflamatória quando foram submetidos novamente ao contato de lipopolissacarídeos (SCHUIJS et al., 2015). Da mesma forma, crianças expostas a ambientes rurais, que mantêm contato direto com animais e consomem leite integral de vaca tem resposta imune diferente daquelas crianças que vivem nas cidades. A resposta imune também diminui quando as células são estimuladas com lipopolissacarídeos, pois o organismo tem uma resposta que demonstra tolerância imunológica e chance menor de desenvolver asma e alergias (KÄÄRIÖ et al., 2016). Além disso, a alimentação com leite materno e a presença de irmãos mais velhos estão associados a menor abundância relativa de bactérias específicas que diminuem as chances da criança desenvolver dermatite alérgica (PENDERS et al., 2013).

Existem muitas diferenças interpessoais na composição da microbiota intestinal de adultos (LEY et al., 2006) e cada pessoa possui sua microbiota específica e que é relativamente estável ao longo do tempo (TURNBAUGH et al., 2009a). Indivíduos da mesma família tem a composição da microbiota intestinal parecida (LEY et al., 2005), mas a estrutura sofre interferência da dieta, da idade e da localização geográfica (YATSUNENKO et al., 2012).

Embora pessoas saudáveis possuam perfil bacteriano relativamente parecido, algumas doenças, como a doença do intestino irritado, podem alterar a composição da microbiota intestinal (QIN et al., 2010). Há relatos da redução de bactérias da família Ruminococcaceae na doença de Crohn e da redução e do aumento de bactérias das famílias Leuconostocaceae e Enterobacteriaceae,

respectivamente, na colite ulcerativa (MORGAN et al., 2012). A presença de *C. difficile*, que pode causar colite pseudomembranosa, também modifica a composição e a estrutura da comunidade bacteriana (ROUSSEAU et al., 2011; SONG et al., 2013). A infecção por esta bactéria é muitas vezes refratária ao tratamento com antibióticos e uma alternativa é restabelecer a microbiota com o transplante de microbiota fecal, utilizando amostras de um doador saudável, para a colonização do intestino do paciente. Esta técnica tem se tornado rotineira e contribui para a cura, com até 95% de sucesso (SEEKATZ et al., 2014; SONG et al., 2013).

As bactérias estão envolvidas com a modificação na expressão de genes que podem interferir na fisiologia do hospedeiro (HOOPER et al., 2001). Podem, por exemplo, modificar a microcirculação das vilosidades intestinais por meio de estímulo das células de Paneth, que aumenta o calibre dos vasos nos vilos quando o intestino está colonizado, melhorando a capacidade absorptiva de nutrientes (STAPPENBECK et al., 2002).

Alguns pesquisadores correlacionam o estilo de vida ocidental, com alta disponibilidade e ingestão de alimentos calóricos nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, e a utilização de antibióticos como promotores de crescimento na criação intensiva de animais de produção como um dos fatores que contribui para o aumento dos índices de obesidade na população (KAU et al., 2011; MILLION et al., 2013). A evidência de que camundongos ingerindo doses baixas e contínuas de antibióticos na fase inicial de desenvolvimento tiveram maior estoque de gordura corpórea (CHO et al., 2012) reforça esta teoria.

O primeiro estudo que trouxe a suspeita de que a microbiota poderia estar envolvida com a eficiência na extração de nutrientes foi realizado em camundongos não colonizados (*germ-free*), no qual verificou-se que estes animais ingeriam mais nutrientes e perdiam mais energia nas fezes do que os camundongos que possuíam o intestino colonizado (WOSTMANN et al., 1983). Mais tarde, foi comprovado que a presença das bactérias aumenta em até 40% o estoque de gordura corpórea, mesmo que a ingestão de alimentos seja inferior aos camundongos não colonizados (BÄCKHED et al., 2004).

As evidências de que as bactérias auxiliam na extração de nutrientes dos alimentos levantaram a suspeita de que indivíduos com capacidade superior de extrair energia seriam, naturalmente, mais eficientes ou albergariam bactérias que

contribuem para o aumento do acúmulo de gordura corpórea (BÄCKHED et al., 2005). Esta hipótese foi testada por LEY et al. (2005), os quais encontraram, na composição da microbiota intestinal de camundongos obesos, mais bactérias pertencentes ao filo Firmicutes e menor abundância de bactérias do filo Bacteroidetes. Além disso, a característica de maior capacidade de extração de nutrientes nos alimentos pode ser transmitida por meio do transplante da microbiota fecal de indivíduos obesos, que coloniza o intestino dos receptores e aumenta a porcentagem de gordura corpórea sem aumentar o consumo de alimento, comparado a indivíduos que recebem bactérias de camundongos magros (TURNBAUGH et al., 2006).

Camundongos colonizados com bactérias do intestino de humanos e que tiveram acesso a dieta ocidental modificaram a microbiota intestinal, diminuindo a diversidade e aumentando a abundância de bactérias das classes Erysipelotrichi e Bacilli, pertencente ao filo Firmicutes, que contribuíram para o aumento do estoque de tecido adiposo (TURNBAUGH et al., 2009b). Assim como o aumento da ingestão contribui para o aumento de peso, a reeducação alimentar na redução da ingestão de alimentos calóricos gerou perda de peso e modificou a proporção de Firmicutes e Bacteroidetes em humanos obesos (LEY et al., 2006).

Portanto, as pesquisas recentes na área da microbiologia trazem novas perspectivas sobre a relação das bactérias com os seus hospedeiros, destacando a importância dos micro-organismos e a capacidade que eles possuem de influenciar a fisiologia do hospedeiro e ressaltando a importância da manutenção da microbiota saudável e equilibrada.

#### 2.4 MICROBIOTA DO SISTEMA DIGESTÓRIO DOS BOVINOS

As espécies ruminantes evoluíram com a presença de micro-organismos e são totalmente dependentes dessa relação simbiótica (HACKMANN; SPAIN, 2010). As bactérias são os micro-organismos mais numerosos do rúmen e estão associadas ao metabolismo de aminoácidos, proteínas e carboidratos. Elas atuam na degradação de componentes indigeríveis transformando-os em nutrientes passíveis de absorção, além de ser fonte de proteína para o hospedeiro (CREEVEY et al., 2014).

As populações bacterianas presentes no trato gastrointestinal dos bovinos variam de acordo com a localização anatômica. Os pré-estômagos possuem microbiota com composições semelhantes, as quais se distinguem das presentes no abomaso e intestinos. A microbiota do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e grosso (ceco, cólon e reto) também possuem composições distintas entre elas (MAO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013).

#### 2.4.1 Microbiota Ruminal

O rúmen é o órgão com maior capacidade de fermentação, dado ao volume do conteúdo que contém comparado a outros órgãos (aproximadamente 200 litros). A quantidade de bactérias presente no conteúdo ruminal líquido é de cerca de  $7,79 \times 10^{10}$  (MAO et al., 2015). A população microbiana dos pré-estômagos é muito semelhante em relação à diversidade. Entretanto, o rúmen possui o maior índice de riqueza dentre eles (MAO et al., 2015), porém são observadas diferenças significativas das abundâncias relativas quando comparadas as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal (HENDERSON et al., 2013).

A composição da microbiota ruminal modifica-se ao longo do desenvolvimento. Os bezerros não têm a população estável e a partir dos seis meses de idade até a maturidade começa a existir maior estabilidade e semelhança a animais adultos. A microbiota ruminal dos bezerros possui alta abundância relativa de Bacteroidetes, caracterizando-se como o primeiro filo a colonizar o rúmen de bezerros ainda lactentes. Com o avanço da idade e a desmama, bactérias pertencentes ao filo Firmicutes tornam-se as mais abundantes no interior do rúmen (JAMI et al., 2013; LI et al., 2012).

Em um estudo amplo envolvendo vários centros de pesquisa em todo o mundo, foram coletadas mais de 700 amostras de conteúdo ruminal, incluindo bovinos, caprinos e outros ruminantes. A microbiota compartilhada entre as espécies foi determinada, sendo composta por bactérias da ordem Clostridiales, das famílias Lachnospiraceae, Ruminococcaceae e Bacteroidales, e dos gêneros *Prevotella*, *Butyrivibrio* e *Ruminococcus* (HENDERSON et al., 2015). Comprovou-se, ainda, que existe composição distinta da microbiota entre bovinos e pequenos ruminantes e que a mesma sofre influência do tipo de dieta. Dentre as bactérias, foram observadas

correlações inversas entre *Fibrobacter* spp. e Veillonellaceae, que são respectivamente mais abundantes na microbiota ruminal de bovinos e de pequenos ruminantes (HENDERSON et al., 2015). Isso demonstra que existem particularidades interespecíficas na colonização ruminal.

Além disso, trabalhos tem demonstrado que bactérias pertencentes ao filo Firmicutes, como Lachnospiraceae, *Eubacterium* spp., e *Dialister* spp, foram correlacionadas com maior teor de gordura no leite de vacas (JAMI et al., 2014) e Veillonellaceae, Lachnospiraceae, *Dialister* spp. e *Acidaminococcus* spp com maior ganho de peso médio diário (GMD) em novilhas confinadas (MYER et al., 2015a). Outras bactérias, como *Atopobium* spp. e *Adlercreutzia* spp. (ambas pertencentes ao filo Actinobacteria), foram associadas com o maior volume de leite produzido (JAMI et al., 2014) e *Prevotella* spp., do filo Bacteroidetes, com a maior ingestão de matéria seca (IMS) (MYER et al., 2015a), evidenciando o papel que algumas espécies podem exercer sobre características produtivas desejáveis em animais de produção.

#### 2.4.2 Microbiota Intestinal

A colonização do intestino do bezerro ocorre desde as primeiras horas de vida, e os índices de riqueza e de diversidade aumentam durante os meses seguintes de acordo com o desenvolvimento do animal e a ingestão de alimentos sólidos, como feno e concentrados (KLEIN-JÖBSTL et al., 2014).

As bactérias presentes nas fezes de bezerros lactentes são pertencentes principalmente aos filios Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria (EDRINGTON et al., 2012; OIKONOMOU et al., 2013). As primeiras bactérias a colonizar o intestino são do filo Proteobacteria, que no primeiro dia apresentam-se como mais abundantes (KLEIN-JÖBSTL et al., 2014). Ao longo do desenvolvimento ocorre aumento da abundância de espécies pertencentes aos filios Bacteroidetes e Firmicutes, independente da dieta líquida que recebem (EDRINGTON et al., 2012; OIKONOMOU et al., 2013; XIE et al., 2013).

A transição alimentar, altera a população microbiana, a partir da dieta exclusivamente líquida para o consumo de outros alimentos (UYENO et al., 2010). Além disso, outros fatores como, doenças, antibióticos e antibióticos promotores de crescimento também podem alterar a microbiota (OIKONOMOU et

al., 2013; XIE et al., 2013). Após o desmame os bezerros tendem a estabilizar a microbiota, que torna-se parecida entre eles (KLEIN-JÖBSTL et al., 2014).

A capacidade do intestino do ruminante adulto é de 14% comparado ao rúmen, em relação ao volume da digesta (GRESSLEY et al., 2011). A densidade da microbiota colônica é a maior dentre todo o trato gastrintestinal, incluindo aquela presente no rúmen, sendo  $7,62 \times 10^{11}$  e  $7,35 \times 10^{10}$  o total da população microbiana encontrada nas amostras de conteúdo do cólon e do reto, respectivamente (MAO et al., 2015). Além disso, a concentração de ácidos graxos voláteis como acetato, propionato e butirato, presentes no intestino grosso (ceco e cólon) e no reto é semelhante àquela presente nos pré-estômagos, e superior à encontrada no abomaso e no intestino delgado (MAO et al., 2015), evidenciando a importância do intestino grosso em ruminantes.

Estudos demonstram que os índices de riqueza e de diversidade são semelhantes entre o ceco, o cólon e o reto e as abundâncias relativas correspondentes a cada filo, também (MAO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013), reforçando que o uso das amostras fecais para caracterizar a microbiota intestinal é representativo de todo o intestino grosso.

Embora, os bovinos sejam animais altamente eficientes em processar diversos tipos de alimentos, e transformá-los em carne e leite, a busca por melhores índices de produção, desenvolvimento e ganho de peso ainda continua sendo foco de interesse científico. Existem evidências de que as bactérias intestinais estão envolvidas com a eficiência da extração de nutrientes, aumentando o ganho de peso e maior deposição de gordura em humanos e camundongos (BÄCKHED et al., 2004; TURNBAUGH et al., 2009b). Dessa forma, deu-se início a busca por bactérias que tenham esta característica e exerçam esse efeito em animais de produção (DANZEISEN et al., 2011; HOLMAN; CHÉNIER, 2014; SINGH et al., 2012). Bezerros com maior peso ao desmame tiveram maiores índices de riqueza e maior abundância relativa de *Faecalibacterium* na primeira semana de vida (OIKONOMOU et al., 2013). Semelhante, MYER et al. (2015b) tentaram encontrar diferenças na diversidade bacteriana nas fezes dos animais com diferentes índices de GMD e IMS. Os índices de riqueza e de diversidade não diferiram entre os grupos, entretanto existe correlação entre maiores índices de GMD e IMS com a presença de bactérias das famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae, ambas

pertencentes ao filo Firmicutes.

As alterações nas dietas dos ruminantes, como o aumento do volume de concentrado fornecido, modificam o trânsito intestinal, as condições de pH e alteram os nutrientes que chegam ao intestino. Cabras adaptadas a alimentação com pequenas quantidades de grãos de cevada moída na dieta e submetidas ao aumento da quantidade deste alimento demonstraram que algumas bactérias eram desfavorecidas no ambiente ruminal, mas foram favorecidas no intestino, além disso, observou-se aumento da produção de AGV e redução do pH (METZLER-ZEBELI et al., 2013). De maneira semelhante, vacas leiteiras aumentaram a produção de propionato e de butirato, com queda do pH no conteúdo fecal quando submetidas à acidose ruminal subaguda experimental (MAO et al., 2012), demonstrando que os alimentos não utilizados pelas bactérias ruminais e não absorvidos no intestino delgado são utilizados pelas bactérias no intestino grosso e demonstram ser importantes na extração de nutrientes para o hospedeiro e contribuem para o aproveitamento mais eficiente dos componentes da dieta.

A maior inclusão de amido na dieta aumentou a abundância relativa de bactérias do filo Bacteroidetes em relação aos Firmicutes nas fezes de bovinos confinados (SHANKS et al., 2011). Embora pertençam a filos diferentes, *Prevotella* spp. e *Succinivibrio* spp. (Bacteroidetes e Proteobactéria, respectivamente), outros trabalhos relataram o aumento da abundância relativa destas bactérias nas fezes (KIM et al., 2014; MYER et al., 2015b) e no rúmen (HENDERSON et al., 2015) de bovinos quando a dieta tem grãos na sua composição. Ambos os gêneros foram relacionados com maior ingestão de matéria seca, mas apenas o gênero *Prevotella* spp. teve relação com maior GMD (MYER et al., 2015b).

Bovinos alimentados exclusivamente com forragem demonstram maior quantidade de bactérias pertencentes ao filo Verrucomicrobia, do que os animais recebendo carboidratos na dieta (KIM et al., 2014). Acredita-se que algumas substâncias produzidas no intestino podem auxiliar na manutenção destas bactérias. Por exemplo, a barreira mucosa é rica em mucina, produzida pelas células intestinais, que torna-se substrato para a produção de acetato e de propionato por bactérias deste filo (DERRIEN et al., 2004).

Embora existam individualidades na microbiota de bovinos submetidos às mesmas condições de dieta e de manejo (DURSO et al., 2010), o

ambiente em que esses animais estão inseridos (fazenda) pode exercer grande influência sobre a microbiota (SHANKS et al., 2011). No entanto, a dieta parece ser o fator mais importante na indução de mudanças na composição das populações microbianas, independente de fatores externos (KIM et al., 2014).

As diferenças que o tipo de dieta provoca na microbiota intestinal dos bovinos está descrita na literatura (KIM et al., 2014; SHANKS et al., 2011) e as mudanças na concentração de amido em um curto período de tempo, também demonstraram interferência nas populações bacterianas (MAO et al., 2012; METZLER-ZEBELI et al., 2013). Entretanto, estudos longitudinais demonstrando como as populações microbianas se adaptam a novas dietas e qual é o tempo necessário para que estas populações se estabilizem são raros na literatura.

Animais confinados recebendo dietas ricas em grãos geralmente são alimentados com APCs com o intuito de melhorar os índices de performance, como o ganho de peso e a conversão alimentar, além de auxiliar na prevenção de doenças (MEYER et al., 2013; MEYER et al., 2009; ROGERS et al., 1995; SALINAS-CHAVIRA et al., 2009). No entanto, estudos demonstram diferentes resultados para as avaliações dos índices de performance de bovinos que recebem APCs na alimentação.

A adição de virginiamicina em doses baixas não afetou a IMS, ao contrário, doses mais altas (25 e 50 mg/kg/MS) diminuíram a IMS, mas não o suficiente para melhorar a conversão alimentar ou o GMD. Ainda, o mesmo trabalho relata o fornecimento de 27 mg/kg/MS para outro grupo de animais que não teve o mesmo efeito. Porém, os autores relatam que os resultados unidos demonstram resposta dose-dependente na melhoria do GMD e na eficiência alimentar (ROGERS et al., 1995).

O fornecimento de monensina associada a tilosina reduziu a ingestão de matéria seca pelos animais em relação a dieta controle. Embora diferenças no GMD não tenham sido observadas entre os grupos, a conversão alimentar foi melhor para os animais que recebiam os antibióticos (MEYER et al., 2013; MEYER et al., 2009). Contrariamente, SALINAS-CHAVIRA et al. (2009) relatam que a utilização de virginiamicina ou monensina, não influenciou no GMD ou a IMS. Somente a virginiamicina demonstrou melhorar a conversão alimentar. Ainda, GOLDER et al. (2014) relatam que a virginiamicina não apresentou diferença no

GMD, apesar deste grupo de animais apresentar o maior índice de IMS.

O efeito da virginiamicina no pós-parto imediato de vacas leiteiras não apresentou resultados satisfatórios. Um aumento significativo da produção de leite em associação com o fornecimento de monensina foi observado, entretanto, o grupo suplementado somente com virginiamicina teve a menor produção entre os tratamentos testados (ERASMUS et al., 2008).

A inclusão de clortetraciclina e sulfametazina nos primeiros 50 dias de confinamento teve efeito no GMD durante todo o período de confinamento (200 dias) antes de serem encaminhados ao abate e na conversão alimentar somente no período que recebiam os antibióticos (GALLO; BERG, 1995).

Os promotores de crescimento também são utilizados na prevenção de doenças. Menor incidência de abscessos de fígado foram observados com a suplementação com tilosina (MEYER et al., 2009) e virginiamicina (ROGERS et al., 1995) e menor incidência de doenças respiratórias no uso de clortetraciclina e sulfametazina (GALLO; BERG, 1995).

Na literatura brasileira há somente um trabalho que avalia os efeitos da adição de virginiamicina na alimentação de bovinos confinados (NUÑEZ et al., 2013). Os resultados apontam redução na IMS, porém não interfere com o GMD e na conversão alimentar comparados ao grupo controle.

O efeito dos APCs em inibir o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico e evitar a queda no pH em auxílio ao controle da acidose é desejado em dietas com alta inclusão de carboidratos. A virginiamicina tem demonstrado controlar a rápida produção de lactato no rúmen (CLAYTON et al., 1999; COE et al., 1999; GOLDER et al., 2014) e a diminuição do pH na acidose (COE et al., 1999). Porém, o pH não apresentou diferença comparando-se o grupo suplementado com virginiamicina e o controle de novilhas recebendo dietas altamente energéticas (GOLDER et al., 2014) e em vacas leiteiras a pasto que recebem alta quantidade de concentrados (CLAYTON et al., 1999). Porém, vacas leiteiras suplementadas com virginiamicina demonstraram pH das fezes menor do que as vacas que não recebiam o antibiótico (CLAYTON et al., 1999).

Apesar de resultados contraditórios estarem presentes na literatura, o aparente efeito de alguns APCs, ainda tornam a utilização dos antibióticos como pratica comum na criação de bovinos. Entretanto, ainda não está claro como as

doses utilizadas podem exercer efeito nas populações microbianas. Algumas hipóteses foram formuladas a partir do conceito de que APCs podem melhorar a absorção dos nutrientes por diminuírem a camada de muco que recobre a mucosa intestinal, reduzirem a competição de bactérias por nutrientes, diminuírem as infecções subclínicas ou restringirem a produção de toxinas pelas bactérias (FEIGHNER; DASHKEVICZ, 1987). As baixas dosagens em que os APCs são incluídos na ração e a baixa absorção intestinal de alguns antibióticos, não permitem mensurações das concentrações sanguíneas, impossibilitando avaliações. A compreensão dos mecanismos envolvidos com os efeitos dos APCs pode ser obtida estudando as mudanças induzidas nas comunidades microbianas (BUTAYE et al., 2003).

Somente dois trabalhos avaliaram o efeito de APCs na microbiota intestinal de bovinos, RETI et al. (2013) não observaram diferença na microbiota intestinal de animais suplementados ou não com clortetraciclina e sulfametazina no período de confinamento. No entanto, a coleta das fezes para análise foi realizada somente 28 dias após a retirada da suplementação com os antibióticos, o que pode ter proporcionado tempo suficiente para que as populações de bactérias fossem restabelecidas. Da mesma forma, MCGARVEY et al. (2010) não encontraram diferenças significativas após a inclusão de monensina na dieta de vacas leiteiras. Vale ressaltar que estes estudos utilizaram métodos moleculares que fornecem pequeno número de sequências para análise e podendo não detectar as mudanças ocorridas em ecossistemas complexos.

Diferentemente dos bovinos, que possuem os pré-estômagos como câmaras de fermentação e podem metabolizar os componentes ingeridos antes de chegarem aos intestinos, a microbiota intestinal dos animais monogástricos pode estar susceptível a maior concentração dos antibióticos incluídos na alimentação. Da mesma forma, os resultados de estudos avaliando os efeitos de APCs em outras espécies de animais produtores de carne também são contraditórios. Não foram observadas mudanças na composição ou estrutura das comunidades microbianas do ceco de frangos de corte com a inclusão de virginiamicina associada ou não a monensina (DANZEISEN et al., 2011; POURABEDIN et al., 2015). Ao contrário, observou-se redução dos índices de diversidade nas aves que recebiam virginiamicina, quando vários lotes de frango foram sequencialmente alojados no

mesmo galpão (NEUMANN; SUEN, 2015). Alguns gêneros de bactérias apresentam maior abundância relativa na microbiota das aves que recebiam virginiamicina, como por exemplo a família Ruminococaceae (DANZEISEN et al., 2011); *Propionibacterium* e *Corinebacterium* (POURABEDIN et al., 2015); e *Lactobacillus* e *Faecalibacterium* (NEUMANN; SUEN, 2015).

Em suínos alimentados com tilosina ou virginiamicina não foram encontradas mudanças na composição ou diversidade das bactérias ao longo do tempo ou em relação ao grupo controle (KALMOKOFF et al., 2011). Este achado foi atribuído à alta abundância de genes de resistência a antibióticos encontrados naquelas amostras.

Apesar dos benefícios observados com o uso de APCs no sistema de produção de proteínas de origem animal, existe pressão cada vez maior para que essa prática seja proibida, principalmente devido à seleção de bactérias resistentes aos antibióticos levando ao aumento de infecções hospitalares de difícil controle (MARSHALL; LEVY, 2011; WEESE et al., 2015). Com exceção da União Européia, o uso destas substâncias na maioria dos países ainda é permitido. No Brasil, a virginiamicina está disponível comercialmente para o uso em animais. A legislação brasileira permite o fornecimento a bovinos de engorda na dose máxima de 340 mg por animal por dia (MAPA, 2003).

A virginiamicina é um antibiótico da família das estreptograminas, proveniente de cepas de *Streptomyces virginiae*. Este antibiótico possui dois componentes, estreptogramina A e B. Cada um dos componentes possui propriedades bacteriostáticas, porém quando utilizados em conjunto, agem em sinergismo tornando a droga bactericida e diminui a concentração inibitória mínima necessária para exercer o efeito (VAZQUEZ, 1966).

O mecanismo de ação dos componentes A e B da virginiamicina, interferem com a síntese proteica no ribossomo 70S, impedindo o início e o alongamento da sequência de peptídeos (NOESKE et al., 2014). A virginiamicina age principalmente sobre as bactérias gram-positivas, que no rúmen são as responsáveis pela produção de ácido lático em dietas ricas em carboidratos (NAGARAJA et al., 1987).

As estreptograminas atualmente tem se tornado importantes moléculas no tratamento de infecções hospitalares graves que foram resistentes a

outros antibióticos. No entanto, a utilização da virginiamicina na alimentação animal pode aumentar o aparecimento de resistência bacteriana a esta classe de antibióticos (MAST; WOHLLEBEN, 2014; YU et al., 2014).

A inclusão de virginiamicina na alimentação de bovinos de corte confinados, não foi associada ao aparecimento de resistência de *E. coli* nas fezes dos animais (EDRINGTON et al., 2014). Semelhantemente, o uso contínuo de virginiamicina em vários lotes de frangos de corte sobre a mesma cama não aumentou a resistência dos isolados de *E. coli*, mas aumentou o número de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a estas drogas (MCDERMOTT et al., 2005).

Por outro lado, existe a preocupação de que a troca de material genético entre as bactérias possa aumentar a incidência de cepas resistentes. Além disso, mecanismos de resistência podem ser comuns para um grupo de drogas que possuem o mesmo mecanismo de ação (WILSON, 2014). Assim, bovinos confinados e suínos apresentaram aumento na abundância de genes de resistência às estreptograminas quando alimentados com tilosina (CHEN et al., 2008; KALMOKOFF et al., 2011). Este padrão de resistência ocorre devido aos macrolídeos, lincosaminas e as estreptograminas B, compartilharem o mesmo sítio de ligação na estrutura do ribossomo 50S. O gene *erm* (erythromycin ribosomal methylation) confere este tipo de resistência a *superfamília* destes antibióticos macrolídeos-lincosamina-estreptogramina B (MLSb) (WEISBLUM, 1995).

Portanto, alternativas em substituição aos APCs, para aumentar a eficiência produtiva, com melhores índices de performance em animais destinados ao consumo e reduzir o aparecimento de resistência aos antibióticos utilizados na medicina, são necessárias e fortemente justificadas.

### 3 HIPÓTESES

A mudança na dieta ocorrida na entrada de bovinos de corte no confinamento altera as comunidades bacterianas fecais.

A virginiamicina utilizada como promotor de crescimento causa mudanças na microbiota intestinal de bovinos de corte.

Animais com maior ganho de peso albergam gêneros de bactérias diferentes dos animais com menor ganho de peso durante o confinamento.

O uso de virginiamicina como promotor de crescimento aumenta a prevalência de bactérias *Escherichia coli* resistentes a diferentes antibióticos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as mudanças na microbiota intestinal de bovinos de corte induzidas pelo confinamento e pelo uso da virginiamicina como promotor de crescimento, utilizando a tecnologia de sequenciamento genético de nova geração.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as populações bacterianas presentes nas fezes de bovinos na entrada, após o período de adaptação e ao término do confinamento.
- Avaliar os efeitos do uso de virginiamicina como antimicrobiano promotor de crescimento na microbiota fecal de bovinos.
- Determinar gêneros de bactérias que possam estar relacionadas com maior ganho de peso.
- Investigar o efeito do fornecimento de virginiamicina sobre a prevalência de resistência da bactéria *Escherichia coli* a diferentes antibióticos.

**4 ARTIGO:****Changes in the Fecal Microbiota of Beef Cattle Caused by Confinement and the Use of Virginiamycin as Growth Promoter<sup>1</sup>****ABSTRACT**

Low doses of antibiotics are commonly given to food animals in some regions for growth promotion. However, the consequences of this practice on the intestinal microbiota and how these changes occur overtime are poorly understood. This study aimed to investigate the effects of virginiamycin used as antibiotic growth promoter (AGP) and the consequences of confinement on the fecal microbiota of feedlot cattle. Two batches of beef cattle entering a feedlot operation (G1 and G2) were divided into two pens: one receiving virginiamycin (ATB) and one control (CON) receiving the same feeding without the antibiotic. Group 1 was composed by 50 animals (steers and heifers) and G2 by 36 animals (only steers). Fecal samples were collected at arrival, mid feedlot (25 days after arrival) and at exit to slaughter. One hundred forty-four samples had DNA extracted and the V4 region of 16S rRNA gene was amplified and sequenced. Samples from arrival (36) and exit (36) of G2 were used to address antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains. The phylum Firmicutes was the most abundant at all moments. Verrucomicrobia has higher relative abundance at the beginning of feedlot, but decreased drastically with feedlot diet. Proteobacteria significantly increased until the exit. The relative abundance of *Bifidobacterium* spp. was statistically lower in animals treated with virginiamycin. Marked changes in composition and structure of fecal microbiota occurred following entrance into the feedlot, but virginiamycin significantly affected only membership, suggesting that the antibiotic has a stronger effect on the rare species present in the distal gut of feedlot cattle, but not on the most abundant species. Only 2% of *E. coli* strains at arrival and 0,2% at exit were resistant to at least one antibiotic. The use of virginiamycin as AGP had no effect on antibiotic resistance. The differences found between batches are suggestive that variations in study conditions are important and can strongly affect the intestinal microbiota. Therefore, caution should be taken when interpreting and

---

<sup>1</sup> Artigo formatado de acordo com as normas da revista PLOS ONE.  
Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

extrapolating results from different studies.

**KEY WORDS:** antibiotic, 16S rRNA gene, feedlot, microbiota, *E. coli*, resistance.

## INTRODUCTION

Over the last few years, high throughput sequencing has been used to characterize complex bacterial communities, especially the intestinal microbiota. These methods have revealed several new interactions between host and bacteria and have established important novel roles of the intestinal microbiota in maintenance of health (1). Indeed, specific bacterial profiles have been related with chronic inflammation (2), obesity (3), diabetes (4) and behavioral changes (5).

For food animals, there is special interest in the efficiency of these bacteria in extract energy from food. There are evidences that individuals colonized by certain species of bacteria are likely to gain more weight (6), which can be reproduced in laboratory animals (7). Different bacterial profiles have been reported in broilers with low and high alimentary conversion (8), in beef cattle with low and high residual feed intake (9), and with better health status and fast growing in dairy calves (10).

Many factors can modify the intestinal microbiota, especially diet (6, 11), inflammation (12), pathogens (13) and certain drugs, like antimicrobials (14). The effect of different diets over the fecal communities of cattle has been investigated (15-17). However, interpretation of results is limited, since either, a small number of animals or a small number of reads per sample was employed in those studies. Therefore, changes occurring in a real setting of a feedlot operation, from arrival to slaughter remain to be investigated.

In some regions, antimicrobial drugs are commonly given to food animals in low doses to enhance growth and improve performance. Antibiotics growth promoters (AGPs) can influence in average daily gain (ADG), dry matter intake (DMI) and gain to feed ratio (G:F) (18-20). Virginiamycin is one of the main AGPs given to cattle (18, 21). However, increasing concerns related to the development of multidrug resistant bacteria has increased pressure to decrease the use of antibiotics for growth promotion (22).

Studies evaluating the effects of AGPs are conflicting and are suggestive of a dose effect or

little effect in the microbiota of feedlot cattle (23-25). Furthermore, no longitudinal studies have been performed to evaluate the short term changes induced by antibiotic growth promoters (AGPs) in this species. A better understanding of the consequences of these drugs and the understanding of microbial population dynamics in this scenario is essential on the search for alternatives to antibiotic use in animal feeding.

The objectives of this study were to investigate the consequences of virginiamycin used as AGP and changes induced by feedlot in the intestinal microbiota of beef cattle.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals, diet and sampling**

The study was approved by the Animal Care Committee of the “Universidade Estadual de Londrina” (# 10482014.57).

Eighty-six crossbreed cattle (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) entering a feedlot facility located in the north region of Paraná State, Brazil were studied. Animals were approximately 18 months old and originated from two farms located in the same region and adopting the same management: before arriving to the facility, all individuals were kept at range, in pasture composed by *Brachiaria* spp. and supplemented with a commercial mineral salt. Animals from two batches were enrolled: Group 1 (G1) entering feedlot on May 5<sup>th</sup> 2014 and Group 2 (G2) entering feedlot on January 19<sup>th</sup> 2015. At arrival, animals from both batches were divided securing an even distribution of gender into two different pens: a treatment pen (ATB) that received virginiamycin as growth promoter and a control pen (CON) that received the same feeding without the antibiotic.

Diet consisted of ratio composed by concentrate (58.00%), corn silage (29.80%) and orange pulp (12.20%) on dry matter. Wet orange pulp was offered to G1 and silage to G2. Concentrate was formulated with fat corn germ (42.90%), ground corn (49.00%), soybean meal (3.40%), urea (1.10%), slow release urea (0.80%, Optigen® Alltech, PR, Brazil), and mineral mix (2.80%, Beephos 40, NutriStar, PR, Brazil). Virginiamycin was added to mineral mix for an estimated intake of 0.94 mg/kg/day, according to the Brazilian legislation for AGPs usage.

Samples from the two groups were collect at three moments: arrival (D0), mid feedlot period

(26 and 24 days after arrival for G1 and G2, respectively) and exit. Samples from feedlot exit were collected at the moment animals were shipped for slaughtering, varying according to the animal's body condition score (BCS), which was determined visually by the veterinarian in charge. Animals from G1 were shipped at three different moments: 66 days of feedlot (six heifers from CON and six heifers from ATB), 88 days (four heifers and three steers from CON and three steers from ATB), and 116 days (two steers from CON and two heifers and four steers from ATB). All animals from G2 were slaughtered after 100 days in the feedlot. Fecal samples were collected directly from the rectum and maintained refrigerated until frozen at -80°C. Samples were thawed at room temperature just before processing.

Body weight was measured at arrival and exit of feedlot.

#### **Isolation and antimicrobial susceptibility testing of *E. coli* strains**

An aliquot from all samples collected from G2 animals at arrival (n=36) and exit (n=36) was used to test for antimicrobial resistance. Each sample was plated on MacConkey agar (Oxoid®, Basingstoke, Hants, UK) and incubated at 37°C for 24h for isolation of *Escherichia coli*. Two to three colonies from each plate were selected and confirmed by the EPM, MILi and Simmons Citrate agar biochemical assays (26-28). Confirmed *E. coli* isolates were stored in Brain Heart Infusion (BHI) (Difco®, Sparks, MD) with 25% glycerol (Sigma®, St. Louis, MO) media at -80 °C.

Antimicrobial susceptibility was determined using the disk-diffusion method, as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (29, 30). The following antimicrobial agents were tested: amoxicillin-clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), aztreonam (30 µg), cefoxitin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg) and trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg) (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a quality control strain.

#### **DNA Extraction and sequencing**

Thirty out of the 50 samples collected from G1 were randomly selected for sequencing (nine heifers and six steers from CON and eight heifers and seven steers from ATB). Eighteen out of the 36

samples collected from G2 (all steers) were randomly selected for sequencing (nine from CON and nine from ATB). A commercial kit (E.Z.N.A. Stool DNA Kit, Omega Bio-Tek) was used for DNA extraction according to the manufacturer's instructions. The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using the forward primer S-D-Bact-0564-a-S-15 and the reverse primer S-D-Bact-0785-b-A-18 (31) containing an overlapping region of the Illumina sequencing primers. PCR was carried in two steps: first, 2.5µL of DNA template were added to a mixture containing 9µL of water, 12.5µL of Kapa 2X ReadMix (Kapa Biosystems, MA) and 0.5µL of each 16S primer (10 pmol/µL). The mixture was subjected to the following PCR conditions: 3 min at 94°C for denaturing, and 26 cycles of 45s at 94°C for denaturing, 60s at 53°C for annealing and 90s at 72°C for elongation followed by a final period of 10 min at 72°C and kept at 4°C. PCR products were purified with 20 µL of Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) magnetic beads and eluted in 52.5 µl Tris buffer (10mM, pH 8.5). The second PCR was carried by adding 4µL of the purified product to a mixture containing 9.6µL of water, 20µL of 2X Ready Mix and 3.2µL of each Illumina index primer (2.5pmol/µL). PCR conditions consisted of 3 min at 94°C, and 7 cycles of 45s at 94°C, 60s at 50°C and 90s at 72°C and a final period of 10 min at 72°C and kept at 4°C. A second purification was performed by using 40µL of AMPure beads and eluting samples with 32µL of Tris buffer (10mM, pH 8.5). Amplicons were evaluated by electrophoresis in 1.5% agarose gel and submitted to the Genomics Facility of the University of Guelph to be sequenced with an Illumina MiSeq platform with the V2 reagents kit for 250 cycles from each end.

Data were made publicly available at the NCBI Sequence Read Archive under accession number PRJNA301926.

### **Statistical analysis**

Bioinformatic analysis was performed using the software mothur (v.1.36.1) according to (32). Taxonomic classification was obtained from the Ribosomal Database Project (March 2012) (33). Sequences were assigned into phylotypes at the genus level for analysis. Relative abundances were calculated and the main phyla and genera (abundance >1%) found in each group at the different moments were presented by column charts.

A subsample from the main dataset was used for alpha and beta diversity analyses in an attempt to decrease bias caused by non-uniform sequence numbers. Good's coverage after sub-sampling was calculated in order to ensure representative sub-samples. Richness was estimated by Chao1, and diversity by the inverse of the Simpson's index. Rarefaction curves were generated by plotting the mean of the number of genera found in each group at the different moments by the number of reads.

The dissimilarity between community membership and structure found in each sample was measured respectively by the classic Jaccard index, that takes into account community richness, and by the Yue and Clayton index, that takes into account community diversity (richness and evenness of phylotypes present in each sample) (34). The similarity between community membership and structure present in each sample was represented by dendrograms visualized with FigTree (v1.4.2), and by two dimensional principal coordinate analysis (PCoA).

Comparison of community membership (Jaccard) and structure (Yue and Clayton) between time periods and treatment groups was performed using the Parsimony test and the analysis of molecular variance (AMOVA). In addition, the comparison between animals from G1 that achieved an adequate BCS by day 66 was compared with animals that delayed (day 116) using the same analyses.

Further beta diversity analyses consisted of classification of microbial profiles into enterotypes (or community types), investigation of the core microbiota (genera with relative abundance higher than 1% that were present in all samples from a specific group) and a random forest based algorithm (`classify.rf` command) in order to differentiate communities.

Comparison of relative abundances of all phyla and genera greater than 1% was performed by the two way repeated measures ANOVA considering the sampling time and treatment (CON vs. ATB) as variables. The Bonferroni test was adopted for multiple comparisons correction considering a p value  $<0.010$  as statistically significant. The same approach was adopted for the comparison of results of Chao and Simpson's indexes, but considering a p value  $<0.050$  as statistically significant.

Body weight and average daily gain (ADG) from all animals at exit (G1: 50 and G2: 36) were compared between treatments (CON vs. ATB) using a t test.

The prevalence of antibiotic resistance found in feces from treated and control animals was compared at each timepoint by the Fisher exact test considering a p value of  $<0.05$  as significantly different.

## RESULTS

Data processing and cleaning yielded 7,969,628 sequences from 144 fecal samples (mean 55.731; SD: 22.75). A sub-sample of 18,058 sequences per sample was used in order to control for non-uniform sample sizes and therefore one sample (G2 at mid feedlot) was excluded from the analysis due to low number of reads ( $n=153$ ). Mean of the Good's coverage was 99.85% (min-max: 99.79 – 99.93%) demonstrating an adequate sampling effort at the chosen sub-sampling size. Phylotype based analysis revealed average of 139 genera per sample (SD: 10.8; min-max: 96.6 – 160.8). A total of 620 different genera identified among all samples, from 25 phyla. Rarefaction curves representing the average number of genera per number of reads obtained in each group, are shown in Figure 1.

### Taxonomy

The most abundant phyla found in G1 and G2 are represented respectively in Figures 2A and 2B. At the phylum level, the comparison between arrival and mid feedlot revealed that in both, G1 and G2, there was an increase of Proteobacteria ( $P=0.010$  and  $P<0.001$ , respectively) and Spirochetes ( $P<0.001$  and  $P=0.003$ ) and a decrease of Bacteroidetes and Verrucomicrobia ( $P<0.001$  for all comparisons). An increase of Actinobacteria ( $P<0.001$ ) and Firmicutes ( $P=0.002$ ) was observed only in G1 between arrival and mid feedlot. Considering treatments individually, the same comparison revealed an increase of Actinobacteria ( $P<0.001$ ) in CON of G1 and a decrease of Bacteroidetes ( $P<0.001$ ) in CON of G2. No difference in phyla was identified in the groups receiving virginiamycin.

From mid feedlot to exit, there was an increase of Proteobacteria and a decrease of Spirochaetes and Verrucomicrobia in G1 ( $P<0.001$  for all phyla). Considering treatments individually, there was an increase of Actinobacteria ( $P=0.005$ ) in ATB and a decrease of Spirochaetes in ATB and CON ( $P=0.005$  and  $P<0.001$ , respectively) of G1, with no differences in G2.

The comparison between CON and ATB at mid feedlot (in each group) revealed that

Spirochaetes in ATB were greater than in CON ( $P < 0.001$ ) in G1, and that Actinobacteria in CON were greater than in ATB ( $P = 0.002$ ) in G2. At exit, Actinobacteria in CON were still greater than in ATB ( $P < 0.001$ ) in G2.

The relative abundances of the main genera comprising the fecal microbiota found in G1 and G2 at the different moments are shown respectively in Figures 2C and 2D. At the genus level, changes that were common in both groups (G1 and G2) comparing arrival with mid feedlot, included an increase of unclassified Lachnospiraceae, *Clostridium sensu stricto* spp., *Clostridium XIVa*, *Roseburia* spp., *Succinivibrio* spp. ( $P < 0.001$  for all comparisons), *Treponema* spp. ( $P < 0.001$  and  $P = 0.003$  for G1 and G2, respectively). Also, there was a decrease of Firmicutes, Clostridia, Clostridiales, Verrucomicrobiaceae, *Persicirhabdus* spp. ( $P < 0.001$  for all comparisons), Ruminococcaceae ( $P = 0.003$  and  $P < 0.001$  for G1 and G2, respectively) and *Akkermansia* spp. ( $P = 0.003$  and  $P < 0.001$ ). An increase of Peptostreptococcaceae ( $P < 0.001$ ), *Anaerovibrio* spp. ( $P = 0.007$ ), *Bifidobacterium* spp. ( $P < 0.001$ ) and *Clostridium XI* spp. ( $P < 0.001$ ) was observed only in animals from G1.

Changes that occurred from mid feedlot to exit in both G1 and G2 included a decrease of unclassified Clostridiales ( $P < 0.001$  and  $P = 0.001$ , respectively), *Clostridium XI* ( $P < 0.001$  and  $P = 0.001$ ) and *Clostridium XIVa* ( $P = 0.004$  and  $P < 0.001$ ). There was also an increase of *Succinivibrio* spp. ( $P < 0.001$ ) and a decrease of unclassified Verrucomicrobiaceae ( $P = 0.002$ ), *Akkermansia* spp. ( $P = 0.005$ ), unclassified Clostridia, *Persicirhabdus* spp. and *Treponema* spp. ( $P < 0.001$  for all) only in G1, and an increase of *Clostridium sensu stricto* spp. ( $P < 0.001$ ) and a decrease of unclassified Firmicutes ( $P = 0.005$ ) only in G2.

The comparison between mid feedlot to exit, considering ATB and CON individually, revealed an increase of *Bifidobacterium* spp. ( $P < 0.006$ ) and a decrease of *Clostridium XI* spp. ( $P < 0.001$ ) in ATB only in G1, and an increase of *Anaerovibrio* spp. and Clostridiales ( $P < 0.001$  for both) in CON and *Clostridium XIVa* ( $P = 0.007$ ) in ATB only in G2.

The comparison between CON with ATB at mid feedlot, revealed greater relative abundance of *Clostridium XI* spp., *Clostridium sensu stricto* spp., and *Treponema* spp. ( $P < 0.001$  for all) in ATB than in CON of G1 and *Clostridium XIVa* ( $P = 0.001$ ) only in G2, and lower abundance of

*Bifidobacterium* spp. (P=0.003) in G2. At exit, changes were present only in G2, and consisted of greater abundance of unclassified Clostridiales, Ruminococcaceae, *Clostridium* XIVa (P=0.006, P=0.002 and P=0.008, respectively) and lower abundance of *Anaerovibrio* spp. and *Bifidobacterium* spp. (P<0.001 for both) in ATB than in CON.

### **Population analysis**

The average number of genera found in each group at the different moments, as well as the average of the Chao and Simpson's indexes, estimating respectively richness and diversity are presented in Table 1.

In comparison to arrival, statistical analysis revealed a decrease in richness at mid feedlot and at exit in G1 (P<0.001) and a decrease at exit compared to mid feedlot in G2 (P=0.024). Interestingly, animals from G2 that received virginiamycin did not differ in richness throughout the study, but CON had a less rich community at exit compared to mid feedlot (P<0.001). On the other hand, there was an increase in diversity in both groups (G1 and G2) and treatments (ATB and CON) comparing arrival to mid feedlot (P<0.001 and P=0.002 for G1 and G2, respectively), but a decrease was observed at exit only of G1 (P<0.001). Comparison between CON and ATB at the different moments revealed no differences in richness or diversity.

The similarity between the bacterial community membership and structure, as calculated by the Jaccard and Yue & Clayton indexes are represented in Figures 3 and 4. It is evident from the figures that there was a strong effect of feedlot entry on both, membership and structure, which was further confirmed by statistical comparison (Table 2). As expected, the fecal microbiota was similar between ATB and CON at arrival, but there were significant changes overtime (arrival vs. mid feedlot). There was no statistical difference between mid feedlot and exit in ATB, or in structure in CON of G2. However, membership and structure changed from mid feedlot to exit in ATB and CON of G1.

Interestingly, the effect of virginiamycin administration was evident only in membership at mid feedlot, but not in structure and that finding was consistent among groups (G1 and G2). No effect of treatment with virginiamycin was observed at the time of slaughter.

The microbial membership and structure present in animals with faster weight gain (D66) and in animals that required a longer period of confinement (D116) within G1 revealed no statistical differences when compared by the Parsimony or the AMOVA tests ( $P=0.47$  and  $P=0.041$  for membership and  $P=0.452$  and  $P=0.433$  for structure, respectively).

Classification of samples into enterotypes yielded three distinct clusters among the 143 samples used in this study. “Enterotype I” was comprised predominantly by samples from animals exiting feedlot (32/33), plus one sample from mid feedlot. “Enterotype II” was characteristic of samples collected at mid feedlot, irrespectively to treatment or group (G1: 15 ATB and 14 CON; G2: 9 ATB and 8 CON) along with 16 samples from exit that did not cluster in enterotype I (G1: 3 ATB and 3 CON; G2: 8 ATB and 2 CON). “Enterotype III” was comprised of all samples collected at arrival to the feedlot. The taxonomy of the genera characteristic of each enterotype is presented in Table 3.

The most common genera shared between all animals at arrival (core microbiota) were unclassified Clostridiales, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Firmicutes, Clostridia and *Persicirhabdus* spp. at the phylum level. At mid feedlot, considering both groups, eight main genera were shared between CON and ATB, five of which were also present at arrival (unclassified Clostridiales, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Firmicutes, and unclassified bacteria) plus *Clostridium sensu stricto*, *Roseburia* spp., and *Clostridium* XI. *Clostridium* XIVa was shared only between ATB G1, *Succinivibrio* spp. only between samples from ATB G2, and *Succinivibrio* spp., *Treponema* spp. and *Clostridium* XIVa were shared only between samples from CON G2. Only an unclassified genus of the Lachnospiraceae family was shared between all samples.

Random forest analysis was used to point the most characteristic genera, that would describe changes observed at the different moments of feedlot, but also between treatments. Detailed results are presented in Table 4. Noteworthy was an increase of unclassified Proteobacteria, *Clostridium sensu stricto* spp., *Prevotella* spp., *Succinivibrio* spp., Lachnospiraceae, *Cellulosilyticum* spp., *Bifidobacterium* spp., and *Faecalibacterium* spp. after entrance to the feedlot. On the other hand, *Persicirhabdus* spp., Verrucomicrobiaceae, Firmicutes, Chitinophagaceae, and *Akkermansia* spp. decreased during this period of adaptation.

## **Performance**

Statistical analysis revealed no significant differences in body weight at exit from feedlot between CON and ATB animals ( $P>0.05$ ) (Table 1). The ADG in CON and ATB was respectively 1.02 and 1.16 kg/day for G1 and 1.32 and 1.44 kg/day for G2. No statistical differences were observed between CON and ATB in G1 and G2 ( $P=0.296$  and  $P=0.065$ , respectively).

## **Antimicrobial resistance**

Culture of fecal samples yielded growth of 206 *E. coli* colonies, of which 98 were from samples collected at arrival (CON=50 and ATB=48) and 108 collected at exit (CON=54 and ATB=54). Overall an average of only 2% of isolates from arrival and 0.2% from exit were resistant to one of the antimicrobial agent tested. At arrival, one isolate from ATB and two from CON were resistant to nalidixic acid; four from CON had intermediate resistance to amoxicillin/clavulanic acid; four from CON and one from ATB had intermediate resistance and two from CON and one from ATB were resistant to ampicillin; one from CON was resistant to enrofloxacin; six from CON had intermediate resistance to streptomycin; and two from CON and one from ATB were resistant to tetracycline. Four isolates, three collected at arrival (two from CON and one from ATB) and one at exit (CON), were resistant for both, ampicillin and tetracycline. All isolates were sensitive to aztreonam, cefoxitin, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin and trimethoprim/sulfamethoxazole.

At exit, only one isolate had intermediate resistance and one was resistant against ampicillin, and one was resistant to tetracycline, all isolated from the CON group. There was no significant difference in antimicrobial resistance between animals treated with virginiamycin and the control group at exit, neither was a difference between arrival versus exit ( $P>0.05$ ).

## **DISCUSSION**

The change in management characterized by entrance into a feedlot caused profound changes in membership (the different genera present in an environment) and in structure (the different genera and their evenness) of bacterial communities present in feces of cattle. The changes observed in this study were most likely caused by the change in diet, as the studied animals were moved from a pasture

exclusive diet into a carbohydrate rich diet. Those changes were consistent with other reports in the literature (16, 17). The addition of carbohydrates to the diet of ruminants have been shown to cause changes in ruminal bacteria with consequences in the hindgut, probably due to different byproducts originated by the ruminal microbiota, and to physiological changes, like pH reduction and transit time of the ingesta (17, 35).

Firmicutes, constituted mainly by unclassified Ruminococcaceae and Lachnospiraceae, comprised a large part of the fecal microbiota of studied cattle. Relative abundances found in this study were very similar to the ones reported by Kim et al. (16). The most evident changes in relative abundances caused by feedlot entry were observed in members of the Verrucomicrobia phylum, since this was the second most abundant phylum at arrival, but only the sixth at mid feedlot, largely caused by a decrease in *Akkermansia* spp., *Persisirhabdus* spp., and unclassified Verrucomicrobia and Verrucomicrobiaceae. While it is important to note that the methods used here are more likely to detect members of this phylum, these bacteria have also been reported in forage fed heifers (16). In humans, *Akkermansia muciniphila* was shown to be involved in acetate and propionate production by carbon and nitrogen degradation (36), and it has been associated with health and a higher responsiveness from tissue to insulin (37). In contrast, the increase in relative abundance of Proteobacteria, represented by the *Succinivibrio* genus is consistent with other reports evaluating high levels of carbohydrates in the diet of cattle (17, 38, 39).

The use of virginiamycin in this study was associated with limited change in the fecal microbiota. A lower abundance of *Bifidobacterium* spp. and greater abundance of *Treponema* spp. in ATB were identified at mid feedlot. The former genus has been anecdotally used as a probiotic in pre-weaning calves (40) and its presence in the rumen was correlated with higher milk-fat content (41). *Treponema* spp. have been associated with valerate production in the hindgut (17), and with pectin degradation during ingestion of orange pulp (42). Therefore, the role of those genera in adult cattle deserves further investigation.

Confinement led to an increase in diversity at mid feedlot. Greater richness and diversity have been reported in cattle receiving carbohydrate when compared to forage only diets (15, 16). Although

CON animals from G2 had lower richness at exit, the lack of differences in richness and diversity between CON and ATB is suggestive that this drug, when used as AGP, may not reach sufficient levels to strongly affect richness and diversity of the hindgut microbiota of cattle.

The consequences of virginiamycin used as AGP on the bacterial communities were also investigated. Virginiamycin is one of the most commonly used antibiotics to enhance weight gain in cattle (23, 43). The mechanisms by which those drugs decrease food intake and increase food conversion are still under investigation. In humans, it has been shown that the gut microbiota of obese people follow specific patterns that differ from the ones found in lean individuals (6) and this can be reproduced in laboratory animals by colonizing them with bacteria from obese people (7), suggesting that their bacteria are more efficient in harvesting energy from food. Weight gain and increased fat store have been shown in mice after continuous exposure to low doses of antibiotics, without increasing food intake (44). However, the concept that AGPs increase weight gain has been questioned and it has been suggested that a decrease in dry matter intake (DMI) is actually the main consequence of the use of AGPs, consequently increasing the gain-to-feed ratio (G:F) (23, 24, 43). In fact, there was no difference in weight gain between treated and control animals in this study.

As expected, there were no differences in bacterial membership and structure between treatments (ATB vs. CON) at arrival to the feedlot, since those samples were collected before antimicrobial was started. Interestingly, the effect of virginiamycin administration was evident only in membership, but not in structure of both groups, G1 and G2 at mid feedlot. This is suggestive that the drug had a greater impact on low abundant members of the microbiota (rare species), but not in the more abundant species that comprise the bulk of the microbiota. Also, there was no difference in bacterial community structure from mid feedlot and exit in G2, suggesting that there was full adaptation of the microbiota of that group by 25 days of confinement. The reasons for that are uncertain at this point.

No effect of treatment with virginiamycin was observed at the time of slaughter. Among factors that can change the intestinal microbiota, the use of antimicrobial drugs is one of the most important, as it has been shown in other species (44-46). However, doses used for growth promotion

are lower than therapeutic doses and therefore, the effects of this practice over the distal gut microbiota may not be as evident. Furthermore, the hindgut of bovine has nearly 14% of rumen fermentation capacity (47). After ruminal microbial fermentation, chemical digestion in the abomasum and absorption in the small intestine, less substrate is available to the hindgut microbiota, turning the rumen into an important factor in the modulation of the antimicrobial activity in the distal gut due to degradation of drugs by the ruminal bacteria. Therefore, the consequences of the use of AGPs in the ruminal bacteria deserves further investigation and might reveal changes that are not detectable in feces. While decreased diversity has been reported in chickens (48) no changes were observed after the use of virginiamycin in chicken and pigs (49-51).

In an attempt to identify bacterial genera with potential to increase alimentary performance in the bovine species, the microbiota of animals with a faster weight gain was investigated. Differences in the microbiota of animals with different performance have been reported in chicken (52) and cattle (53). However, no differences in community membership or structure could be identified between the studied animals. That might be due to several factors that can impact weight gain, including dominant behaviour during feeding, gender, different body condition at entrance, and, in this case, due to a small subset of samples and to the subjective assessment adopted to classify body score of animals that were ready to be slaughtered.

The comparison between groups (G1 vs. G2) revealed statistical differences at the different moments (but at arrival) that might be related not only to the diet composition, since G2 received orange pulp as silage, but also to the different time of the year, and therefore, differences in temperature, humidity and rain volume must be considered. This data provides evidences that several factors can impact the intestinal microbiota and caution should be taken when extrapolating results from different studies.

The analysis of the core microbiota revealed that members of the Lachnospiraceae family were the only bacteria shared between all samples. Organisms of this family have been related with health in other species (54, 55), but its importance in the bovine hindgut remains to be investigated. Kim et al. (16) have also found high abundance of unclassified members of this family, and Henderson et al.

(39) observed the presence of Lachnospiraceae as core members in the rumen of cattle worldwide, suggesting that those organisms might be also of importance in the bovine species.

It was surprising the fact the samples collected for this study were classified only into three different enterotypes, as it would be expected that samples would group by time of collection and/or by treatment. Instead, only three enterotypes were evident, with samples from animals receiving antibiotic in G2 at exit being clustered along with animals from mid feedlot. This finding was also evidenced by the Yue and Clayton analysis (Figure 3) and by the statistical comparisons (Table 2), suggesting that their fecal microbiota remained more stable overtime. However, it is difficult to attribute this “stability” to the use of antibiotics since the same trend was not observed in G1. Therefore, the reasons for this find remain uncertain at this point.

Finally, the lack of resistance to several antibiotics tested in the samples collected for this study is suggestive that at these conditions, the use of this drug may not be of public health concern for the development of multidrug resistant bacteria.

## **CONCLUSIONS**

Confinement caused marked changes in composition and structure of fecal microbiota of feedlot cattle. The use of virginiamycin as AGP significantly affected membership of the fecal bacteria of beef cattle suggesting that the antibiotic has a stronger effect on the rare species present in that environment, but not on the most abundant species. The use of virginiamycin as AGP had no effect on antibiotic resistance at the time of slaughtering. Differences between batches are suggestive that variations in study conditions are important, strongly affecting the intestinal microbiota. Therefore, caution should be taken when interpreting and extrapolating results from different studies.

## **Acknowledgements**

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes for financial support, process n. 056/2012.

## REFERENCES

1. QIN, J, LI, R, RAES, J, ARUMUGAM, M, BURGDORF, KS, MANICHANH, C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
2. FRANK, DN, ST AMAND, AL, FELDMAN, RA, BOEDEKER, EC, HARPAZ, N, PACE, NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(34):13780-5.
3. LEY, RE, BÄCKHED, F, TURNBAUGH, P, LOZUPONE, CA, KNIGHT, RD, GORDON, JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-5.
4. WEN, L, LEY, RE, VOLCHKOV, PY, STRANGES, PB, AVANESYAN, L, STONEBRAKER, AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008;455(7216):1109-13.
5. DIAZ HEIJTZ, R, WANG, S, ANUAR, F, QIAN, Y, BJÖRKHOLM, B, SAMUELSSON, A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):3047-52.
6. LEY, RE, TURNBAUGH, PJ, KLEIN, S, GORDON, JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
7. TURNBAUGH, PJ, LEY, RE, MAHOWALD, MA, MAGRINI, V, MARDIS, ER, GORDON, JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
8. STANLEY, D, DENMAN, SE, HUGHES, RJ, GEIER, MS, CROWLEY, TM, CHEN, H, et al. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;96(5):1361-9.
9. CARBERRY, CA, KENNY, DA, HAN, S, MCCABE, MS, WATERS, SM. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(14):4949-58.
10. OIKONOMOU, G, TEIXEIRA, AG, FODITSCH, C, BICALHO, ML, MACHADO, VS, BICALHO, RC. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium species with health and growth. *PLoS One*. 2013;8(4):e63157.
11. MONIRA, S, NAKAMURA, S, GOTOH, K, IZUTSU, K, WATANABE, H, ALAM, NH, et al. Gut microbiota of healthy and malnourished children in bangladesh. *Front Microbiol*. 2011;2:228.
12. MORGAN, XC, TICKLE, TL, SOKOL, H, GEVERS, D, DEVANEY, KL, WARD, DV, et al. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol*. 2012;13(9):R79.
13. ROUSSEAU, C, LEVENEZ, F, FOUQUERAY, C, DORÉ, J, COLLIGNON, A, LEPAGE, P. Clostridium difficile colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):858-65.
14. RUSSELL, SL, GOLD, MJ, WILLING, BP, THORSON, L, MCNAGNY, KM, FINLAY, BB. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. *Gut Microbes*. 2013;4(2):158-64.
15. SHANKS, OC, KELTY, CA, ARCHIBEQUE, S, JENKINS, M, NEWTON, RJ, MCLELLAN, SL, et al. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(9):2992-3001.
16. KIM, M, KIM, J, KUEHN, LA, BONO, JL, BERRY, ED, KALCHAYANAND, N, et al. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. *J Anim Sci*. 2014;92(2):683-94.
17. MAO, S, ZHANG, R, WANG, D, ZHU, W. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC Vet Res*. 2012;8:237.
18. COE, ML, NAGARAJA, TG, SUN, YD, WALLACE, N, TOWNE, EG, KEMP, KE, et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J Anim Sci*. 1999;77(8):2259-68.
19. MEYER, NF, ERICKSON, GE, KLOPFENSTEIN, TJ, BENTON, JR, LUEBBE, MK, LAUDERT, SB. Effects of monensin and tylosin in finishing diets containing corn wet distillers grains with solubles

- with differing corn processing methods. *J Anim Sci.* 2013;91(5):2219-28.
20. MEYER, NF, ERICKSON, GE, KLOPFENSTEIN, TJ, GREENQUIST, MA, LUEBBE, MK, WILLIAMS, P, et al. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *J Anim Sci.* 2009;87(7):2346-54.
21. GOLDER, HM, CELI, P, RABIEE, AR, LEAN, IJ. Effects of feed additives on rumen and blood profiles during a starch and fructose challenge. *J Dairy Sci.* 2014;97(2):985-1004.
22. WEESE, JS, GIGUÈRE, S, GUARDABASSI, L, MORLEY, PS, PAPICH, M, RICCIUTO, DR, et al. ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *J Vet Intern Med.* 2015;29(2):487-98.
23. ROGERS, JA, BRANINE, ME, MILLER, CR, WRAY, MI, BARTLE, SJ, PRESTON, RL, et al. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abscess incidence in feedlot cattle. *J Anim Sci.* 1995;73(1):9-20.
24. SALINAS-CHAVIRA, J, LENIN, J, PONCE, E, SANCHEZ, U, TORRENTERA, N, ZINN, RA. Comparative effects of virginiamycin supplementation on characteristics of growth-performance, dietary energetics, and digestion of calf-fed Holstein steers. *J Anim Sci.* 2009;87(12):4101-8.
25. IVES, SE, TITGEMEYER, EC, NAGARAJA, TG, DEL BARRIO, A, BINDEL, DJ, HOLLIS, LC. Effects of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed. *J Anim Sci.* 2002;80(11):3005-15.
26. TOLEDO, MRF, FONTES, CF, TRABULSI, LR. EPM - a modification of Rugai and Araujo medium for simultaneous test of gas production from glucose, H<sub>2</sub>S, urease and tryptophan deaminase. *Rev Microbiol.* 1982;13:309-15.
27. TOLEDO, MRF, FONTES, CF, TRABULSI, LR. MILi - a medium for detection of motility, indole and lysine decarboxylase. *Rev Microbiol.* 1982;12:230-5.
28. EWING, WH. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.* New York: Elsevier Science Publishing Company; 1986. 536 p.
29. CLSI, editor *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals Approved Standard.* Approved Standard, M31-A3, third ed vol third ed CLSI M31-A3; 2008; Wayne, PA, USA.
30. CLSI, editor *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.* Approved Standard, M07-A9, ninth ed, CLSI; 2012; Wayne, PA, USA.
31. KLINDWORTH, A, PRUESSE, E, SCHWEER, T, PEPLIES, J, QUAIST, C, HORN, M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(1):e1.
32. KOZICH, JJ, WESTCOTT, SL, BAXTER, NT, HIGHLANDER, SK, SCHLOSS, PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(17):5112-20.
33. COLE, JR, WANG, Q, FISH, JA, CHAI, B, MCGARRELL, DM, SUN, Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D633-42.
34. YUE, JC, CLAYTON, MK. A similarity measure based on species proportions. *Communications in Statistics - Theory and Methods.* 2005;34:2123-31.
35. METZLER-ZEBELI, BU, SCHMITZ-ESSER, S, KLEVENHUSEN, F, PODSTATZKY-LICHTENSTEIN, L, WAGNER, M, ZEBELI, Q. Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. *Anaerobe.* 2013;20:65-73.
36. DERRIEN, M, VAUGHAN, EE, PLUGGE, CM, DE VOS, WM. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(Pt 5):1469-76.
37. DAO, MC, EVERARD, A, ARON-WISNEWSKY, J, SOKOLOVSKA, N, PRIFTI, E, VERGER, EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut.* 2015.
38. PETRI, RM, SCHWAIGER, T, PENNER, GB, BEAUCHEMIN, KA, FORSTER, RJ, MCKINNON, JJ, et al. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. *PLoS One.* 2013;8(12):e83424.

39. HENDERSON, G, COX, F, GANESH, S, JONKER, A, YOUNG, W, JANSSEN, PH, et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci Rep*. 2015;5:14567.
40. UYENO, Y, SHIGEMORI, S, SHIMOSATO, T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ*. 2015;30(2):126-32.
41. JAMI, E, WHITE, BA, MIZRAHI, I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS One*. 2014;9(1):e85423.
42. LIU, J, WANG, JK, ZHU, W, PU, YY, GUAN, LL, LIU, JX. Monitoring the rumen pectinolytic bacteria *Treponema saccharophilum* using real-time PCR. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;87(3):576-85.
43. NUÑEZ, AJC, CAETANO, M, BERNDT, A, DEMARCHI, JJADA, LEME, PR, LANNA, DPD. Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nellore steers fed high concentrate diets. *Scientia Agricola* 2013. p. 229-36.
44. CHO, I, YAMANISHI, S, COX, L, METHÉ, BA, ZAVADIL, J, LI, K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012;488(7413):621-6.
45. COSTA, MC, STÄMPFLI, HR, ARROYO, LG, ALLEN-VERCOE, E, GOMES, RG, WEESE, JS. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Vet Res*. 2015;11:19.
46. CHAMBERS, L, YANG, Y, LITTIER, H, RAY, P, ZHANG, T, PRUDEN, A, et al. Metagenomic Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Dairy Cow Feces following Therapeutic Administration of Third Generation Cephalosporin. *PLoS One*. 2015;10(8):e0133764.
47. GRESSLEY, TF, HALL, MB, ARMENTANO, LE. Ruminant Nutrition Symposium: Productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants. *J Anim Sci*. 2011;89(4):1120-30.
48. NEUMANN, AP, SUEN, G. Differences in major bacterial populations in the intestines of mature broilers after feeding virginiamycin or bacitracin methylene disalicylate. *J Appl Microbiol*. 2015.
49. DANZEISEN, JL, KIM, HB, ISAACSON, RE, TU, ZJ, JOHNSON, TJ. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS One*. 2011;6(11):e27949.
50. POURABEDIN, M, GUAN, L, ZHAO, X. Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. *Microbiome*. 2015;3:15.
51. KALMOKOFF, M, WADDINGTON, LM, THOMAS, M, LIANG, KL, MA, C, TOPP, E, et al. Continuous feeding of antimicrobial growth promoters to commercial swine during the growing/finishing phase does not modify faecal community erythromycin resistance or community structure. *J Appl Microbiol*. 2011;110(6):1414-25.
52. SINGH, KM, SHAH, T, DESHPANDE, S, JAKHESARA, SJ, KORINGA, PG, RANK, DN, et al. High throughput 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Mol Biol Rep*. 2012;39(12):10595-602.
53. MYER, PR, WELLS, JE, SMITH, TP, KUEHN, LA, FREETLY, HC. Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. *Springerplus*. 2015;4:454.
54. COSTA, MC, ARROYO, LG, ALLEN-VERCOE, E, STÄMPFLI, HR, KIM, PT, STURGEON, A, et al. Comparison of the fecal microbiota of healthy horses and horses with colitis by high throughput sequencing of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene. *PLoS One*. 2012;7(7):e41484.
55. HONNEFFER, JB, MINAMOTO, Y, SUCHODOLSKI, JS. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World J Gastroenterol*. 2014;20(44):16489-97.

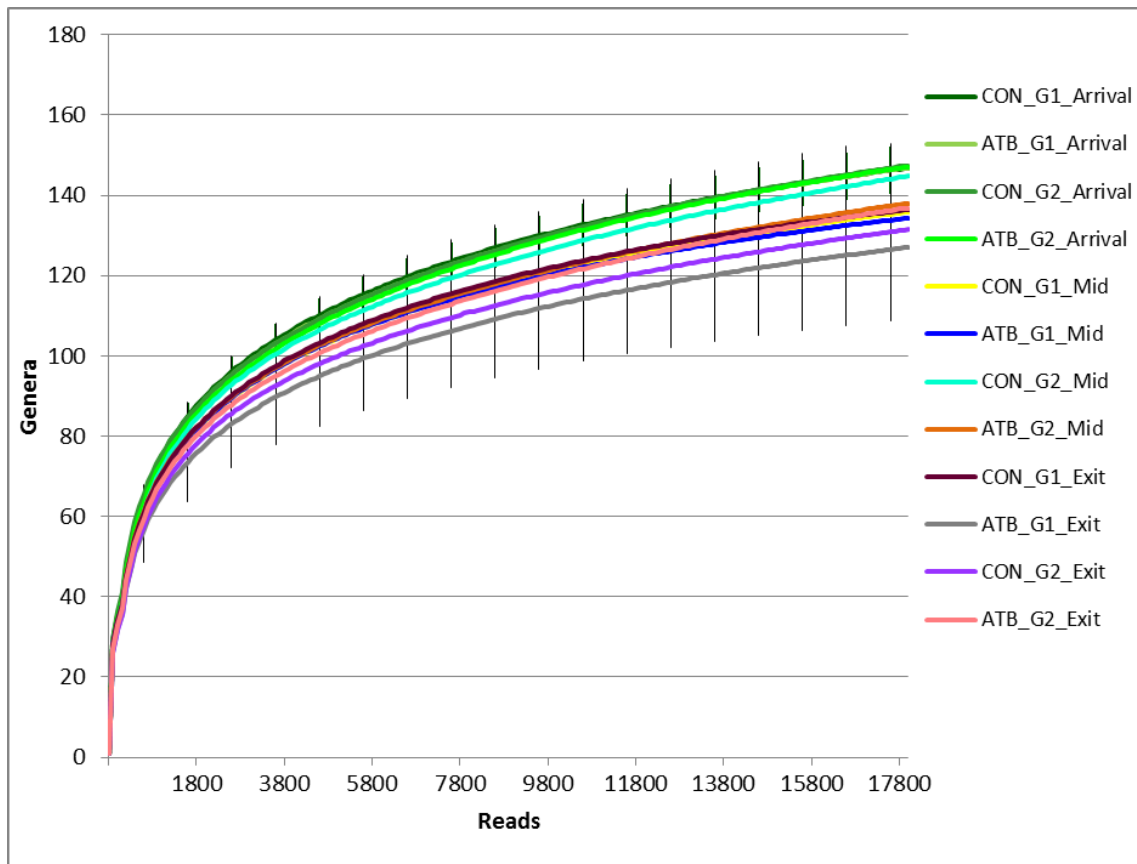


Figure 1 - Rarefaction curves representing the mean number of genera per number of reads found in feces of cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid period and exit from a feedlot operation at two different groups (G1 and G2).

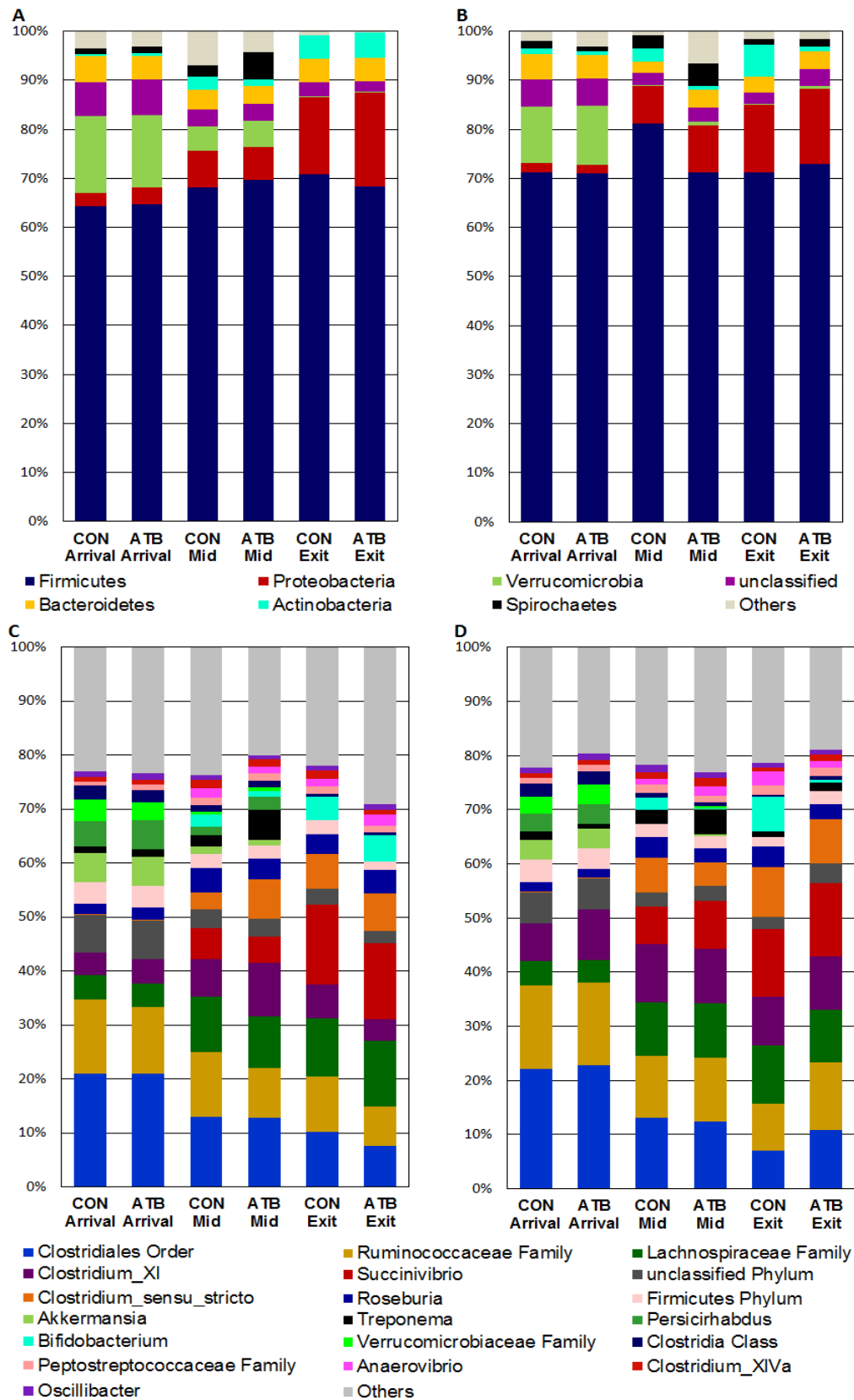


Figure 2 - Relative abundances of bacterial communities found in feces of two groups of cattle (G1 and G2) receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit. A and B: G1 and G2 at the phylum level, respectively; C and D: G1 and G2 at the genus level, respectively.

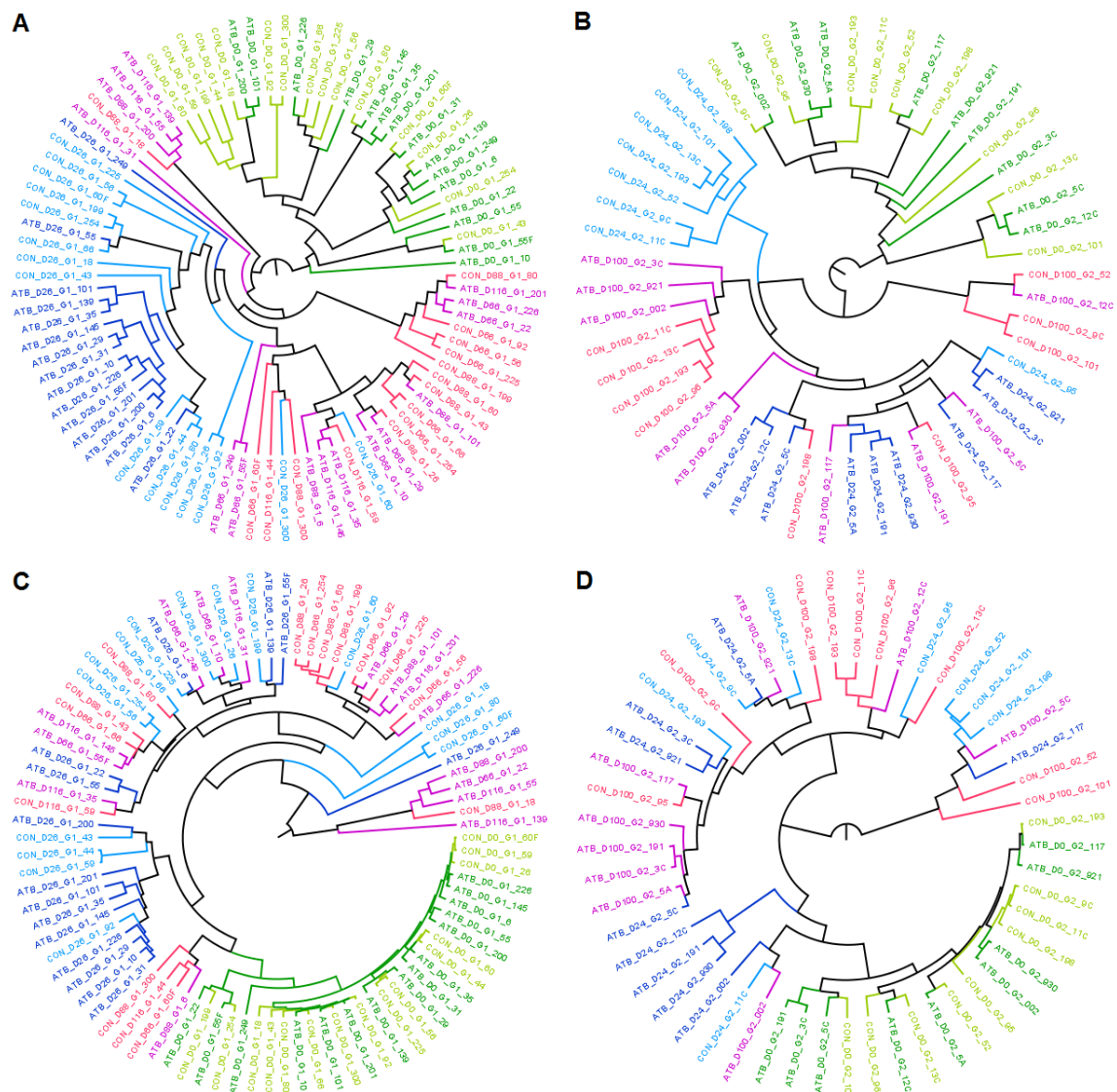


Figure 3 - Dendrograms representing the similarity between membership (Jaccard) and structure (Yue & Clayton) of bacterial communities found in feces of cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit in two groups (G1 and G2). **A** and **B**: membership in samples from G1 and G2, respectively; **C** and **D**: structure in samples from G1 and G2, respectively. Colors identify the moment of sampling and treatment, CON Arrival: light green; ATB Arrival: green; CON Mid: light blue; ATB Mid: blue; CON Exit: red and ATB Exit: purple.

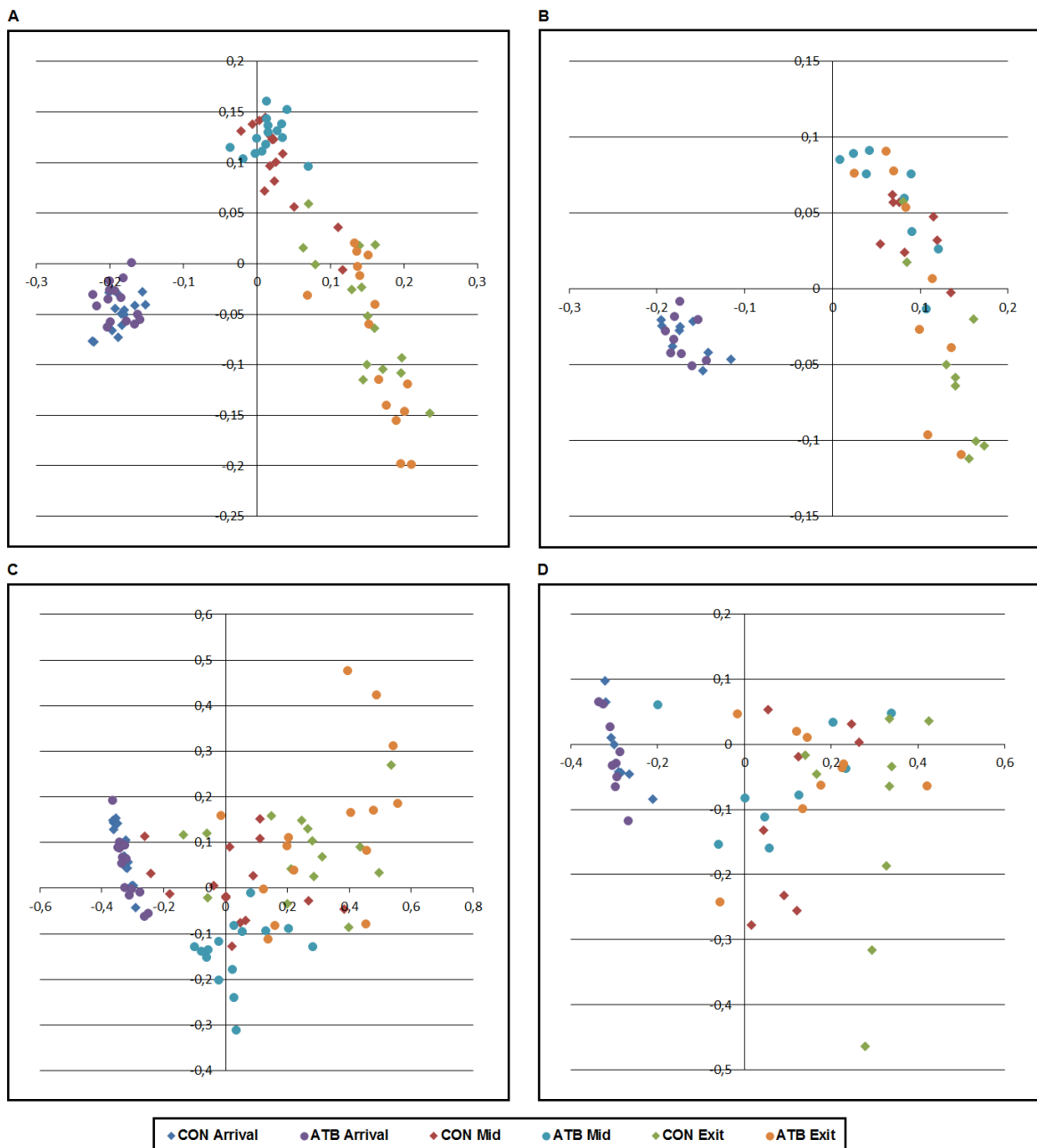


Figure 4 – Principal cCoordinate Aanalysis (PCoA) representing the dissimilarity between membership (Jaccard) and structure (Yue & Clayton) of microbial communities in feces of feedlot cattle fed with ratio containing virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit in two groups (G1 and G2). **A** and **B**: bacterial membership in samples from G1 and G2, respectively; **C** and **D**: community structure in samples from G1 and G2, respectively.

Table 1. Mean number of different genera, richness (Chao) and diversity (Simpson) indexes and average body weight (kg) with standard deviations (SD) found in beef cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit.

<b>Sample</b>	<b># Genera (SD)</b>	<b>Chao (SD)</b>	<b>Simpson (SD)</b>	<b>Body weight (SD)</b>
<b>Group 1</b>				
CON – Arrival	146.76 (5.95)	168.79 (9.73)	11.54 (0.70)	338.00 (35.70)
ATB – Arrival	146.86 (7.84)	171.75 (10.09)	12.07 (1.00)	335.67 (27.64)
CON – Mid	135.82 (8.01)	160.19 (15.07)	13.60 (2.16)	
ATB – Mid	134.29 (6.16)	153.15 (11.00)	14.67 (1.27)	
CON – Exit	136.31 (7.81)	153.98 (12.59)	12.83 (1.79)	426.00 (64.34)
ATB – Exit	126.96 (17.78)	149.08 (23.64)	11.80 (2.69)	441.33 (58.51)
<b>Group 2</b>				
CON – Arrival	147.29 (5.57)	174.68 (6.66)	10.68 (1.04)	347.22 (13.72)
ATB – Arrival	147.15 (7.00)	175.03 (9.16)	10.34 (0.64)	337.78 (14.60)
CON – Mid	143.65 (8.92)	179.32 (13.66)	12.26 (0.54)	
ATB – Mid	137.97 (4.45)	173.12 (9.38)	12.59 (1.05)	
CON – Exit	131.55 (4.23)	164.42 (9.72)	12.67 (2.35)	481.67 (24.49)
ATB – Exit	136.78 (7.42)	174.10 (12.62)	12.64 (1.19)	479.78 (17.01)

Table 2. Results of P values obtained from statistical comparison of bacterial membership (Jaccard) and structure (Yue & Clayton) present in feces of beef cattle receiving virginiamycin (ATB) or not (CON) at arrival, mid feedlot and exit.

	<b>Group 1</b>		<b>Group 2</b>	
	Yue & Clayton	Jaccard	Yue & Clayton	Jaccard
	<b>Parsimony</b>			
ATB - Arrival x Middle	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ATB - Arrival x Exit	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ATB - Middle x Exit	<0.001	<0.001	0.561	0.054
CON - Arrival x Middle	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CON - Arrival x Exit	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CON - Middle x Exit	0.029	<0.001	0.322	<0.001
ARRIVAL - ATB x CON	0.256	0.282	0.858	0.864
MID - ATB x CON	0.122	<0.001	0.691	<0.001
EXIT - ATB x CON	0.289	0.265	0.557	0.220
	<b>AMOVA</b>			
	Yue & Clayton	Jaccard	Yue & Clayton	Jaccard
ATB - Arrival x Middle	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ATB - Arrival x Exit	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
ATB - Middle x Exit	<0.001	<0.001	0.203	0.018
CON - Arrival x Middle	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CON - Arrival x Exit	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CON - Middle x Exit	0.002	<0.001	0.099	<0.001
ARRIVAL - ATB x CON	0.123	0.515	0.242	0.932
MID - ATB x CON	<0.001	<0.001	0.209	<0.001
EXIT - ATB x CON	0.246	0.012	0.007	0.029

Table 3. Main genera constituting each enterotype found in feedlot cattle.

---

<b>COMMUNITY TYPE</b>	
<b>Enterotype I</b>	<b>%</b>
<i>Succinivibrio</i> spp.	14,71
Lachnospiraceae	11,23
Clostridiales	6,88
Ruminococcaceae	6,73
<i>Clostridium sensu stricto</i> spp.	6,32
<i>Clostridium XI</i> spp.	5,36
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,73
<i>Roseburia</i>	4,09
<b>Enterotype II</b>	
Clostridiales	12,8
Ruminococcaceae	11,28
Lachnospiraceae	9,87
<i>Clostridium XI</i> spp.	8,85
<i>Succinivibrio</i> spp.	6,3
<i>Clostridium sensu stricto</i> spp.	5,24
<i>Roseburia</i> spp.	3,45
Unclassified phylum	3,2
<b>Enterotype III</b>	
Clostridiales	21,12
Ruminococcaceae	13,96
Unclassified phylum	6,62
<i>Clostridium XI</i> spp.	4,84
Lachnospiraceae	4,45
<i>Persicirhabdus</i> spp.	4,42
<i>Akkermansia</i> spp.	4,39
Firmicutes	3,94
Verrucomicrobiaceae	3,39

---

Table 4. Mean decrease accuracy (MDA) of the main genera responsible for differences in fecal samples from feedlot cattle.

---

<b>CLASSIFY</b>	
<b>Taxonomy</b>	<b>MDA</b>
Proteobacteria	0,55
<i>Clostridium sensu stricto</i> spp.	0,54
<i>Prevotella</i> spp.	0,5
<i>Succinivibrio</i> spp.	0,49
<i>Persicirhabdus</i> spp.	0,42
Lachnospiraceae	0,42
<i>Cellulosilyticum</i> spp.	0,41
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0,37
Verrucomicrobiaceae	0,35
<i>Faecalibacterium</i> spp.	0,35
Firmicutes	0,34
Chitinophagaceae	0,32
<i>Akkermansia</i> spp.	0,3

---

## 5 CONCLUSÕES

Houve mudanças significativas na composição e na diversidade da microbiota fecal de bovinos ao longo do confinamento, provavelmente causadas pela introdução de carboidratos na dieta.

A virginiamicina utilizada como antimicrobiano promotor de crescimento afetou a composição, mas não a estrutura da microbiota intestinal, sugerindo que o efeito do antibiótico é mais evidente nas espécies menos abundantes.

A virginiamicina utilizada como antimicrobiano promotor de crescimento não alterou a incidência de resistência a antibióticos em *Escherichia coli* isoladas das fezes de bovinos.

Diferenças entre os grupos G1 e G2 demonstram que as condições no desenvolvimento do estudo são importantes e podem afetar a microbiota intestinal. Portanto, a interpretação e extrapolação de resultados de diferentes estudos, devem ser realizadas com cautela.

## 6 PERSPECTIVAS

As importantes contribuições do presente trabalho no entendimento da dinâmica das comunidades microbianas presentes no intestino de bovinos de corte abrem um novo horizonte de estudos.

Novas pesquisas são necessárias para identificar as alterações que a mudança da dieta provoca no ambiente ruminal em curto período.

Existe a necessidade de estudos sobre o uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação dos bovinos e de como eles podem modificar as comunidades microbianas ruminais.

Além disso, o impacto das alterações que ocorrem nas comunidades microbianas do rúmen sobre a microbiota presente nas porções mais distais do trato gastrointestinal dos bovinos ainda merece maiores esclarecimentos.

## REFERÊNCIAS

AZAD, M. B.; BRIDGMAN, S. L.; BECKER, A. B.; KOZYRSKYJ, A. L. Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. **Int J Obes (Lond)**, v. 38, n. 10, p. 1290-1298, Oct 2014. ISSN 1476-5497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25012772> >.

AZAD, M. B.; KONYA, T.; MAUGHAN, H.; GUTTMAN, D. S.; FIELD, C. J.; CHARI, R. S.; SEARS, M. R.; BECKER, A. B.; SCOTT, J. A.; KOZYRSKYJ, A. L.; INVESTIGATORS, C. S. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. **CMAJ**, v. 185, n. 5, p. 385-394, Mar 2013a. ISSN 1488-2329. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401405> >.

AZAD, M. B.; KONYA, T.; MAUGHAN, H.; GUTTMAN, D. S.; FIELD, C. J.; SEARS, M. R.; BECKER, A. B.; SCOTT, J. A.; KOZYRSKYJ, A. L. Infant gut microbiota and the hygiene hypothesis of allergic disease: impact of household pets and siblings on microbiota composition and diversity. **Allergy Asthma Clin Immunol**, v. 9, n. 1, p. 15, 2013b. ISSN 1710-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607879> >.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, Nov 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15505215> >.

BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1915-1920, Mar 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790844> >.

BENTLEY, D. R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SWERDLOW, H. P.; SMITH, G. P.; MILTON, J.; BROWN, C. G.; HALL, K. P.; EVERS, D. J.; BARNES, C. L.; BIGNELL, H. R.; BOUTELL, J. M.; BRYANT, J.; CARTER, R. J.; KEIRA CHEETHAM, R.; COX, A. J.; ELLIS, D. J.; FLATBUSH, M. R.; GORMLEY, N. A.; HUMPHRAY, S. J.; IRVING, L. J.; KARBELASHVILI, M. S.; KIRK, S. M.; LI, H.; LIU, X.; MAISINGER, K. S.; MURRAY, L. J.; OBRADOVIC, B.; OST, T.; PARKINSON, M. L.; PRATT, M. R.; RASOLONJATOVO, I. M.; REED, M. T.; RIGATTI, R.; RODIGHIERO, C.; ROSS, M. T.; SABOT, A.; SANKAR, S. V.; SCALLY, A.; SCHROTH, G. P.; SMITH, M. E.; SMITH, V. P.; SPIRIDOU, A.; TORRANCE, P. E.; TZONEV, S. S.; VERMAAS, E. H.; WALTER, K.; WU, X.; ZHANG, L.; ALAM, M. D.; ANASTASI, C.; ANIEBO, I. C.; BAILEY, D. M.; BANCARZ, I. R.; BANERJEE, S.; BARBOUR, S. G.; BAYBAYAN, P. A.; BENOIT, V. A.; BENSON, K. F.; BEVIS, C.; BLACK, P. J.; BOODHUN, A.; BRENNAN, J. S.; BRIDGHAM, J. A.; BROWN, R. C.; BROWN, A. A.; BUERMANN, D. H.; BUNDU, A. A.; BURROWS, J. C.; CARTER, N. P.; CASTILLO, N.; CHIARA E CATENAZZI, M.; CHANG, S.; NEIL COOLEY, R.; CRAKE, N. R.; DADA, O. O.; DIAKOUMAKOS, K. D.; DOMINGUEZ-FERNANDEZ, B.; EARNSHAW, D. J.; EGBUJOR, U. C.; ELMORE, D. W.; ETCHIN, S. S.; EWAN, M. R.; FEDURCO, M.; FRASER, L. J.; FUENTES FAJARDO, K. V.; SCOTT FUREY, W.; GEORGE, D.;

GIETZEN, K. J.; GODDARD, C. P.; GOLDA, G. S.; GRANIERI, P. A.; GREEN, D. E.; GUSTAFSON, D. L.; HANSEN, N. F.; HARNISH, K.; HAUDENSCHILD, C. D.; HEYER, N. I.; HIMS, M. M.; HO, J. T.; HORGAN, A. M.; HOSCHLER, K.; HURWITZ, S.; IVANOV, D. V.; JOHNSON, M. Q.; JAMES, T.; HUW JONES, T. A.; KANG, G. D.; KERELSKA, T. H.; KERSEY, A. D.; KHREBTUKOVA, I.; KINDWALL, A. P.; KINGSBURY, Z.; KOKKO-GONZALES, P. I.; KUMAR, A.; LAURENT, M. A.; LAWLEY, C. T.; LEE, S. E.; LEE, X.; LIAO, A. K.; LOCH, J. A.; LOK, M.; LUO, S.; MAMMEN, R. M.; MARTIN, J. W.; MCCAULEY, P. G.; MCNITT, P.; MEHTA, P.; MOON, K. W.; MULLENS, J. W.; NEWINGTON, T.; NING, Z.; LING NG, B.; NOVO, S. M.; O'NEILL, M. J.; OSBORNE, M. A.; OSNOWSKI, A.; OSTADAN, O.; PARASCHOS, L. L.; PICKERING, L.; PIKE, A. C.; CHRIS PINKARD, D.; PLISKIN, D. P.; PODHASKY, J.; QUIJANO, V. J.; RACZY, C.; RAE, V. H.; RAWLINGS, S. R.; CHIVA RODRIGUEZ, A.; ROE, P. M.; ROGERS, J.; ROBERT BACIGALUPO, M. C.; ROMANOV, N.; ROMIEU, A.; ROTH, R. K.; ROURKE, N. J.; RUEDIGER, S. T.; RUSMAN, E.; SANCHES-KUIPER, R. M.; SCHENKER, M. R.; SEOANE, J. M.; SHAW, R. J.; SHIVER, M. K.; SHORT, S. W.; SIZTO, N. L.; SLUIS, J. P.; SMITH, M. A.; ERNEST SOHNA SOHNA, J.; SPENCE, E. J.; STEVENS, K.; SUTTON, N.; SZAJKOWSKI, L.; TREGIDGO, C. L.; TURCATTI, G.; VANDEVONDELE, S.; VERHOVSKY, Y.; VIRK, S. M.; WAKELIN, S.; WALCOTT, G. C.; WANG, J.; WORSLEY, G. J.; YAN, J.; YAU, L.; ZUERLEIN, M.; MULLIKIN, J. C.; HURLES, M. E.; MCCOOKE, N. J.; WEST, J. S.; OAKS, F. L.; LUNDBERG, P. L.; KLENERMAN, D.; DURBIN, R.; SMITH, A. J. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 53-59, Nov 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987734> >.

BERCIK, P.; PARK, A. J.; SINCLAIR, D.; KHOSHDEL, A.; LU, J.; HUANG, X.; DENG, Y.; BLENNERHASSETT, P. A.; FAHNESTOCK, M.; MOINE, D.; BERGER, B.; HUIZINGA, J. D.; KUNZE, W.; MCLEAN, P. G.; BERGONZELLI, G. E.; COLLINS, S. M.; VERDU, E. F. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. **Neurogastroenterol Motil**, v. 23, n. 12, p. 1132-1139, Dec 2011. ISSN 1365-2982. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21988661> >.

BROWN, H.; BING, R. F.; GRUETER, H. P.; MCASKILL, J. W.; COOLEY, C. O.; RATHMACHER, R. P. Tylosin and chlortetracycline for the prevention of liver abscesses, improved weight gains and feed efficiency in feedlot cattle. **J Anim Sci**, v. 40, n. 2, p. 207-213, Feb 1975. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1116959> >.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 2, p. 175-188, Apr 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692092> >.

CHANG, Q.; WANG, W.; REGEV-YOCHAY, G.; LIPSITCH, M.; HANAGE, W. P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evol Appl**, v. 8, n. 3, p. 240-247, Mar 2015. ISSN 1752-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25861382> >.

CHAO, A.; CHAZDON, R. L.; COLWELL, R. K.; SHEN, T. J. A new statistical

approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. **Ecology Letters**, v. 8, p. 148-159, 2005. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/wo11/doi/10.1111/j.1461-0248.2004.00707.x/full> >.

CHEN, J.; FLUHARTY, F. L.; ST-PIERRE, N.; MORRISON, M.; YU, Z. Technical note: Occurrence in fecal microbiota of genes conferring resistance to both macrolide-lincosamide-streptogramin B and tetracyclines concomitant with feeding of beef cattle with tylosin. **J Anim Sci**, v. 86, n. 9, p. 2385-2391, Sep 2008. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18469042> >.

CHO, I.; YAMANISHI, S.; COX, L.; METHÉ, B. A.; ZAVADIL, J.; LI, K.; GAO, Z.; MAHANA, D.; RAJU, K.; TEITLER, I.; LI, H.; ALEKSEYENKO, A. V.; BLASER, M. J. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 621-626, Aug 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914093> >.

CLAYTON, E. H.; LEAN, I. J.; ROWE, J. B.; COX, J. W. Effects of feeding virginiamycin and sodium bicarbonate to grazing lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 7, p. 1545-1554, Jul 1999. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10416170> >.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; SUN, Y. D.; WALLACE, N.; TOWNE, E. G.; KEMP, K. E.; HUTCHESON, J. P. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. **J Anim Sci**, v. 77, n. 8, p. 2259-2268, Aug 1999. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462007> >.

CONSORTIUM, H. M. P. A framework for human microbiome research. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 215-221, Jun 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699610> >.

CREEVEY, C. J.; KELLY, W. J.; HENDERSON, G.; LEAHY, S. C. Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. **Microb Biotechnol**, v. 7, n. 5, p. 467-479, Sep 2014. ISSN 1751-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24986151> >.

DANZEISEN, J. L.; KIM, H. B.; ISAACSON, R. E.; TU, Z. J.; JOHNSON, T. J. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27949, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114729> >.

DERRIEN, M.; VAUGHAN, E. E.; PLUGGE, C. M.; DE VOS, W. M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, n. Pt 5, p. 1469-1476, Sep 2004. ISSN 1466-5026. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388697> >.

DIAZ HEIJTZ, R.; WANG, S.; ANUAR, F.; QIAN, Y.; BJÖRKHOLM, B.; SAMUELSSON, A.; HIBBERD, M. L.; FORSSBERG, H.; PETTERSSON, S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proc Natl Acad Sci U S**

A, v. 108, n. 7, p. 3047-3052, Feb 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282636> >.

DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; COSTELLO, E. K.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 26, p. 11971-11975, Jun 2010. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20566857> >.

DURSO, L. M.; HARHAY, G. P.; SMITH, T. P.; BONO, J. L.; DESANTIS, T. Z.; HARHAY, D. M.; ANDERSEN, G. L.; KEEN, J. E.; LAEGREID, W. W.; CLAWSON, M. L. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 14, p. 4858-4862, Jul 2010. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472731> >.

ECKBURG, P. B.; BIK, E. M.; BERNSTEIN, C. N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S. R.; NELSON, K. E.; RELMAN, D. A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, Jun 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831718> >.

EDRINGTON, T. S.; BISCHOFF, K. M.; LONERAGAN, G. H.; NISBET, D. J. Evaluation of feeding distiller's grains, containing virginiamycin, on antimicrobial susceptibilities in fecal isolates of Enterococcus and Escherichia coli and prevalence of resistance genes in cattle. **J Anim Sci**, v. 92, n. 3, p. 1144-1149, Mar 2014. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24492576> >.

EDRINGTON, T. S.; DOWD, S. E.; FARROW, R. F.; HAGEVOORT, G. R.; CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; NISBET, D. J. Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. **J Dairy Sci**, v. 95, n. 8, p. 4519-4525, Aug 2012. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22818466> >.

EDWARDS, R. A.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; WEGLEY, L.; HAYNES, M.; BREITBART, M.; PETERSON, D. M.; SAAR, M. O.; ALEXANDER, S.; ALEXANDER, E. C.; ROHWER, F. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. **BMC Genomics**, v. 7, p. 57, 2006. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549033> >.

ERASMUS, L. J.; MUJA, C.; ERASMUS, S.; COERTZE, R. F.; CATTON, D. G. Effect of virginiamycin and monensin supplementation on performance of multiparous Holstein cows. **Livestock Science**, v. 119, n. 1, p. 107-115, 2008. ISSN 1871-1413. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2008.03.005> >. Acesso em: 2016/02/03.

FEIGHNER, S. D.; DASHKEVICZ, M. P. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. **Appl Environ Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 331-336, Feb 1987. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3566269> >.

FINEGOLD, S. M.; DOWD, S. E.; GONTCHAROVA, V.; LIU, C.; HENLEY, K. E.;

WOLCOTT, R. D.; YOUN, E.; SUMMANEN, P. H.; GRANPEESHEH, D.; DIXON, D.; LIU, M.; MOLITORIS, D. R.; GREEN, J. A. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. **Anaerobe**, v. 16, n. 4, p. 444-453, Aug 2010. ISSN 1095-8274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603222> >.

GALLO, G. F.; BERG, J. L. Efficacy of a feed-additive antibacterial combination for improving feedlot cattle performance and health. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 36, n. 4, p. 223-229, 1995. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686940/> >.

GOLDER, H. M.; CELI, P.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. Effects of feed additives on rumen and blood profiles during a starch and fructose challenge. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 2, p. 985-1004, Feb 2014. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210482> >.

GRESSLEY, T. F.; HALL, M. B.; ARMENTANO, L. E. Ruminant Nutrition Symposium: Productivity, digestion, and health responses to hindgut acidosis in ruminants. **J Anim Sci**, v. 89, n. 4, p. 1120-1130, Apr 2011. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415422> >.

HACKMANN, T. J.; SPAIN, J. N. Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 4, p. 1320-1334, Apr 2010. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20338409> >.

HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; JANSSEN, P. H.; COLLABORATORS, G. R. C. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Sci Rep**, v. 5, p. 14567, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26449758> >.

HENDERSON, G.; COX, F.; KITTELMANN, S.; MIRI, V. H.; ZETHOF, M.; NOEL, S. J.; WAGHORN, G. C.; JANSSEN, P. H. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74787, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24040342> >.

HOLMAN, D. B.; CHÉNIER, M. R. Temporal changes and the effect of subtherapeutic concentrations of antibiotics in the gut microbiota of swine. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 90, n. 3, p. 599-608, Dec 2014. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187398> >.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1115-1118, May 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352068> >.

HOOPER, L. V.; WONG, M. H.; THELIN, A.; HANSSON, L.; FALK, P. G.; GORDON, J. I. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 881-884, Feb 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157169> >.

ILLUMINA. High-speed, multiplexed 16S microbial sequencing on MiSeq System. **Illumina**, 2014. Disponível em: < <http://www.illumina.com/systems/miseq.html> >. Acesso em: 27 MAR 2015.

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A.; MIZRAHI, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **ISME J**, v. 7, n. 6, p. 1069-1079, Jun 2013. ISSN 1751-7370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23426008> >.

JAMI, E.; WHITE, B. A.; MIZRAHI, I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85423, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465556> >.

KÄÄRIÖ, H.; HUTTUNEN, K.; KARVONEN, A. M.; SCHAUB, B.; VON MUTIUS, E.; PEKKANEN, J.; HIRVONEN, M. R.; ROPONEN, M. Exposure to a farm environment is associated with T helper 1 and regulatory cytokines at age 4.5 years. **Clin Exp Allergy**, v. 46, n. 1, p. 71-77, Jan 2016. ISSN 1365-2222. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362849> >.

KALMOKOFF, M.; WADDINGTON, L. M.; THOMAS, M.; LIANG, K. L.; MA, C.; TOPP, E.; DANDURAND, U. D.; LETELLIER, A.; MATIAS, F.; BROOKS, S. P. Continuous feeding of antimicrobial growth promoters to commercial swine during the growing/finishing phase does not modify faecal community erythromycin resistance or community structure. **J Appl Microbiol**, v. 110, n. 6, p. 1414-1425, Jun 2011. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395944> >.

KAU, A. L.; AHERN, P. P.; GRIFFIN, N. W.; GOODMAN, A. L.; GORDON, J. I. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 327-336, Jun 2011. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677749> >.

KIM, M.; KIM, J.; KUEHN, L. A.; BONO, J. L.; BERRY, E. D.; KALCHAYANAND, N.; FREETLY, H. C.; BENSON, A. K.; WELLS, J. E. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. **J Anim Sci**, v. 92, n. 2, p. 683-694, Feb 2014. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24352967> >.

KLEIN-JÖBSTL, D.; SCHORNSTEINER, E.; MANN, E.; WAGNER, M.; DRILLICH, M.; SCHMITZ-ESSER, S. Pyrosequencing reveals diverse fecal microbiota in Simmental calves during early development. **Front Microbiol**, v. 5, p. 622, 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452753> >.

KUO, C. H.; KUO, H. F.; HUANG, C. H.; YANG, S. N.; LEE, M. S.; HUNG, C. H. Early life exposure to antibiotics and the risk of childhood allergic diseases: an update from the perspective of the hygiene hypothesis. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 46, n. 5, p. 320-329, Oct 2013. ISSN 1995-9133. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23751771> >.

LAGIER, J. C.; EDOUARD, S.; PAGNIER, I.; MEDIANNIKOV, O.; DRANCOURT, M.;

RAOULT, D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 1, p. 208-236, Jan 2015. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567228> >.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, Oct 1985. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413450> >.

LEY, R. E.; BÄCKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 31, p. 11070-11075, Aug 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033867> >.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183309> >.

LI, R. W.; CONNOR, E. E.; LI, C.; BALDWIN VI, R. L.; SPARKS, M. E. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. **Environ Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 129-139, Jan 2012. ISSN 1462-2920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21906219> >.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, Dec 2005. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16332807> >.

MACKIE, R. I. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. **Integr Comp Biol**, v. 42, n. 2, p. 319-326, Apr 2002. ISSN 1540-7063. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708724> >.

MAO, S.; ZHANG, M.; LIU, J.; ZHU, W. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. **Sci Rep**, v. 5, p. 16116, 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527325> >.

MAO, S.; ZHANG, R.; WANG, D.; ZHU, W. The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. **BMC Vet Res**, v. 8, p. 237, 2012. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217205> >.

MAPA. Relatório Técnico. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, n. 808, 2003. Disponível em: < [www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/comunicados](http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/comunicados) >. Acesso em: 15/04/2014.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, p. 31, 2015. ISSN 2049-2618. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26229597> >.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J. B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-380, Sep 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056220> >.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 4, p. 718-733, Oct 2011. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21976606> >.

MAST, Y.; WOHLLEBEN, W. Streptogramins - two are better than one! **Int J Med Microbiol**, v. 304, n. 1, p. 44-50, Jan 2014. ISSN 1618-0607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24119565> >.

MCDERMOTT, P. F.; CULLEN, P.; HUBERT, S. K.; MCDERMOTT, S. D.; BARTHOLOMEW, M.; SIMJEE, S.; WAGNER, D. D. Changes in antimicrobial susceptibility of native *Enterococcus faecium* in chickens fed virginiamycin. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 9, p. 4986-4991, Sep 2005. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151077> >.

MCGARVEY, J. A.; HAMILTON, S. W.; DEPETERS, E. J.; MITLOEHNER, F. M. Effect of dietary monensin on the bacterial population structure of dairy cattle colonic contents. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 6, p. 1947-1952, Feb 2010. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19784643> >.

METZLER-ZEBELI, B. U.; SCHMITZ-ESSER, S.; KLEVENHUSEN, F.; PODSTATZKY-LICHTENSTEIN, L.; WAGNER, M.; ZEBELI, Q. Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. **Anaerobe**, v. 20, p. 65-73, Apr 2013. ISSN 1095-8274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23474085> >.

MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; BENTON, J. R.; LUEBBE, M. K.; LAUDERT, S. B. Effects of monensin and tylosin in finishing diets containing corn wet distillers grains with solubles with differing corn processing methods. **J Anim Sci**, v. 91, n. 5, p. 2219-2228, May 2013. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23422007> >.

MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M. A.; LUEBBE, M. K.; WILLIAMS, P.; ENGSTROM, M. A. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver

abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. **J Anim Sci**, v. 87, n. 7, p. 2346-2354, Jul 2009. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359504> >.

MILLION, M.; LAGIER, J. C.; YAHAV, D.; PAUL, M. Gut bacterial microbiota and obesity. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 4, p. 305-313, Apr 2013. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452229> >.

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53608, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23308262> >.

MONIRA, S.; NAKAMURA, S.; GOTOH, K.; IZUTSU, K.; WATANABE, H.; ALAM, N. H.; ENDTZ, H. P.; CRAVIOTO, A.; ALI, S. I.; NAKAYA, T.; HORII, T.; IIDA, T.; ALAM, M. Gut microbiota of healthy and malnourished children in bangladesh. **Front Microbiol**, v. 2, p. 228, 2011. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22125551> >.

MORGAN, X. C.; TICKLE, T. L.; SOKOL, H.; GEVERS, D.; DEVANEY, K. L.; WARD, D. V.; REYES, J. A.; SHAH, S. A.; LELEIKO, N.; SNAPPER, S. B.; BOUSVAROS, A.; KORZENIK, J.; SANDS, B. E.; XAVIER, R. J.; HUTTENHOWER, C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. **Genome Biol**, v. 13, n. 9, p. R79, 2012. ISSN 1474-760X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23013615> >.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, n. 3, p. 317-322, Jun 1999. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383868> >.

MYER, P. R.; SMITH, T. P.; WELLS, J. E.; KUEHN, L. A.; FREETLY, H. C. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129174, 2015a. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26030887> >.

MYER, P. R.; WELLS, J. E.; SMITH, T. P.; KUEHN, L. A.; FREETLY, H. C. Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. **Springerplus**, v. 4, p. 454, 2015b. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26322260> >.

NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B.; HARMON, D.L.; BOYER, J.E. In vitro lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. **J Anim Sci**, v. 65, n. 4, p. 1064-1076, Oct 1987. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3667452> >.

NEUMANN, A. P.; SUEN, G. Differences in major bacterial populations in the intestines of mature broilers after feeding virginiamycin or bacitracin methylene disalicylate. **J Appl Microbiol**, Oct 2015. ISSN 1365-2672. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26425940> >.

NOESKE, J.; HUANG, J.; OLIVIER, N. B.; GIACOBBE, R. A.; ZAMBROWSKI, M.; CATE, J. H. Synergy of streptogramin antibiotics occurs independently of their effects on translation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 9, p. 5269-5279, Sep 2014. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24957822> >.

NUÑEZ, A. J. C.; CAETANO, M.; BERNDT, A.; DEMARCHI, J. J. A. D. A.; LEME, P. R.; LANNA, D. P. D. **Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nelore steers fed high concentrate diets**. *Scientia Agricola*. 70: 229-236 p. 2013.

OIKONOMOU, G.; TEIXEIRA, A. G.; FODITSCH, C.; BICALHO, M. L.; MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium species with health and growth. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e63157, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23646192> >.

OLIVEIRA, M. N.; JEWELL, K. A.; FREITAS, F. S.; BENJAMIN, L. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A.; SUEN, G. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. **Vet Microbiol**, v. 164, n. 3-4, p. 307-314, Jun 2013. ISSN 1873-2542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23490556> >.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB J**, v. 7, n. 1, p. 113-123, Jan 1993. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8422957> >.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biol**, v. 5, n. 7, p. e177, Jul 2007. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17594176> >.

PENDERS, J.; GERHOLD, K.; STOBBERINGH, E. E.; THIJS, C.; ZIMMERMANN, K.; LAU, S.; HAMELMANN, E. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. **J Allergy Clin Immunol**, v. 132, n. 3, p. 601-607.e608, Sep 2013. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23900058> >.

POURABEDIN, M.; GUAN, L.; ZHAO, X. Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. **Microbiome**, v. 3, p. 15, 2015. ISSN 2049-2618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874109> >.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J. M.; HANSEN, T.; LE PASLIER, D.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H. B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBAACH, J.; BORK, P.; EHRLICH, S. D.;

CONSORTIUM, M. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, Mar 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203603> >.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. **Microbiol Res**, v. 166, n. 2, p. 99-110, Feb 2011. ISSN 1618-0623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223646> >.

RETI, K. L.; THOMAS, M. C.; YANKE, L. J.; SELINGER, L. B.; INGLIS, G. D. Effect of antimicrobial growth promoter administration on the intestinal microbiota of beef cattle. **Gut Pathog**, v. 5, p. 8, 2013. ISSN 1757-4749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578222> >.

ROGERS, J. A.; BRANINE, M. E.; MILLER, C. R.; WRAY, M. I.; BARTLE, S. J.; PRESTON, R. L.; GILL, D. R.; PRITCHARD, R. H.; STILBORN, R. P.; BECHTOL, D. T. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abscess incidence in feedlot cattle. **J Anim Sci**, v. 73, n. 1, p. 9-20, Jan 1995. ISSN 0021-8812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7601759> >.

ROUSSEAU, C.; LEVENEZ, F.; FOUQUERAY, C.; DORÉ, J.; COLLIGNON, A.; LEPAGE, P. Clostridium difficile colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 3, p. 858-865, Mar 2011. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177896> >.

RUSSELL, S. L.; GOLD, M. J.; WILLING, B. P.; THORSON, L.; MCNAGNY, K. M.; FINLAY, B. B. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma. **Gut Microbes**, v. 4, n. 2, p. 158-164, 2013 Mar-Apr 2013. ISSN 1949-0984. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333861> >.

SALINAS-CHAVIRA, J.; LENIN, J.; PONCE, E.; SANCHEZ, U.; TORRENTERA, N.; ZINN, R. A. Comparative effects of virginiamycin supplementation on characteristics of growth-performance, dietary energetics, and digestion of calf-fed Holstein steers. **J Anim Sci**, v. 87, n. 12, p. 4101-4108, Dec 2009. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749020> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec 1977. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968> >.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu Rev Microbiol**, v. 31, p. 107-133, 1977. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/334036> >.

SCHUIJS, M. J.; WILLART, M. A.; VERGOTE, K.; GRAS, D.; DESWARTE, K.; EGE, M. J.; MADEIRA, F. B.; BEYAERT, R.; VAN LOO, G.; BRACHER, F.; VON MUTIUS, E.; CHANEZ, P.; LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. Farm dust and endotoxin

protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. **Science**, v. 349, n. 6252, p. 1106-1110, Sep 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339029> >.

SEEKATZ, A. M.; AAS, J.; GESSERT, C. E.; RUBIN, T. A.; SAMAN, D. M.; BAKKEN, J. S.; YOUNG, V. B. Recovery of the gut microbiome following fecal microbiota transplantation. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e00893-00814, 2014. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24939885> >.

SHANKS, O. C.; KELTY, C. A.; ARCHIBEQUE, S.; JENKINS, M.; NEWTON, R. J.; MCLELLAN, S. L.; HUSE, S. M.; SOGIN, M. L. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 9, p. 2992-3001, May 2011. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21378055> >.

SINGH, K. M.; SHAH, T.; DESHPANDE, S.; JAKHESARA, S. J.; KORINGA, P. G.; RANK, D. N.; JOSHI, C. G. High through put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 12, p. 10595-10602, Dec 2012. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23053958> >.

SONG, Y.; GARG, S.; GIOTRA, M.; MADDOX, C.; VON ROSENVINGE, E. C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.; FRICKE, W. F. Microbiota dynamics in patients treated with fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81330, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24303043> >.

STAPPENBECK, T. S.; HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15451-15455, Nov 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432102> >.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, Jan 2009a. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043404> >.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R.; GORDON, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027-1031, Dec 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183312> >.

TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Sci Transl Med**, v. 1, n. 6, p. 6ra14, Nov 2009b. ISSN 1946-6242. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368178> >.

UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. **Lett Appl Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 570-577, Nov 2010. ISSN 1472-765X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20849397> >.

VALLAEYS, T.; TOPP, E.; MUYZER, G.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G.; RIGAUD, A. S., G. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 24, p. 279-285, 1997. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00445.x/full> >.

VAZQUEZ, D. Studies on the mode of action of the streptogramin antibiotics. **J Gen Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 93-106, Jan 1966. ISSN 0022-1287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4958759> >.

WEESE, J. S.; GIGUÈRE, S.; GUARDABASSI, L.; MORLEY, P. S.; PAPICH, M.; RICCIUTO, D. R.; SYKES, J. E. ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. **J Vet Intern Med**, v. 29, n. 2, p. 487-498, 2015 Mar-Apr 2015. ISSN 1939-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783842> >.

WEINSTOCK, G. M. Genomic approaches to studying the human microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 250-256, Sep 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972298> >.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 3, p. 577-585, Mar 1995. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7793855> >.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 1, p. 35-48, Jan 2014. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24336183> >.

WOSTMANN, B. S.; LARKIN, C.; MORIARTY, A.; BRUCKNER-KARDOSS, E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. **Lab Anim Sci**, v. 33, n. 1, p. 46-50, Feb 1983. ISSN 0023-6764. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6834773> >.

XIE, G.; DUFF, G. C.; HALL, L. W.; ALLEN, J. D.; BURROWS, C. D.; BERNAL-RIGOLI, J. C.; DOWD, S. E.; GUERRIERO, V.; YEOMAN, C. J. Alteration of digestive tract microbiome in neonatal Holstein bull calves by bacitracin methylene disalicylate treatment and scours. **J Anim Sci**, v. 91, n. 10, p. 4984-4990, Oct 2013. ISSN 1525-3163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942707> >.

YATSUNENKO, T.; REY, F. E.; MANARY, M. J.; TREHAN, I.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; CONTRERAS, M.; MAGRIS, M.; HIDALGO, G.; BALDASSANO, R. N.; ANOKHIN, A. P.; HEATH, A. C.; WARNER, B.; REEDER, J.; KUCZYNSKI, J.; CAPORASO, J. G.; LOZUPONE, C. A.; LAUBER, C.; CLEMENTE, J. C.; KNIGHTS, D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222-227, Jun 2012. ISSN 1476-4687.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699611> >.

YOUSSEF, N.; SHEIK, C. S.; KRUMHOLZ, L. R.; NAJAR, F. Z.; ROE, B. A.; ELSHAHED, M. S. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 16, p. 5227-5236, Aug 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561178> >.

YU, F.; LU, C.; LIU, Y.; SUN, H.; SHANG, Y.; DING, Y.; LI, D.; QIN, Z.; PARSONS, C.; HUANG, X.; LI, Y.; HU, L.; WANG, L. Emergence of quinupristin/dalfopristin resistance among livestock-associated *Staphylococcus aureus* ST9 clinical isolates. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, n. 5, p. 416-419, Nov 2014. ISSN 1872-7913. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218154> >.

ZIEMER, C. J. Newly cultured bacteria with broad diversity isolated from eight-week continuous culture enrichments of cow feces on complex polysaccharides. **Appl Environ Microbiol**, v. 80, n. 2, p. 574-585, Jan 2014. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212576> >.