

**ISABELLA DAL'RIO NASCIMENTO LOPES**

**COMUNIDADE BACTERIANA DE AMBIENTES DE  
PASTAGEM LOCALIZADOS NO MUNICÍPIO DE BOCA  
DO ACRE, AMAZONAS, E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO  
COM A PERIODONTITE EPIZOÓTICA BOVINA**



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
como pré-requisito para a obtenção do  
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
JULHO/2019**

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Lucy Seldin e coorientação de Jackeline Rossetti Mateus.**

Lopes, Isabella Dal'Rio Nascimento

Comunidade bacteriana de ambientes de pastagem localizados no município de Boca do Acre, Amazonas, e sua possível relação com a Periodontite Epizoótica Bovina / Isabella Dal'Rio Nascimento Lopes. -- Rio de Janeiro, 2019.

25 f.

Orientadora: Lucy Seldin.

Coorientadora: Jackeline Rossetti Mateus.

Bibliografia: f.22-25.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2019. 1. Cara Inchada Bovina. 2. Periodontite Epizoótica Bovina. 3. Microbiota. 4. Rizosfera. 5. Microbiologia Ambiental. I. Seldin, Lucy, orient. II. Mateus, Jackeline Rossetti, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ  
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Isabella Dal'Rio Nascimento Lopes**  
DRE: 115088747

BANCA EXAMINADORA: Prof. Andrew Macrae (Presidente)  
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius  
Profa. Fernanda de Ávila Abreu  
Prof. Caio Rachid (Suplente)

Título da Monografia: **"Comunidade bacteriana de ambientes de  
pastagem localizados no município de Boca do Acre, Amazonas, e  
sua possível relação com a periodontite epizootica bovina"**

Local: **Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Geral / CCS / UFRJ**  
Data e hora de início: **02 de julho de 2019 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 02 de Julho de 2019.

NOTA

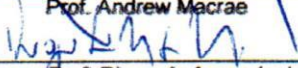
10,0

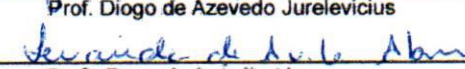
10,0

10,0

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Andrew Macrae

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius

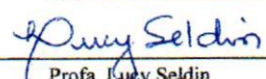
  
\_\_\_\_\_  
Profa. Fernanda de Ávila Abreu

\_\_\_\_\_  
Prof. Caio Rachid

Aluno:

  
\_\_\_\_\_  
Isabella Dal'Rio Nascimento Lopes

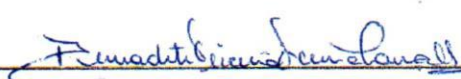
Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Lucy Seldin

Coorientador:

  
\_\_\_\_\_  
M.Sc. Jackeline Rossetti Mateus

Coordenador  
de TCC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que confiaram em todas as minhas decisões desde o dia em que fui aprovada na graduação e me deram todo apoio necessário para que eu chegasse até aqui. Agradeço por sempre me incentivaram a me superar e ser cada vez melhor.

Aos meus melhores amigos que não permitiram que eu desistisse dessa caminhada. Agradeço ao Fernando por me fazer perceber que eu tenho um potencial enorme e por sempre ter botado mais fé em mim que eu mesma. À Larissa e à Julyane, pelas conversas incessantes sobre trabalho até altas horas. À Beatriz, por me deixar desabafar mesmo sem entender nada sobre microbiologia.

Ao Laboratório de Genética Microbiana pela oportunidade de trabalhar com o que amo. Agradeço a professora Lucy por me aceitar no laboratório e ter toda a paciência do mundo comigo. À Jacky por todos os ensinamentos que me tornaram quem eu sou hoje. Aos demais companheiros de trabalho que me aturaram por todos esses anos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

ISABELLA DAL'RIO NASCIMENTO LOPES

### COMUNIDADE BACTERIANA DE AMBIENTES DE PASTAGEM LOCALIZADOS NO MUNICÍPIO DE BOCA DO ACRE, AMAZONAS, E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM A PERIODONTITE EPIZOÓTICA BOVINA

ORIENTADORA: LUCY SELDIN

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A periodontite epizootica bovina, conhecida como cara inchada (CIb), é uma doença que afeta o gado no Brasil desde 1970. A CIb é caracterizada por uma infecção bacteriana progressiva que afeta os tecidos peridentários, formando um abaulamento lateral na face. A doença dificulta a alimentação de bovinos e ovinos jovens, podendo levar a óbito e a grandes perdas econômicas. Estudos anteriores mostraram que a transferência de animais doentes para regiões indenes de pasto natural levava à regressão e à cura da doença, indicando que os fatores desencadeantes da CIb poderiam estar presentes em pastos recém-formados. Além disso, foi observado que a derrubada de florestas para a abertura de novos pastos resulta em uma alteração da microbiota do solo e/ou associada à vegetação, principalmente de bactérias do filo Actinobacteria. Foi levantada a hipótese de que a proliferação de microrganismos patogênicos na boca do animal pode estar relacionada com a produção subinibitória de antimicrobianos por actinobactérias no solo. Diante das grandes perdas econômicas causadas pela CIb e para entender melhor a relação entre a comunidade bacteriana e a doença, este projeto visa comparar a estrutura da comunidade bacteriana total e de actinobactérias em áreas com alta (AI) e baixa (BI) incidência da doença utilizando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Para isso, foram coletadas 15 amostras de raiz em regiões com AI e 15 amostras em áreas com BI, na localidade de Boca do Acre (AM), totalizando 30 amostras. Em ambas as localidades foram coletadas 5 amostras de pasto novo, 5 de pasto velho e 5 de região de mata adjacente ao pasto. Foi realizada a extração de DNA total das amostras, seguida de PCR para amplificação do gene *rrs* (que codifica para o rRNA 16S) da comunidade bacteriana total e uma reação PCR *semi-nested* para actinobactérias. Os resultados obtidos, utilizando análises multivariadas das matrizes resultantes das DGGEs, indicam que o tempo de formação da vegetação na região de pasto ou mata tem influência na estruturação da comunidade bacteriana total. Além disso, a estrutura da população de actinobactérias mostrou-se diferente nas amostras provenientes das fazendas com alta e baixa incidência de CIb (AI e BI, respectivamente). O presente trabalho corrobora com a hipótese de que nas regiões de pasto novo ocorre uma alteração na população de actinobactérias que pode estar relacionada ao desenvolvimento da periodontite epizootica bovina.

**Palavras-chave:** periodontite epizootica bovina; Cara Inchada bovina; actinobactérias; eletroforese em gel de gradiente desnaturante.

**ABSTRACT**

ISABELLA DAL'RIO NASCIMENTO LOPES

**BACTERIAL COMMUNITY OF PASTURE ENVIRONMENTS LOCATED AT BOCA DO ACRE, AMAZONAS, AND IT'S POSSIBLE RELATION TO BOVINE PERIODONTITIS**

ORIENTADORA: LUCY SELDIN

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Bovine periodontitis, also known as “cara inchada” (i.e. swollen face), is a disease that affects cattle in Brazil since the 1970's. “Cara inchada” (CIb) is characterized as a progressive bacterial infection that compromises the periodontal tissues, causing a lateral face swelling. The disease makes feeding difficult for calves, sometimes leading to weight loss or death, causing great economic loss. Previous studies have shown that the transference of sick animals to disease-free areas with natural pasture reverted CIb and the animals became healed. Therefore, this suggested that the key factor causing this illness may be presented in recently cultivated pastures. Moreover, deforestation to establish new pastures results in a change of soil microbiome, especially in the phylum Actinobacteria. It was hypothesized that the proliferation of pathogenic microorganisms in the animal's mouth could be related to a subinhibitory production of antimicrobials by actinobacteria in soil. Because of the economic loss caused by CIb and to better understand the correlation between the soil microbiome and the disease, this study aimed to compare the structure of total bacterial community and Actinobacteria in areas of high (HI) and low (LI) incidence of the disease, using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Fifteen rhizosphere samples were taken in each of these farms. Five of these samples were taken in recently formed pastures, another 5 in old pastures and the remaining 5 samples were taken in an adjacent forest, totalizing 30 samples. DNA extraction from rhizosphere soil was followed by PCR to amplify the *rrs* gene of the total bacteria community and by a semi-nested PCR for Actinobacteria. The multivariate analysis based on the DGGE matrix showed that the vegetation formation time in pasture or forest areas influenced the structure of total bacteria community. Moreover, the structure of Actinobacteria population was different in samples from farms with high and low incidence of CIb (HI and LI, respectively). This study corroborates with the hypothesis that in new pasture areas an alteration in the Actinobacteria population occurs, and this may be related to the development of epizootic bovine periodontitis.

**Keywords:** bovine periodontitis, actinobacteria, denaturing gradient gel electrophoresis.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Dendrograma gerado a partir da DGGE utilizando iniciadores que codificam para o rRNA 16S	14
<b>Figura 2:</b> N-MDS gerado a partir da DGGE utilizando iniciadores que codificam para o rRNA 16S	15
<b>Figura 3:</b> Dendrograma gerado a partir da DGGE utilizando iniciadores que codificam para regiões específicas do rRNA 16S para actinobactérias	17
<b>Figura 4:</b> N-MDS gerado a partir da DGGE utilizando iniciadores que codificam para regiões específicas do rRNA 16S para actinobactérias	18



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AI** – alta incidência de CIb

**BI** – baixa incidência de CIb

**CAR** – Cadastro Ambiental Rural

**CIe** – Cara Inchada em equinos

**CIb** – Cara Inchada bovina

**DGGE** – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante)

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**Gene *rrs*** – gene que codifica o rRNA 16S

**ILP** – Sistema de Integração Lavoura-Pecuária

**Inpe** – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

**MA** – mata adjacente de alta incidência

**MB** – mata adjacente de baixa incidência

**N-MDS** – Non-Metric Dimensional Scaling (análise multidimensional não-métrica)

**PCR** – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

**PNA** – pasto novo de alta incidência

**PNB** – pasto novo de baixa incidência

**PVA** – pasto velho de alta incidência

**PVB** – pasto velho de baixa incidência

**rRNA 16S** – subunidade 16S do RNA ribossomal

**RNA** - ácido ribonucleico

**SUDAM** - Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 A expansão agropecuária no Brasil .....	1
1.2 Consequências do desmatamento .....	3
1.3 A periodontite epizootica bovina (Cib) .....	5
1.4 Técnicas para estudo das comunidades microbianas .....	4
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>9</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
3.1 Objetivo geral .....	10
3.2 Etapas a serem desenvolvidas .....	10
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
4.1 Amostragem .....	10
4.2 Extração de DNA .....	11
4.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) .....	12
4.5 Análises estatísticas .....	12
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
5.1 Análise da estrutura e diversidade da comunidade bacteriana total utilizando Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	13
5.2 Análise da estrutura e diversidade da população de actinobactérias utilizando Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	16
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>21</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>22</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A expansão agropecuária no Brasil

Em meados do século XX, a pecuária passou a estar intimamente associada ao desenvolvimento econômico no Brasil. A criação de gado em áreas rurais resulta em diversos produtos (carne, leite e couro) que são comercializados, gerando lucro para o país. Em 1970, as áreas de pasto representavam 30 milhões de hectares. Essa área sofreu um expressivo aumento ao longo dos anos, passando para 100 milhões em 1995, devido a uma grande expansão industrial e tecnológica, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste (EMBRAPA, 2005). Em 2017, o Brasil liderou o mercado mundial de produção pecuária, possuindo o maior rebanho bovino e sendo o maior exportador de carne bovina (ABIEC, 2017).

A grande expansão das áreas de pasto foi responsável pela degradação ambiental em diversos biomas brasileiros, principalmente a Floresta Amazônica e o Cerrado. Pequenos e grandes produtores aderiram ao desmatamento para a abertura de novas áreas para pastagem utilizando queimadas. Consequentemente, foram observadas a redução da biodiversidade, a alteração de ciclos biogeoquímicos e o aumento do efeito estufa (Klink e Machado, 2005; Fearnside, 2010); fatores esses que serão aqui discutidos posteriormente.

A prosperidade do setor agropecuário foi baseada na grande extensão de áreas de floresta intocada nos principais biomas brasileiros. Subsídios federais foram concedidos a pecuaristas para a exploração de locais de mata virgem e abertura de áreas para pastagem, com a finalidade de alavancar o crescimento econômico no país. Durante a ditadura militar (1964-1985), projetos liderados pela SUDAM (Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia) tinham como objetivo explorar áreas da Floresta Amazônica consideradas improdutivas, levando à ocupação de suas terras para a criação de gado, principalmente bovino, impulsionando o desmatamento e a agropecuária no Brasil (Loureiro e Pinto, 2005).

Por conta das crescentes taxas de desmatamento, em 1995 a pecuária ocupava cerca de 75% das áreas desflorestadas (Barreto, Pereira e Arima, 2008). Entre 2005 e 2012, foram implementadas medidas com o objetivo de desacelerar essa expansão, entre elas o sistema Deter, criado pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (Inpe), que permitia a visualização do desmatamento em tempo real, facilitando assim o direcionamento de medidas punitivas (Soares-Filho *et al.*, 2005). Consequentemente, 2012 foi o ano com a

menor taxa de desmatamento registrada na Floresta Amazônica (ABIEC, 2017). No entanto, devido ao retrocesso de políticas socioambientais após o ano de 2012, os índices de desmatamento voltaram a crescer (ABIEC, 2017). O Novo Código Florestal, em vigor desde 2012, implementou o Cadastro Ambiental Rural (CAR). Nesse sistema, as propriedades rurais foram regularizadas e posseiros que cometeram danos ambientais anteriormente ao cadastro foram anistiados (Pires, 2013). A questão da impunidade foi o principal fator que impulsionou o desmatamento na Floresta Amazônica.

Além do bioma amazônico, o Cerrado também sofreu consequências com a expansão da agropecuária. Considerada a savana com maior biodiversidade reconhecida mundialmente (Klink e Machado, 2005), o Cerrado apresenta características particulares como susceptibilidade a mudanças climáticas, alta acidez e baixa fertilidade do solo (Cunha *et al.*, 2008). O plano de metas, desenvolvido pelo governo de Juscelino Kubitschek após 1960, impulsionou a expansão da fronteira agrícola no Cerrado (Menezes *et al.*, 2009). O crescimento econômico gerado fez com que os investimentos na expansão agropecuária aumentassem para atender a demanda do mercado externo, negligenciando assim os danos socioambientais (Cunha *et al.*, 2008)

As condições climáticas bem definidas e as características do solo do Cerrado, como a profundidade, que favorece o desenvolvimento da vegetação, fizeram com que os produtores migrassem para esse bioma para a produção agropecuária (Neto *et al.*, 2009). Por isso, a expansão desenfreada de áreas para agropecuária no Cerrado resultou em uma taxa de desmatamento de cerca de 40% em 2002, que subiu para aproximadamente 50% em 2011 (Leite, 2014). Conseqüentemente, foi estimado em 2013 que mais da metade da produção de carne bovina no Brasil advinha de regiões de Cerrado (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013).

O manejo incorreto do gado e a negligências no cuidado dos solos são fatores que levaram ao abandono prematuro de fazendas de criação de gado e subsequente abertura de novas áreas para pastagem (Balbino *et al.*, 2011). Atualmente, diferentes técnicas foram aprimoradas para reutilização de áreas abandonadas como, por exemplo, o sistema de integração lavoura-pecuária (ILP) que tem como objetivo criar estratégias de plantação que promovam melhor aproveitamento do solo dessas regiões já desmatadas (Vilela *et al.*, 2008). Entretanto, o agronegócio reconhecidamente apresenta resistência a projetos sustentáveis, já que existe a possibilidade de serem técnicas inicialmente menos produtivas e rentáveis e que apresentam custos de manutenção mais altos que os métodos tradicionais.

## 1.2 Consequências do desmatamento

O Cerrado e a Floresta Amazônica apresentam uma grande riqueza e diversidade de organismos, sendo algumas espécies endêmicas de cada bioma. Nessa perspectiva, o desmatamento pode levar a um desequilíbrio ecológico que pode selecionar e favorecer o crescimento de determinadas espécies e extinguir organismos normalmente presentes nesses ambientes (Vieira *et al.*, 2008). Esse tipo de impacto pode atingir todos os seres desse ambiente: animais, plantas e microrganismos. As queimadas são o principal método utilizado para a abertura de novas áreas para agropecuária e uma de suas consequências é a liberação de gases do efeito estufa. Além disso, o processo de digestão alimentar do gado com o qual as áreas recém desmatadas são ocupadas é uma das principais responsáveis pela emissão de gases, como gás carbônico e metano, que também irão contribuir para esse fenômeno (Fearnside, 2006).

A prática agropecuária estabelecida em locais previamente desmatados gera compactação dos solos pela utilização de maquinaria para manejo de culturas, reduzindo a disponibilidade de água no solo e limitando o crescimento das raízes das plantas (Lopes *et al.*, 2006). Além disso, a substituição da diversidade de vegetação de um determinado ecossistema por monoculturas leva a alterações bioquímicas no solo, alterando a disponibilidade de nutrientes (Luizão, 2007). Assim, ao longo do tempo, os solos se tornam cada vez menos férteis, fazendo com que os produtores aumentem cada vez mais o uso de fertilizantes químicos ou abandonem essas regiões (Luizão, 2007). A utilização de produtos químicos nas vegetações, tanto de fertilizantes quanto de agrotóxicos para o controle de pragas e vetores, pode levar à contaminação de sistemas hídricos (Veiga *et al.*, 2006).

Estudos mostraram que a microbiota residente no solo é diretamente afetada pela prática agropecuária (Mendes *et al.*, 2015). De Vries e colaboradores (2013) observaram que a utilização do solo de forma intensificada, como a que ocorre em grandes lavouras mecanizadas e de uma única cultura, leva a uma redução da biomassa microbiana no solo, que pode aumentar a dependência da utilização de fertilizantes. Navarrete e colaboradores (2015) relataram que em áreas recém-desmatadas por queimadas há alterações físicas e químicas do solo, acompanhada de uma alteração na abundância relativa de determinados grupos taxonômicos, como por exemplo o aumento do filo Actinobacteria, e perda da diversidade microbiana. Essas alterações podem ter consequências diretas sobre as plantas e sobre os animais que se alimentam dessa vegetação, como citado anteriormente. Foi

observado por Morris e colaboradores (2016) o aparecimento de microrganismos patogênicos, como actinobactérias da espécie *Mycobacterium ulcerans*, associado ao desequilíbrio nas cadeias alimentares gerado pelo desmatamento em biomas tropicais. McFarlane, Sleigh e McMichael (2013) afirmam que o uso de terras na Austrália, principalmente através do desmatamento para agropecuária e desenvolvimento urbano, é o fator responsável pela reincidência e surgimento de doenças causadas por microrganismos e parasitas em humanos e animais. Nessa perspectiva, o desmatamento dos biomas brasileiros para o desenvolvimento agropecuário causa um impacto nas relações microrganismo-planta-animais que pode resultar na manifestação de doenças que ainda não são bem elucidadas.

### 1.3 A periodontite epizootica bovina (CIb)

A periodontite epizootica bovina, popularmente conhecida como Cara Inchada (CIb), é uma doença endêmica que tem afetado o gado bovino desde meados de 1960, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil (Döbereiner, Inada e Tokarnia, 1974). A CIb ocorre principalmente em animais jovens em fase de dentição, afeta a mucosa oral e compromete a alimentação, podendo levar à óbito (Döbereiner, Inada e Tokarnia, 1974). Há grandes perdas econômicas aos pecuaristas devido ao desconhecimento do mecanismo patológico exato, dificultando qualquer tentativa de tratamento. Além disso, é muito rápido o desenvolvimento da doença e a consequente morte dos animais (Döbereiner *et al.*, 2000).

A CIb é caracterizada por uma infecção bacteriana progressiva que afeta os tecidos peridentários, formando uma lesão purulenta (Döbereiner, Inada e Tokarnia, 1974; Dutra, Botteon e Döbereiner, 2000). Os abscessos podem levar a um abaulamento uni ou bilateral na face do animal, localizado na região do maxilar ou da mandíbula. Comumente é observada a perda dos dentes seguida de desnutrição (Döbereiner, Inada e Tokarnia, 1974). Outros sintomas geralmente presentes são diarreia, odor fétido proveniente das lesões purulentas e a repetição desnecessária do movimento de mastigação (Döbereiner, Inada e Tokarnia, 1974).

Devido à similaridade da sintomatologia da CIb com a cara inchada em equinos (CIe) (Döbereiner *et al.*, 2000), inicialmente acreditava-se que a manifestação da doença ocorria por conta de um desequilíbrio mineral na alimentação do gado, que é a causa do desenvolvimento de sintomas em equinos. A CIe ocorre em animais que se alimentam de

pastagens de capim da espécie *Brachiaria humidicola*, planta que apresenta grandes quantidades de oxalatos, substâncias que se complexam ao cálcio durante a digestão nos animais e inviabiliza a absorção desse mineral no organismo (Santos *et al.*, 2005). A formação do oxalato de cálcio no intestino de equinos estimula a glândula paratireoide para recrutar esse mineral no organismo, retirando-o dos ossos para o sangue e resultando na formação de osteodistrofias, como o abaulamento na face (Nunes, Silva e Schenk, 1990), sintoma similar ao da CIB. Nesse caso, não há processo inflamatório e a doença pode ser controlada através da administração de suplementos minerais (Nunes, Silva e Schenk, 1990).

Entretanto, além da CIB apresentar um quadro de processo inflamatório, que não ocorre na CIE (Dutra, Botteon e Döbereiner, 2000), não há alteração na produção de hormônios pela glândula paratireoide (Döbereiner e Dämmrich, 1997). Além disso, não foram observadas modificações na estrutura óssea de bezerras (Döbereiner *et al.*, 2000) e a suplementação mineral não tem efeitos sobre o desenvolvimento da doença nos bovinos (Moraes, Silva e Döbereiner, 1994). Ademais, em um estudo realizado no final da década de 70, Döbereiner e colaboradores (2000) observaram que pastos novos, que são ricos nutricionalmente, apresentam altos índices da doença; enquanto em pastos mais antigos, geralmente deficientes em minerais, não é observado o desenvolvimento da CIB. A partir da correlação desses resultados pôde ser inferido que a manifestação da doença se dá de forma diferenciada da CIE e que o desenvolvimento da CIB pode estar relacionado ao pasto.

O pico de incidência da doença coincidiu com o período de expansão agropecuária no interior do Brasil, onde ocorreu a derrubada da mata virgem de diferentes biomas e plantio de capim para pastagem, principalmente capim-colonião (*Panicum maximum*). Foi observado inicialmente que grande parte das fazendas CIB-positivas eram compostas de pastos recém-cultivados com capim-colonião (Döbereiner, Rosa e Lazzari, 1976) e que a substituição da alimentação por uma ração balanceada resultava em regressão e cura da doença (Rosa *et al.*, 1976). Além disso, era sabido que a transferência do gado para regiões indenes levava à recuperação dos animais (Döbereiner *et al.*, 1975). Os fatores mencionados levaram a crer que a CIB se tratava de uma doença de transmissão alimentar advinda da vegetação (do *Panicum maximum*), visto que os animais mantidos em pastos novos compostos por esta espécie vegetal não apresentavam melhora nos sintomas da doença (Döbereiner, Rosa e Lazzari, 1976).

Apenas em 1993, Dutra, Matsumoto e Döbereiner observaram que o fator que modula a incidência da doença é independente da espécie predominante na vegetação local, e sim relacionado ao manejo do solo. Visto que fazendas CIb positivas eram predominantemente regiões de pasto recém-cultivado e as regiões de pasto velho eram indenes, foi inferido pelos mesmos autores que o fator desencadeador da CIb poderia estar presente no solo, não só de regiões de pasto novo, mas também em pastos recém-cultivados de fazendas que já tiveram incidência da doença anteriormente e haviam sido abandonadas.

Baldani e colaboradores (1982), visando compreender a alteração na microbiota do solo em regiões de primeiro cultivo após o desmatamento da vegetação primária no Cerrado, observaram um aumento na abundância relativa de actinobactérias neste solo. Em uma análise em regiões próximas a fazendas que apresentavam relatos de surto da doença, Huddleston e colaboradores (1997) mostraram que, além de uma maior presença de actinobactérias, pelo menos a metade dos microrganismos isolados era resistente à estreptomicina, antibiótico produzido principalmente por actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Por causa disso, foi inferido por Döbereiner e colaboradores (2000) que a produção de estreptomicina no solo poderia estar relacionada ao desenvolvimento da CIb.

O isolamento a partir das lesões peridentárias na cavidade oral de bovinos, realizado por Blobel e colaboradores em 1984, levou à detecção de uma associação entre microrganismos dos filos Bacteroidetes e Actinobacteria. Do primeiro filo foram isoladas bactérias de uma espécie de *Bacteroides* produtoras de pigmentação negra, que estão geralmente associadas à patogênese na cavidade oral e podem levar ao desenvolvimento de periodontites, não só em humanos como também em animais (White e Mayrand, 1981; Winkelhoff, Steenbergen e Graaff, 1988; Sundqvist, Johansson e Sjögren, 1989). Estudos anteriores mostraram que a abundância relativa de *Bacteroides* sp. está associada ao nível de inflamação na região oral, ou seja, a inflamação é mais severa quanto maior for a presença de *Bacteroides* sp. (Tanner *et al.*, 1979).

Já do filo Actinobacteria, o principal isolado pertencia à espécie *Actinomyces* (*Corynebacterium*) *pyogenes*, atualmente reclassificada como *Trueperella pyogenes* (Machado e Bicalho, 2014). As actinobactérias são microrganismos majoritariamente encontrados em solos férteis (Lewin *et al.*, 2016), uma característica presente em pastos recém-cultivados. Em humanos e em cães, as bactérias do gênero *Corynebacterium* são frequentemente isoladas de lesões características da periodontite (Takeuchi *et al.*, 1974;



Akada e Hirasawa, 2000). A espécie *T. pyogenes* é descrita como um patógeno oportunista formador de abscessos em animais (Machado e Bicalho, 2014) e foi isolada de lesões da cavidade oral bovina (Blobel *et al.*, 1984).

A fim de avaliar a alteração de *Bacteroides* sp. na cavidade oral bovina, foi feita uma quantificação dessas bactérias antes e após a transferência do gado de regiões CIB-positivas para fazendas indenas (Dutra, Botteon e Döbereiner, 2000). Como esperado, de acordo com os resultados já encontrados nos estudos anteriores, houve uma redução na abundância de *Bacteroides* sp. após a transferência do gado para regiões sem incidência da doença (Dutra, Botteon e Döbereiner, 2000). Dessa forma, foi sugerido que a produção de enzimas e endotoxinas por esses microrganismos seria responsável pelas lesões típicas da doença (Döbereiner *et al.*, 2000).

Para verificar uma possível relação entre a produção de antibióticos por actinobactérias no solo e o estabelecimento da doença, foram realizados experimentos *in vitro* para avaliar a aderência de bactérias da espécie *Bacteroides melaninogenicus*, isoladas da boca de animais doentes, em células epiteliais da mucosa oral de bezerros na presença de estreptomicina e actinomicina (Grassmann *et al.*, 1997). Foi observado que ambos os antibióticos, em quantidades subinibitórias, favorecem a proliferação e a aderência de *Bacteroides* sp., mecanismos estes possivelmente relacionadas ao desenvolvimento da CIB por estas bactérias (Grassmann *et al.*, 1997).

Estudos para determinar métodos eficientes para prevenção e tratamento da cara inchada constataram que os antibióticos espiramicina (Döbereiner *et al.*, 1990) e virginiamicina (Dutra e Döbereiner, 1992 *apud* Döbereiner *et al.*, 2000) administrados oralmente eram eficientes para impedir o desenvolvimento da doença em fazendas CIB positivas. Em 1992, Tims e colaboradores concluíram que a utilização de virginiamicina também era capaz de tratar os sintomas da doença. Até hoje, ainda não foram realizados experimentos para verificar o potencial de acúmulo da dose administrada desses antibióticos nos produtos provenientes do gado, como carne e leite.

Após todos os estudos realizados entre os anos de 1970 e 2000, foi estabelecida a hipótese por Döbereiner e colaboradores (2000) de que em pastos recém-cultivados, independentemente do tipo de vegetação, ocorre uma alteração na microbiota do solo, levando a um aumento na abundância de actinobactérias e maior produção de antibióticos. O contato direto do gado com o pasto, principalmente através da alimentação, e

consequentemente com os microrganismos nele presentes, seria responsável pelo desequilíbrio causado na microbiota da cavidade oral de bovinos, favorecendo assim a proliferação de bactérias do gênero *Bacteroides* e resultando nas lesões características da doença.

Em 2003, uma revisitação às fazendas que anteriormente apresentavam altos índices de incidência da CIB (cerca de 90% - pastos antigos) revelou que não havia mais relatos recentes sobre a doença, sem nenhum tipo de tratamento aplicado (Döbereiner, Dutra e Rosa, 2004). Entretanto, eventuais surtos da doença eram relatados em locais de ampliação ou reforma de pasto (pastos novos - Döbereiner, Dutra e Rosa, 2004), levando os fazendeiros a abandonar essas regiões e a desmatar a mata virgem adjacente. Dessa forma, a fim de controlar a disseminação da CIB e evitar desmatamentos para a abertura de novos pastos (fugindo de áreas com a doença), se faz necessário compreender melhor os fatores envolvidos no desenvolvimento da CIB.

#### 1.4 Técnicas para estudo das comunidades microbianas

Os métodos tradicionais para estudo da microbiologia são baseados no cultivo de microrganismos viáveis de uma determinada amostra em um meio de cultura que forneça os nutrientes necessários para o crescimento dos mesmos (Van Hamme, Singh e Ward, 2003). Após a proliferação microbiana, pode ser feito um isolamento das colônias de interesse, cultivando-as em meio de cultura específico para seu enriquecimento (Van Hamme, Singh e Ward, 2003). A partir do isolamento e cultivo, várias técnicas podem ser aplicadas como a observação da estrutura celular através de microscopia (Moreira e Lins, 2010) ou o estudo do metabolismo microbiano através de testes bioquímicos (Decesaro *et al.*, 2013).

A utilização das práticas tradicionais em microbiologia ainda é de grande importância e representou um grande avanço nos estudos de ecologia e diversidade microbiana. Entretanto, é estimado que apenas 1% dos microrganismos do ambiente sejam cultiváveis pelos métodos tradicionais (Rappe e Giovannoni, 2003). Além disso, existem algumas limitações para o cultivo pelo método tradicional, entre elas, é destacada a dificuldade de mimetizar as condições encontradas no ambiente, podendo impedir o isolamento de uma estirpe (Oliveira, Sette e Fantinatti-Garboggini, 2006).

Dessa forma, o uso de técnicas moleculares para análise da composição da comunidade microbiana passou a ser utilizado para a detecção tanto de microrganismos cultiváveis como daqueles considerados não cultiváveis pelos métodos tradicionais de cultivo (Akkermans *et al.*, 1994; Van Elsas, Jansson e Trevors, 2007). Além disso, o conhecimento sobre essas comunidades também contribui para o aumento de dados sobre a diversidade de microrganismos e, do ponto de vista funcional, análises moleculares também permitem a busca de genes relacionados a fenótipos de interesse diretamente no ambiente (Colwell, 1997). Por isso, tem sido cada vez mais utilizadas técnicas de biologia molecular, como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em conjunto com outras técnicas como DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante), PCR quantitativo e sequenciamento massivo de DNA para o estudo das comunidades microbianas em diversos ambientes (Van Elsas, Jansson e Trevors, 2007; Rodrigues, 2011; Mutlo e Guven, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

A periodontite epizootica bovina é uma doença que, uma vez atingindo o gado bovino, se dissemina rapidamente pelos animais afetando principalmente bezerros e pode levá-los a óbito, resultando em grandes perdas econômicas para o Brasil. O aparecimento da doença está principalmente associado ao desmatamento dos biomas brasileiros. Os estudos existentes levam à hipótese de que a derrubada da mata virgem para plantio de novas áreas de pasto para criação de gado altera a microbiota do solo favorecendo uma maior proliferação de actinobactérias, incluindo espécies produtoras de antibióticos. A presença de uma quantidade subinibitória de antibióticos no solo (e conseqüentemente na cavidade oral bovina após sua alimentação) favorece a seleção e a proliferação de *Bacteroides* sp. e *Trueperella pyogenes* na boca do animal que irão causar as lesões típicas da Clb. Diante do exposto, o presente trabalho se propõe a estudar a rizosfera de plantas provenientes de pasto com alta e baixa incidência da Clb, a fim de compreender melhor a associação do filo Actinobacteria com a ocorrência da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Comparar a estrutura da comunidade bacteriana total e de actinobactérias em uma região de alta incidência (AI) e outra de baixa incidência (BI) da doença CIb em diferentes áreas formadas de pasto novo, de pasto velho e de mata.

#### 3.2 Etapas a serem desenvolvidas

- Realizar a extração de DNA das amostras de rizosfera das plantas recebidas;
- Amplificar, por PCR, a comunidade bacteriana total e a população de actinobactérias das amostras de rizosfera;
- Determinar a estrutura da comunidade bacteriana total e da população de actinobactérias utilizando DGGE;
- Analisar o agrupamento das amostras baseado nas matrizes geradas pelos perfis de bandas nas diferentes DGGEs.

### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Amostragem

Foi feita a amostragem da rizosfera de plantas de regiões de pasto de duas fazendas: uma com alta incidência da doença (fazenda AI) e outra com baixa incidência da doença (fazenda BI). As coletas foram feitas da seguinte forma: 5 amostras de pasto novo, 5 amostras de pasto velho e 5 amostras de mata adjacente ao pasto em cada uma das fazendas (AI e BI), totalizando 30 amostras. Foi pré-determinado que a fazenda considerada de BI é a que possui menos de 20% de animais doentes no momento da coleta.

As regiões de pasto novo de ambas as fazendas apresentam 1 ano de formação e a vegetação é composta por uma mistura dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*. Já as regiões de pasto velho apresentam entre 20 e 30 anos de formação e são compostas por vegetação do gênero *Brachiaria*. Por fim, a região de mata adjacente é caracterizada por um local onde o pasto foi abandonado há mais de 30 anos, apesar de ser desconhecida sua idade com precisão. A vegetação da mata é diversa e de origem desconhecida, possuindo cerca de 1,80m de altura. As amostras foram coletadas em cinco pontos espaçados

aproximadamente 50 metros entre si e distribuídos ao longo de um transecto de 250 metros.

As coletas das amostras de rizosfera das plantas foram realizadas em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Agrobiologia. As duas fazendas estão localizadas no município de Boca do Acre, no Amazonas. Para o processamento das raízes foi utilizada uma peneira granulométrica em aço inox de diâmetro 8’’ e altura 2’’, e as amostras foram separadas em quantidades de aproximadamente 500 mg de solo rizosférico para a extração do DNA.

#### 4.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi feita com o kit comercial DNeasy PowerSoil (Qiagen®), seguindo as instruções indicadas pelo fabricante. A quantificação do DNA foi realizada através de dosagem utilizando o Nanodrop. Foi realizada a amplificação do gene *rrs* (que codifica para o 16S rRNA) por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os iniciadores U968F (5’ AACGCGAAGAACCTTAC 3’) acrescido de um grampo rico em GC (5’ CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG 3’) conforme Muyzer, De Waal e Uitterlinden (1993), e L1401R (5’ GCGTGTGTACAAGACCC 3’), como descrito por Nübel e colaboradores (1996) para a comunidade bacteriana total. As reações foram preparadas com um volume final de 25µl em tubo contendo uma mistura de tampão da enzima *Taq* polimerase 1x, 3,75mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP, 100nM de cada iniciador, 1,25U da enzima *Taq* polimerase, 1µl de DNA e água Milli-Q estéril. O ciclo aplicado foi 1x (2min 94°C); 30x (1min 94°C; 1min 55°C; 2min 72°C); 1x (10min 72°C); 4°C.

Para o estudo da população de actinobactérias, foi feita uma reação de PCR *semi-nested*, utilizando os iniciadores F243 (5’ AACGCGAAGAACCTTAC 3’), descrito por Heuer e colaboradores (1997), e L1401R (Nübel *et al.*, 1996) para a primeira reação e, em seguida, a segunda reação utilizando os iniciadores U968F acrescido de grampo GC (Muyzer, De Waal e Uitterlinden, 1993), e L1401R, conforme sequências já citadas acima (Nübel *et al.*, 1996). A primeira reação foi feita em um volume final contendo 25µl em tubo contendo uma mistura de tampão da enzima *Taq* polimerase 1x, 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM de cada dNTP, 150nM de cada iniciador, 1,5U da enzima *Taq* polimerase, 1µl de DNA da primeira reação e água Milli-Q estéril. O ciclo aplicado foi 1x (2min 94°C); 45x

(1min 94°C; 1min 55°C; 2min 72°C); 1x (10min 72°C); 4°C. A segunda reação foi a mesma descrita anteriormente para a comunidade bacteriana total.

Para confirmar a amplificação do gene *rrs*, os fragmentos gerados na PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TEB 1X (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989) com uma corrente elétrica de 80V por 65 minutos. Ao final da corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e revelado utilizando o aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System com o auxílio do software Image Lab™.

#### 4.3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Os géis da DGGE de comunidade total e de actinobactérias foram feitos utilizando o sistema “INGENYphorU” (INGENY, Leiden, NL®). Alíquotas dos produtos gerados por meio das PCRs foram aplicadas ao gel e submetidas a uma corrida de 140V durante 17h a 60°C, conforme descrito por Heuer e colaboradores (2001), para a comunidade bacteriana total, e 65V por 20h a 60°C para a população de actinobactérias (Gonzalez-Franco *et al.*, 2009). O gradiente desnaturante utilizado foi de 46,5%-60% para comunidade bacteriana total e de 46,5-70% para população de actinobactérias. Após a eletroforese, os géis foram corados utilizando 15µl de Syber Green em 100mL de água milli-Q sob agitação por 40 minutos. Posteriormente, os géis corados foram escaneados e visualizados utilizando o sistema STORM (Amersham Pharmacia Biotech).

#### 4.4 Análises estatística

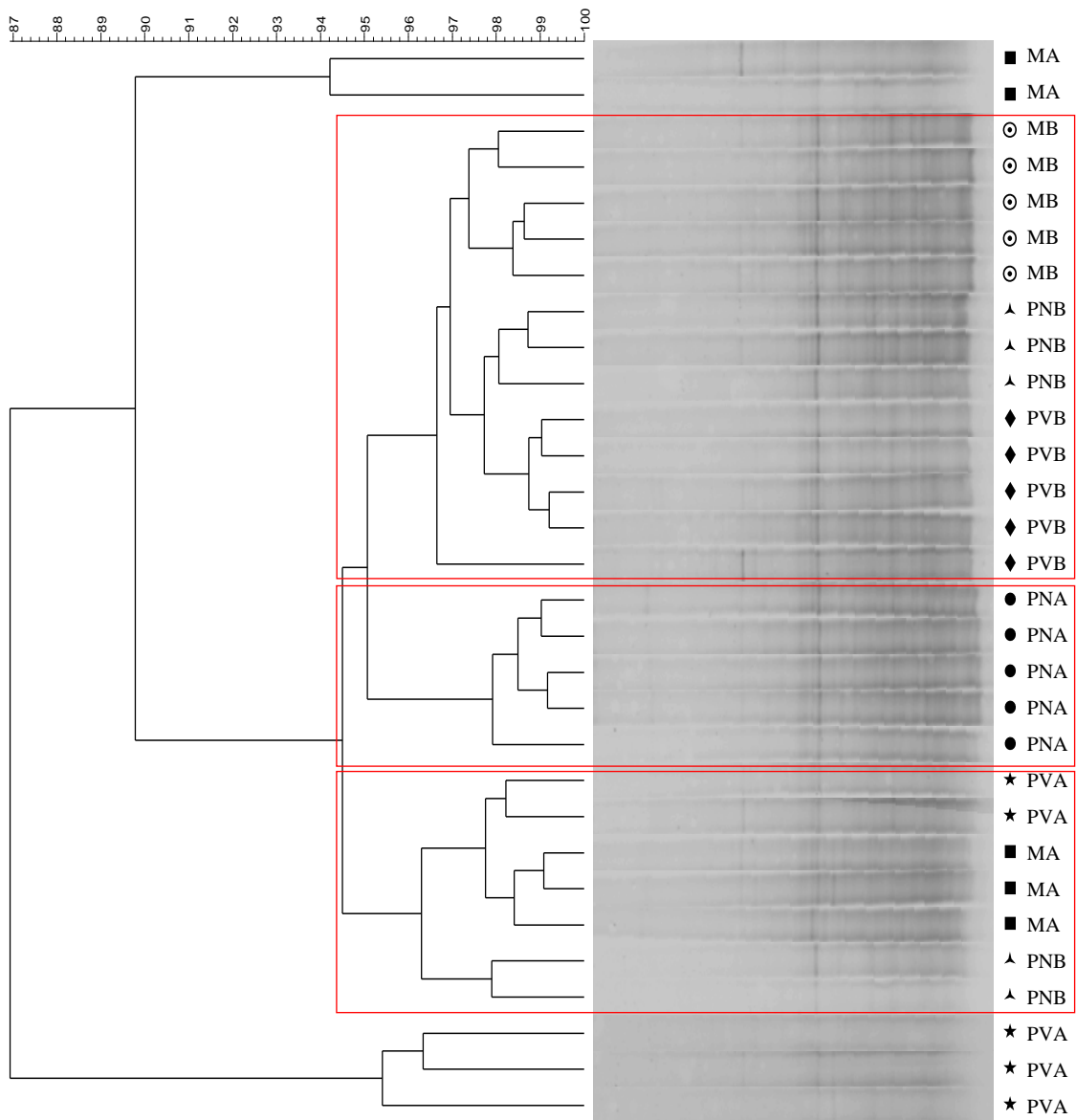
A análise do perfil de bandas foi feita utilizando o software Bionumerics®, a fim de obter dendrogramas e matrizes quantitativas a partir dos perfis de bandas gerados nas DGGEs. As matrizes quantitativas geradas pelas DGGEs foram analisadas estatisticamente utilizando o programa PAST versão 3.14 (Hammer, Harper e Ryan, 2001). O teste N-MDS (Non-Metric Multidimensional Scaling) foi utilizado para avaliar a tendência de agrupamento entre as amostras baseada nas matrizes geradas pela DGGE.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise da estrutura e diversidade da comunidade bacteriana total utilizando Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

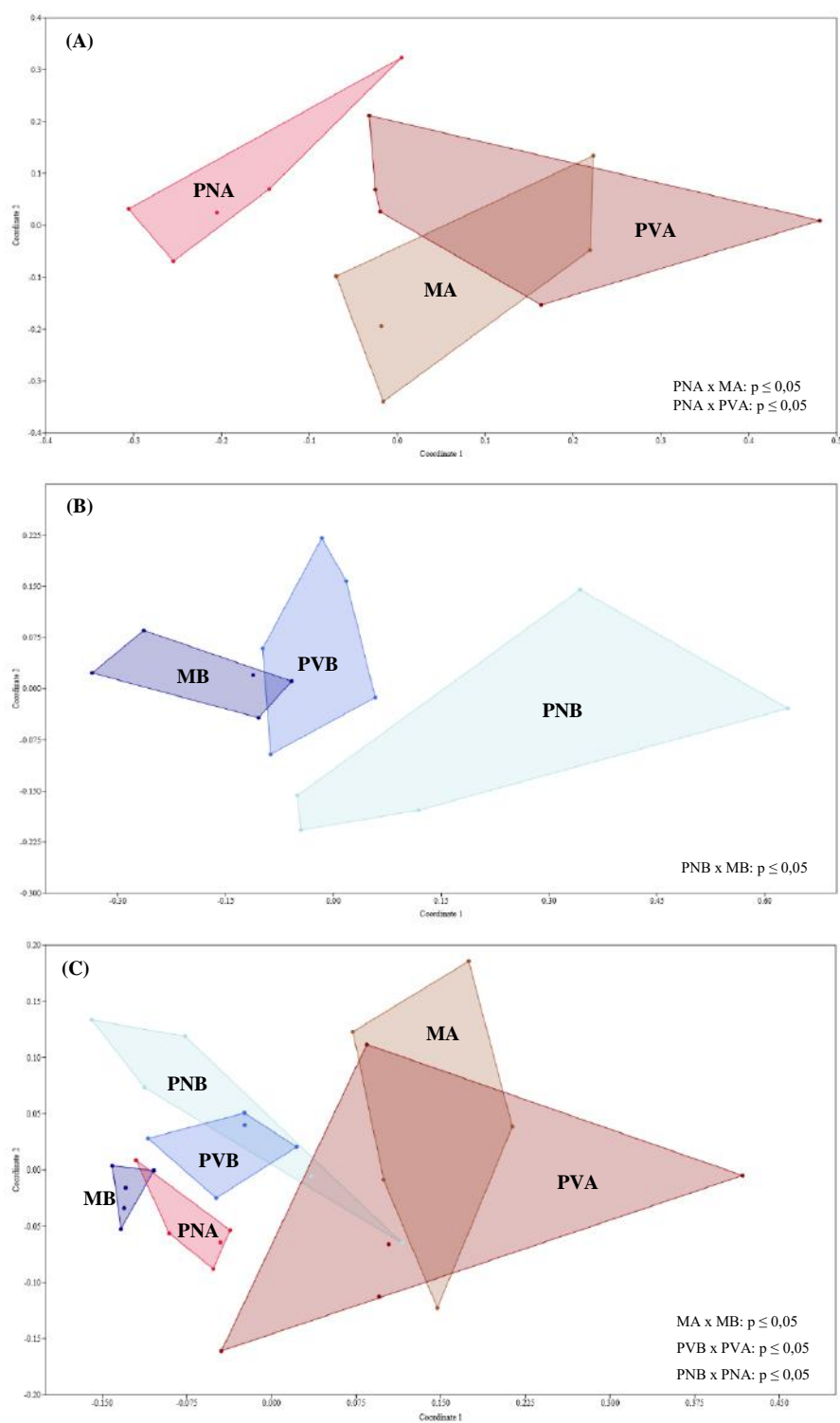
A técnica de PCR-DGGE foi utilizada para analisar a estrutura da comunidade bacteriana das amostras de rizosfera. O dendrograma gerado a partir da DGGE (Figura 1) revelou que há a formação de três grupos com aproximadamente 95% de similaridade. O primeiro grupo é formado pelas amostras de baixa incidência da doença; o segundo é composto pelas amostras de pasto novo de alta incidência e o terceiro contém as demais amostras de alta incidência (pasto velho e mata).

A matriz numérica gerada pelas bandas da DGGE foi submetida a uma análise multidimensional não-métrica (N-MDS) utilizando o programa de estatística PAST com o objetivo de mostrar graficamente a distribuição dessas amostras. Na Figura 2A podemos observar que na região AI as comunidades bacterianas das amostras de pasto novo (PNA) tendem a se separar das comunidades de pasto velho (PVA) e da mata (MA) de forma significativa pela coordenada 2 ( $p \leq 0,05$ ). Por outro lado, as comunidades bacterianas das amostras de pasto velho e de mata com alta incidência de Clb tendem a se agrupar (Figura 2A). Na Figura 2B, há uma tendência significativa de separação das comunidades bacterianas das amostras de pasto novo (PNB) das amostras de mata (MB) pela coordenada 2 nas regiões apresentando BI ( $p \leq 0,05$ ). Assim como em AI, as comunidades das amostras de mata e de pasto velho tendem a se agrupar (Figura 2B). Na Figura 2C, ao comparar AI com BI, é possível observar que as comunidades bacterianas de mata e de pasto velho de AI tendem a se separar das de pasto velho e mata de BI pela coordenada 2 ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, as comunidades bacterianas nas amostras de pasto novo de AI e BI tendem a se separar pela coordenada 1 ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 1.** Comunidade bacteriana total presente nas amostras de solo rizosférico coletadas em regiões de alta incidência (PNA, PVA e MA) e de baixa incidência (PNB, PVB e MB) de CIb. PNA e PNB são amostras de áreas de pasto novo com 1 ano de formação; PVA e PVB são de pasto velho com mais de 20 anos de formação; MA e MB são referentes a áreas de mata adjacente (idade desconhecida). Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de Pearson a partir da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Há a formação de três grupos principais, indicados pelos quadros vermelhos.



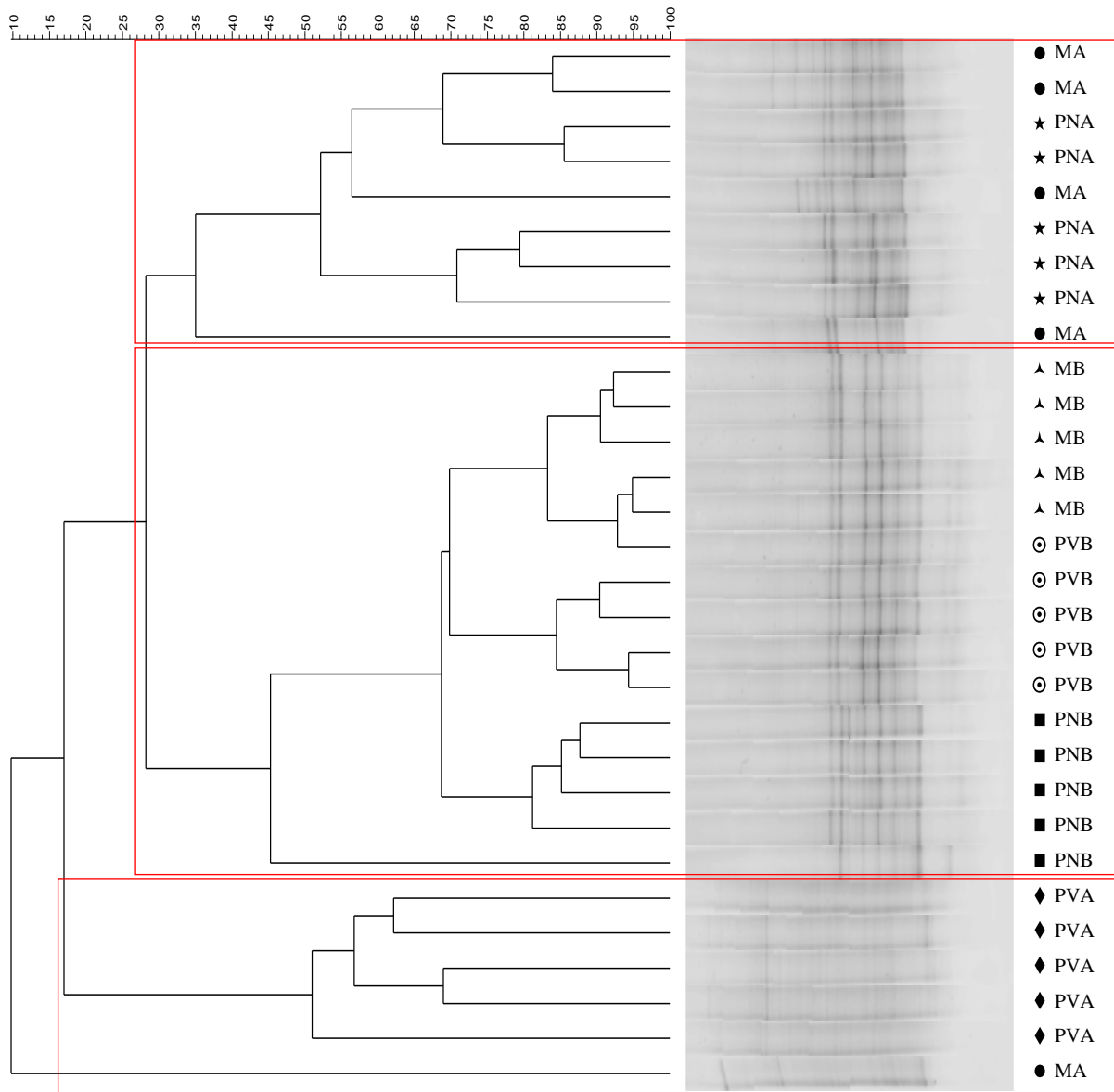


**Figura 2.** Análise N-MDS gerada a partir da matriz de padrões de bandas da DGGE da comunidade bacteriana total (baseada no rRNA 16S). **(A)** Comparação entre as comunidades bacterianas das amostras de pasto novo (PNA), pasto velho (PVA) e mata adjacente (MA) da fazenda de alta incidência (AI). **(B)** Comparação entre as comunidades bacterianas das amostras de pasto novo (PNB), pasto velho (PVB) e mata adjacente (MB) da fazenda de baixa incidência (BI). **(C)** Relação entre as comunidades bacterianas das amostras de AI e de BI.

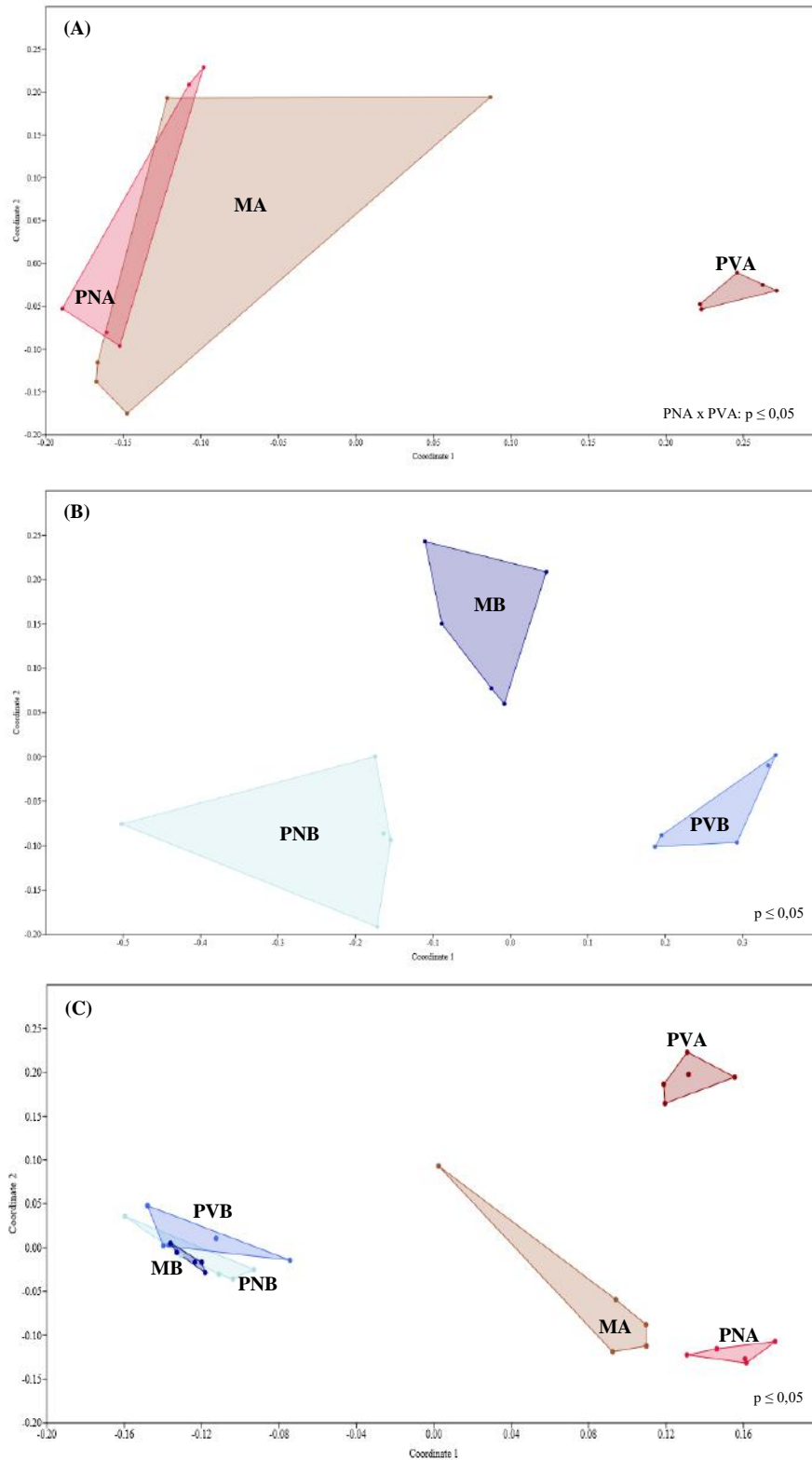
## 5.2 Análise da estrutura e diversidade da população de actinobactérias utilizando Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Foi utilizada uma reação *semi-nested* de PCR com o objetivo de amplificar majoritariamente o gene que codifica o rRNA 16S de bactérias do filo Actinobacteria. Em seguida, foi realizada a DGGE que, após análise pelo Bionumerics, gerou o dendrograma mostrado na Figura 3. Há a formação de dois grandes grupos com aproximadamente 30% de similaridade. O primeiro grupo é formado pelas amostras de baixa incidência enquanto o segundo grupo é composto pelas amostras de mata e de pasto novo de alta incidência. Além disso, um terceiro grupo é formado com 15% de similaridade, contendo majoritariamente as amostras de pasto velho apresentando alta incidência da doença.

A matriz numérica da DGGE foi submetida à análise N-MDS. Na Figura 4A é possível observar que a população de actinobactérias das amostras de pasto novo (PNA) se agrupa com a de mata (MA) nas regiões de alta incidência de Clb. Entretanto, a população de actinobactérias das amostras de pasto novo (PNA) tende a se separar significativamente da população das amostras de pasto velho (PVA) pela coordenada 2 ( $p \leq 0,05$ ). Na Figura 4B há uma tendência significativa de separação entre as populações de actinobactérias das amostras das três áreas: a de PNB e de PVB se separa pela coordenada 2 e a de MB se separa das demais (PNB e PVB) pelas coordenadas 1 e 2 ( $p \leq 0,05$ ). Por fim, na Figura 4C as populações das amostras de alta e baixa incidência tendem a se separar pela coordenada 2 ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3.** População de actinobactérias presente nas amostras de solo rizosférico coletadas em regiões de alta incidência (PNA, PVA e MA) e de baixa incidência (PNB, PVB e MB) de *Cib*. PNA e PNB são áreas de pasto novo com 1 ano de formação; PVA e PVB são de pasto velho com mais de 20 anos de formação; MA e MB são referentes a áreas de mata adjacente (idade desconhecida). Dendrograma gerado pelo método UPGMA utilizando-se o coeficiente de Pearson a partir da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Há a formação de três grupos principais, indicados pelos quadros vermelhos.



**Figura 4.** Análise N-MDS gerada a partir da matriz de padrões de bandas da DGGE da população de actinobactérias. **(A)** Comparação entre a população de actinobactérias das amostras de pasto novo (PNA), pasto velho (PVA) e mata adjacente (MA) da fazenda de alta incidência (AI). **(B)** Comparação entre a população de actinobactérias das amostras de pasto novo (PNB), pasto velho (PVB) e mata adjacente (MB) da fazenda de baixa incidência (BI). **(C)** Relação entre a população de actinobactérias das amostras de AI e de BI.

## 6 DISCUSSÃO

A diversidade metabólica dos microrganismos os torna essenciais para a manutenção da vida (Pace, 1997). A utilização de substratos e a excreção de produtos afeta diretamente as interações existentes em determinado habitat e podem favorecer ou prejudicar outros organismos, como plantas, animais e outros microrganismos. Como sugerido por Döbereiner e colaboradores (2000), a CIb se trata de uma consequência da interação entre actinobactérias do solo com a microbiota da cavidade oral bovina, favorecendo assim a proliferação de microrganismos patogênicos. Nesse caso, o principal fator que está associado à epizootia da doença é a abertura de novas áreas para pastagem, que aumenta a abundância de actinobactérias no solo (Baldani *et al.*, 1982), facilitando assim o desenvolvimento da doença. Devido ao pico de incidência da CIb ter coincidido com o período de expansão agropecuária no Brasil, áreas de pasto recém-cultivadas ou reformadas podem ser consideradas regiões de risco para o desenvolvimento da periodontite epizootica bovina.

A alimentação do gado através do pasto é o principal fator que leva ao desenvolvimento da doença, visto que a substituição da alimentação por uma ração balanceada torna possível a cura da doença (Rosa *et al.*, 1976). Em 1976, Döbereiner, Rosa e Lazzari acreditavam que a CIb poderia estar associada a presença de vegetação da espécie *Panicum maximum*. Em 1993, Dutra, Matsumoto e Döbereiner observaram que a doença era independente da vegetação local. No presente trabalho, ambas as regiões de pasto novo apresentam vegetação similar, composta pelos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*. Apesar disso, a doença prevaleceu em apenas uma dessas fazendas (AI), sugerindo que a composição da vegetação, de fato, não seria o principal fator associado à doença.

A análise do dendrograma para comunidade bacteriana total (Figura 1) revela que as amostras de BI possuem alta similaridade entre si, com exceção de duas amostras de PNB que se destacam das demais. Isso provavelmente acontece por conta do efeito recente do desmatamento no pasto novo que pode causar um desequilíbrio temporário na comunidade bacteriana que, teoricamente, tenderia a voltar ao equilíbrio ao longo do tempo (Souza *et al.*, 2012). Na região de alta incidência, as amostras do grupo PNA se agrupam com maior similaridade que as amostras dos demais grupos. Esse resultado sugere que em AI a comunidade bacteriana do pasto novo pode ter sofrido uma redução na diversidade de espécies e favorecimento na riqueza dos microrganismos mais resistentes ao impacto do desmatamento (Naeem e Li, 1997; Montecchia *et al.*, 2015). Ou seja,

dependendo da estrutura da comunidade bacteriana original, o desmatamento irá causar diferentes consequências na composição da microbiota no solo.

O N-MDS da comunidade bacteriana total (Figura 2) mostra, de acordo com a tendência de distribuição, que as comunidades bacterianas das amostras de pasto velho e de mata apresentam maior similaridade entre si e se agrupam, enquanto as comunidades das amostras de pasto novo se separam de ambas (Figuras 2A, 2B). A tendência de separação das comunidades entre as amostras de PNB e PVB não é significativa (Figuras 2B, 2C), indicando a possibilidade de que a comunidade bacteriana do pasto novo esteja se estabilizando após 1 ano de impacto e se tornando mais homogênea ao longo do tempo. Já em AI, as comunidades das amostras de PNA tendem a se separar das de MA e de PVA significativamente, enquanto as comunidades bacterianas das amostras destes dois últimos se agrupam (Figuras 2A, 2C). Esse resultado sugere que, para a comunidade bacteriana total, a distribuição se dá de acordo com o tempo de formação da vegetação.

Na fazenda de alta incidência a população de actinobactérias é bastante diversa. Os resultados revelam que a população das amostras de PNA e MA possuem maior similaridade entre si do que com a população de PVA (Figuras 3, 4A). Estudos mostram que tanto em regiões de floresta como de pasto novo as actinobactérias são abundantes (Girvan *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2013; Navarrete *et al.*, 2015), mas a diversidade dessa população pode ser variável. Além disso, a baixa disponibilidade de nutrientes no solo pode afetar a população de actinobactérias (Lewin *et al.*, 2016), o que pode justificar o comportamento das amostras do grupo PVA, já que o pasto possui mais de 20 anos de formação e existe a possibilidade de que o solo esteja degradado ou negligenciado. Técnicas de sequenciamento podem auxiliar a definir quais gêneros de actinobactérias estão mais abundantes nas regiões de alta incidência da CIB e, dessa forma, sugerir quais microrganismos poderiam estar envolvidos no desenvolvimento da epizootia.

Na Figura 4B verificamos que na fazenda de baixa incidência a população de actinobactérias das amostras dos grupos PNB, PVB e MB tendem se separar de forma significativa. Entretanto, quando comparamos as fazendas AI e BI (Figura 4C), observa-se que a distribuição da população das amostras se dá de acordo com a incidência da doença. Esse resultado corrobora com a hipótese principal do presente trabalho, determinada por Döbereiner e colaboradores (2000), que nas regiões de pasto novo ocorre uma alteração na população de actinobactérias. Essa alteração supostamente irá favorecer o estabelecimento de microrganismos patogênicos na cavidade oral bovina.

No presente trabalho, ambas as fazendas (AI e BI) apresentam regiões de pasto novo, sendo que apenas em AI ocorre a epizootia. É possível sugerir que essa diferença é causada por conta de aspectos físico-químicos e/ou pelo tipo de manejo do solo (Girvan *et al.*, 2003; Crowther *et al.*, 2014; Montecchia *et al.*, 2015). Além disso, a fazenda BI é onde menos de 20% dos animais apresentavam sintomas da doença no momento da coleta, o que não caracteriza a epizootia, mas ainda assim há desenvolvimento de periodontite bovina em poucos animais. No caso de fazendas de BI, pode ser que os animais que não apresentavam sintomas da CIb no momento da coleta venham a desenvolvê-la posteriormente, já que ainda não se sabe com exatidão o mecanismo de desenvolvimento da doença.

As técnicas de biologia molecular utilizadas no presente trabalho geraram resultados que corroboraram com as hipóteses levantadas, principalmente por Döbereiner e colaboradores (2000), acerca da periodontite epizootica bovina. Entretanto, em estudos posteriores, a utilização de técnicas mais específicas e/ou sensíveis, como PCR em tempo real e sequenciamento, se fazem necessárias para o melhor conhecimento em relação à origem da doença.

## 7 CONCLUSÕES

- A distribuição da comunidade bacteriana total se dá de acordo com o tempo de formação da vegetação nas diferentes amostras de rizosfera estudadas (pasto novo, pasto velho e mata);
- A estrutura da população de actinobactérias se mostrou diferente em regiões de alta e baixa incidência da CIb nas diferentes amostras de rizosfera estudadas (pasto novo, pasto velho e mata);
- A alteração da estrutura da população de actinobactérias em regiões de alta incidência da doença pode estar relacionada com o desenvolvimento da periodontite epizootica bovina.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC (2017). Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Perfil da Pecuária no Brasil: Relatório Anual 2018. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 14/08/2018.
- Akada, K. e Hirasawa, M. (2000). Expression of trypsin-like activity by the genera *Corynebacterium* and *Actinomyces* in canine periodontitis. *Journal of Medical Microbiology* 49(7), 621-625.
- Akkermans, A.D.L., Sajjad Mirza, M., Harmsen, H.J.M., Blok, H.J., Herron, P.R., Sessitsch, A. e Akkermans, W.M. (1994). Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 185-194.
- Balbino, L.C., Cordeiro, L.A.M., Porfírio-da-Silva, V., Moraes, A., Martínez, G.B., Alvarenga, R.C., Kichel, A.N., Fontaneli, R.S., Santos, H.P., Franchini, J.C. e Galerani, P.R. (2011). Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46(10), 1-12.
- Baldani, J.L., Baldani, V.L.D., Xavier, D.F., Boddey, R.M. e Döbereiner, J. (1982). Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. *Revista Microbiologia - São Paulo* 13, 250-263.
- Barreto, P., Pereira, R., e Arima, E. (2008). A Pecuária e o Desmatamento na Amazônia na Era das Mudanças Climáticas. Belém: Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia, 1-42.
- Blobel, H., Döbereiner, J., Lima, F.G.F. e Rosa, I.V. (1984). Bacterial isolations from “cara inchada” lesions of cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 4(2), 73-77.
- Colwell, R. (1997). Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18, 302-307.
- Crowther, T.W., Maynard, D.S., Leff, J.W., Oldfield, E.E., McCulley, R.L., Fierer, N. e Bradford, M.A. (2014). Predicting the responsiveness of soil biodiversity to deforestation: a cross-biome study. *Global Change Biology* 20, 2983-2994.
- Cunha, N.R.S., Lima, J.E., Gomes, M.F.M. e Braga, M.J. (2008). A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural* 46(2), 291-323.
- De Vries, F. T., Thébault, E., Liiri, M., Birkhofer, K., Tsiafouli, M. A., Bjørnlund, L., Bracht Jørgensen, H., Brady, M. V., Christensen, S., De Ruiter, P. C., D'Hertefeldt, T., Frouz, J., Hedlund, K., Hemerik, L., Hol, W. H., Hotes, S., Mortimer, S. R., Setälä, H., Sgardelis, S. P., Uteseny, K., Van der Putten, W. H., Wolters, V. e Bardgett, R. D. (2013). Soil food web properties explain ecosystem services across European land use systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(35), 14296-301.
- Decesaro, A., Rigon, M.R., Thomé, A. e Colla, L.M. (2013). Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova* 36(7), 947-954.
- Döbereiner, J. e Dämmrich, K. (1997). Are alveolar changes a determinant factor for “cara inchada” in cattle? *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17(2), 45-48.
- Döbereiner, J., Chaves, J.A., Rosa, I.V. e Houser, R.H. (1975). Efeito da transferência de bovinos com “cara inchada” (Doença peridentária) para pastos de região indene. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* 10, 99-103.
- Döbereiner, J., Dutra, I.S. e Rosa, I.V. (2004). A etiologia da “cara inchada”, uma periodontite epizootica dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24(1), 50-56.
- Döbereiner, J., Dutra, I.S., Rosa, I.V. e Blobel, H. (2000). “Cara inchada” of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(2), 47-64.
- Döbereiner, J., Inada, T. e Tokarnia, C.H. (1974). “Cara inchada”, doença peridentária em bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* 9, 63-85.
- Döbereiner, J., Rosa, I.V. e Lazzari, A.A. (1976). “Cara inchada” (doença peridentária) em bezerros mantidos em pastos de *Panicum maximum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* 11, 43-47.



- Döbereiner, J., Rosa, I.V., Dutra, I.S., Pereira, A.R. e Blobel, H. (1990). Efeito de espiramicina na profilaxia da “cara inchada” dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 10(1/2), 27-29.
- Dutra, I.S., Botteon, R.C.M. e Döbereiner, J. (2000). Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da "cara inchada" em bezerros transferidos para área indene. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(2), 71-74.
- Dutra, I.S., Matsumoto, T. e Döbereiner, J. (1993). Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associados ao manejo do solo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 13(1/2), 1-4.
- EMBRAPA (2005). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistemas de produção de gado de corte no Brasil: uma descrição com ênfase no regime alimentar e no abate. *Embrapa Gado de Corte/Documentos* 151. Disponível em: <[http://old.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc\\_pdf/doc151.pdf](http://old.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc_pdf/doc151.pdf)>. Acesso em: 14/08/2018.
- Fearnside, P.M. (2006). Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. *Acta Amazonica* 36(3), 395-400.
- Fearnside, P.M. (2010). Consequências do desmatamento da Amazônia. *Scientific American Brasil, Especial Biodiversidade*, 54-59.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M. e Ball, A.S. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied Environmental Microbiology* 69(3), 1800-1809.
- Gonzalez-Franco, A.C., Robles-Hernandez, L., Nuñez-Barrios, A., Strap, J.L. e Crawford, D.L. (2009). Molecular and cultural analysis of seasonal actinomycetes in soils from *Artemisia tridentata* habitat. *Phyton (Buenos Aires)* 78(2), 83-90.
- Grassmann, B., Döbereiner, J., Dutra, I.S., Kopp, P.A. e Blobel, H. (1997). Adherence and experimental infection of bacteria associated with periodontal infections of young cattle in Brazil (“Cara inchada”). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17(3/4), 123-125.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. e Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1), 1-9.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. e Wellington, E.M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8), 3233-3241.
- Heuer, H., Wieland, J., Schönfeld, J., Schönwälder, A., Gomes, N.C.M. e Smalla, K. (2001). Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. *Horizon Scientific Press, Wymondham, UK* 177-190.
- Huddleston, A. S., Cresswell, N., Neves, M. C., Beringer, J. E., Baumberg, S., Thomas, D. I. e Wellington, E. M. (1997). Molecular detection of streptomycin-producing streptomycetes in Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4), 1288-1297.
- Klink, C.A. e Machado, R.B.A. (2005). Conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1(1), 147-155.
- Leite, J.F. (2014). O enredo da conservação no estado de Goiás: possibilidades e desafios para a valorização do Cerrado em pé. Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 199 f.
- Lewin, G.R., Carlos, C., Chevrette, M.G., Horn, H.A., McDonald, B.R., Stankey, R.J., Fox, B.G. e Currie, C.R. (2016). Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual Review of Microbiology* 70, 235-254.
- Lopes, S.E., Fernandes, H.C., Vieira, L.B., Machado, C.C. e Rinaldi, P.C.N. (2006). Compactação de um solo de uso florestal submetido ao tráfego de arraste de madeira. *Revista Árvore* 30(3), 369-376.
- Loureiro, V.R. e Pinto, J. N.A. (2005). A questão fundiária na Amazônia. *Estudos Avançados* 19(54), 77-98.
- Luizão, F.J. (2007). Ciclos de nutrientes na Amazônia: respostas às mudanças ambientais e climáticas. *Ciência e Cultura* 59(3), 31-36.
- Machado, V.S. e Bicalho, R.C. (2014). Complete genome sequence of *Trueperella pyogenes*, an important opportunistic pathogen of livestock. *Genome Announcements* 2(2), e00400-14.
- McFarlane, R.A., Sleigh, A.C. e McMichael, A.J. (2013). Land-use change and emerging infectious disease on an island continent. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(7), 2699-2719.

- Mendes, L.W., Tsai, S.M., Navarrete, A.A., Hollander, M., Veen, J.A. e Kuramae, E.E. (2015). Soil-borne microbiome: Linking diversity to function. *Microbial Ecology* 70(1), 255-265.
- Menezes, B.B., Lemos, R.E., Scopel, I., Peixinho, D.M., Tommaselli, J.T.G. e Costa, M. (2009). Uso e ocupação agropecuária no Cerrado brasileiro; transformações da paisagem e seus impactos ambientais no estado de Goiás. In: 12º Encuentro de Geógrafos de América Latina, Montevideo. Caminando en una América Latina en Transformación. Disponível em: <<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal12/Procesosambientales/Impactoambiental/26.pdf>>. Acesso em: 24/09/2018.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2013). Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-2012-2013-a-2022-2023.pdf/view>>. Acesso em: 18/11/2018.
- Montecchia, M.S., Tosi, M., Soria, M.A., Vogrig, J.A., Sydorenko, O. e Correa, O.S. (2015). Pyrosequencing reveals changes in soil bacterial communities after conversion of Yungas forests to agriculture. *PLoS One* 10, e0119426.
- Moraes, S.S., Silva, G.N. e Döbereiner, J. (1994). Microelementos minerais e a “cara inchada” dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 14(1), 25-33.
- Moreira, D. e Lins, U. (2010). Técnicas de Microscopia para quantificação e identificação de microrganismo. *Revista Saúde e Ambiente* 5(2), 1-11.
- Morris, A.L., Guégan, J.F., Andreou, D., Marsollier, L., Carolan, K., Le Croller, M., Sanhueza, D. e Gozlan, R.E. (2016). Deforestation-driven food-web collapse linked to emerging tropical infectious disease, *Mycobacterium ulcerans*. *Science Advances* 2(12), e1600387.
- Mutlo, M.B. e Guven, K. (2015). Bacterial diversity in Çamalti Saltern, Turkey. *Polish Journal of Microbiology* 64, 37-45.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. e Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695-700.
- Naeem, S. e Li, S. (1997). Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* 390 (6659), 507-509.
- Navarrete, A.A., Tsai, S.M., Mendes, L.W., Faust, K., Hollander, M., Cassman, N.A., Raes, J., Veen, J.A. e Kuramae, E.E. (2015). Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. *Molecular Ecology* 24(10), 2433-48.
- Neto, M.S., Piccolo, M.C., Scopel, E., Junior, C.C., Cerri, C.C. e Bernoux, M. (2009). Carbono total e atributos químicos com diferentes usos do solo no Cerrado. *Acta Scientiarum. Agronomy* 31(4), 709-717.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W. e Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178 (19), 5636-5643.
- Nunes, S.G., Silva, J.M. e Schenk, J.A.P. (1990). Problemas com cavalos em pastagens de humidicola. *CNPGC* (37), e.0100-7807.
- Oliveira, V. M., Sette, L.D. e Fantinatti-Garboggini, F. (2006). Preservação e prospecção de recursos microbianos. *Multiciência* (7), 1-19.
- Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276 (5313), 734-740.
- Pires, M.O. (2013). O cadastro ambiental rural: das origens às perspectivas para a política ambiental. Brasília: Conservação Internacional, 1-44.
- Rappe, M.S. e Giovannoni, S.J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* 57, 369-394.
- Rodrigues, B.T. (2011). Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 250 p.

- Rodrigues, J.L.M., Pellizari, V.H., Mueller, R., Baek, K., Jesus, E.C., Paula, F.S., Mirza, B., Hamaoui Junior, G.S., Tsai, S.M., Feigl, B., Tiedje, M., Bohannan, B.J.M. e Nüsslein, K. (2013). Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. PNAS January 15 110(3), 988-993.
- Rosa, I.V., Carvalho, J.C., Houser, R.H. e Döbereiner, J. (1976). Influência de ração balanceada sobre a “cara inchada” (doença peridentária) de bezerros. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária 11, 59-63.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, eds. (New York, Cold Spring Harbor), pp 1626.
- Santos, S.A., Mazza, M.C.M., Sereno, J.R.B., Mazza, C.A.S., Pedreira, A.C.M.S., Mariante, A.S., Comastri Filho, J.A., Silva, J.A. e Marques, M.C.A. (2005). Descrição do manejo geral de cavalos pantaneiros na região do Pantanal. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Pantanal 63, 1-20.
- Soares-Filho, B.S., Nepstad, D.C., Curran, L.C., Cerqueira, G.C., Garcia, R.A., Ramos, C.A., Voll, E., McDonald, A., Lefebvre, P., Schlesinger, P. e McGrath, D. (2005). Cenários de desmatamento para a Amazônia. Estudos Avançados 19(54), 137-152.
- Souza, L.M., Schlemmer, F., Alencar, P.M., Lopes, A.A., Passos, S.R., Xavier, G.R., Fernandes, M.F., Mendes, I.C. e Reis Junior, F. B. (2012). Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. Pesquisa Agropecuária Brasileira 47(2/2), 269-276.
- Sundqvist, G., Johansson, E. e Sjögren, U. (1989). Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. Journal of Endodontics 15(1), 13-19.
- Takeuchi, H., Sumitani, M., Tsubakimoto, K. e Tsutsui, M. (1974). Oral microorganisms in the gingiva of individuals with periodontal disease. Journal of Dental Research 53(1), 132-136.
- Tanner, A.C., Haffer, C., Bratthall, G.T., Visconti, R.A. e Socransky, S.S. (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. Journal of Clinical Periodontology 6, 278-307.
- Tims, F.M., Dutra, I.S., Matsumoto, T. e Döbereiner, J. (1992). Eficiência de virginamicina na recuperação de bezerros com a doença peridentária "cara inchada". Pesquisa Veterinária Brasileira 12(3), 77-80.
- Van Elsas, J.D., Jansson, J.K. e Trevors, J.T. (2007). Methods to detect and quantify bacteria in soil. In: Modern Soil Microbiology. Taylor e Francis 3 (USA:CRC Press), 283-316.
- Van Hamme, J.D., Singh, A. e Ward, O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67, 503-549.
- Veiga, M.M., Silva, D.M., Veiga, L.B.E. e Faria, M.V.C. (2006). Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. Cadernos de Saúde Pública 22(11), 2391-2399.
- Vieira, I.C.G., Toledo, P.M., Silva, J.M.C. e Higuchi, H. (2008). Deforestation and threats to the biodiversity of Amazonia. Brazilian Journal of Biology 68(4, Suppl.), 949-956.
- Vilela, L., Martha Júnior, G.B., Marchão, R.L., Guimarães Júnior, R., Barioni, L.G. e Barcellos, A. (2008). Integração lavoura-pecuária. In: Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Faleiro F.G. e Farias Neto A.L., eds. (Planaltina: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica), pp.931-962.
- White, D. e Mayrand, D. (1981). Association of oral *Bacteroides* with gingivitis and adult periodontitis. Journal of Periodontal Research 16, 259-265.
- Winkelhoff, A.J., Steenbergen, T.J. e Graaff, J. (1988). The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. Journal of Clinical Periodontology 15, 145-155.