

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**Desempenho e Microbiota Fecal de Potros Equinos e Muare Desmamados
em Sistema de Pastejo Rotacionado**

Layanne Sthefany de Andrade Araújo

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DESEMPENHO E MICROBIOTA FECAL DE POTROS EQUINOS E
MUARES DESMAMADOS EM SISTEMA DE PASTEJO
ROTACIONADO

LAYANNE STHEFANY DE ANDRADE ARAÚJO

Sob a Orientação da Professor

Fernando Queiroz de Almeida

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal** no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Zootecnia.

Seropédica, RJ

Agosto de 2021

A658d Araújo, Layanne Sthefany de Andrade, 1994-
Desempenho e Microbiota Fecal de potros equinos e
muas desmamados em sistema de pastejo rotacionado /
Layanne Sthefany de Andrade Araújo. - Seropédica,
2021.
53 f.: il.

Orientador: Fernando Queiroz de Almeida.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal, 2021.

1. Potros - Pós-desmame - Crescimento - Teses. 2.
Microbioma - NGS - Fezes - Teses. 3. Microbiologia -
Cultivo - Teses. 4. Mangalarga Machador - Híbridos de
Jumento Pêga - Teses. 5. Microbiota fecal -
Diversidade - Teses. I. Almeida, Fernando Queiroz de,
1959-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal
III. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



TERMO Nº 1133 / 2021 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.076533/2021-28

Seropédica-RJ, 25 de outubro de 2021.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
LAYANNE STHEFANY DE ANDRADE ARAÚJO**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a)**, no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/08/2021.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Banca Examinadora:

Fernando Queiroz de Almeida, Dr.. UFRRJ - (Presidente)

Irene da Silva Coelho, Dr.^a UFRRJ

Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, Dr. USP

(Assinado digitalmente em 25/10/2021 20:30)
FERNANDO QUEIROZ DE ALMEIDA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.00.53)
Matrícula: 387015

(Assinado digitalmente em 25/10/2021 21:40)
IRENE DA SILVA COELHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.00.54)
Matrícula: 1815763

(Assinado digitalmente em 25/10/2021 20:27)
ALEXANDRE AUGUSTO DE OLIVEIRA GOBESSO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 083.241.348-83

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1133**, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **25/10/2021** e o código de verificação: **e89d5fcb61**

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus e minha família

"Afiml, o que é um cientista, então? Ele é um homem curioso que olha através dos olhos de uma fechadura, a fechadura da natureza, tentando saber o que está acontecendo"

(Jacques Yves Cousteau)

Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro de seu coração.

(Dalai Lama)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me proporcionar sabedoria, garra e persistência para alcançar meus objetivos, apesar dos obstáculos pelo fato de desbravar para Zootecnia gerando um grande desafio de trabalhar pela primeira vez com cavalos. E o fruto deste empenho, foi esta dissertação e, fechando com chave de ouro, o título de mestre.

À minha família, que sempre contribuiu em minha formação e incentivou-me a ter uma boa educação, mesmo estando longe leve vocês em meu coração.

Ao meu esposo, pelo apoio, incentivo e paciência mesmo que muitas vezes não tem pleno conhecimento sobre o assunto, mas opina e também aprende comigo. Gerando uma troca mútua de saberes.

Ao meu professor e orientador Fernando, por ter acreditado em mim, mesmo eu sendo bióloga e cursando um mestrado em Zootecnia, ofereceu uma oportunidade de trabalhar com microbiologia dos potros, espero ter superado as expectativas que tinha sobre mim, sou grata por sua paciência, dedicação e empenho contribuindo para o meu aprendizado, proporcionando as ferramentas e os meios, os quais permitiram concluir mais um ciclo na minha vida acadêmica.

À professora Irene, por dispor de seu tempo, laboratório, paciência e trocas de conhecimentos para me orientar sobre as técnicas moleculares e por me auxiliar diversas vezes quando dá algo errado e temos que encontrar saídas para reverter esses resultados.

À equipe do EQUILAB/LADEq que contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Em especial para as doutorandas Ana Carla e Bruna Franzan e os mestrandos Vinicius Alves e Lísia Krebs. Agradeço o companheirismo, amizade e incentivo em continuar os experimentos.

As bolsistas de Iniciação Científica Maria, Julcimara, Laritssa, Dafny, Larissa, Brenda e Ariadny muito obrigada pelo apoio e paciência sem vocês jamais teria concluído minha pesquisa.

À Apoio Técnico Taís e a Marjana aprendi muito com vocês, obrigada pelas trocas de conhecimento e pelas conversas, que foram essenciais para minha adaptação com a lida com os equinos. E como vocês transparecem o amor que tem pelos cavalos.

Aos trabalhadores do Setor de Equideocultura, Beto, Mineiro, Sr. Nori, Jorginho, Vitor e Oldair. Sou grata por passarem suas experiências de anos lidando com cavalos, a cada dia aprendo mais com vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por fornecer estrutura e os animais para realização desde projeto.

Agradeço a todos, que fizeram parte dessa etapa da minha vida.

Obrigada!

BIOGRAFIA

Layanne Sthefany de Andrade Araújo, filha de Lindoval dos Santos Araújo e Lindalva Maria de Andrade Araújo, nasceu no dia 29 de dezembro de 1994, na cidade de Machados, PE.

Iniciou sua graduação no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em 2012, onde desenvolveu as atividades acadêmicas como Monitora de Embriologia Geral e bolsista de Iniciação Científica, sob orientação da professora Dr^a. Brígida Thaís Luckwu de Lucena. Graduou-se em Biologia no ano de 2017.

Em 2019 ingressou no Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na UFRRJ, sob orientação do Professor Dr. Fernando Queiroz de Almeida, obtendo o título de Mestrado em Ciência Animal no ano de 2021.

RESUMO

ARAÚJO, Layanne Sthefany de Andrade. **Desempenho e Microbiota Fecal de Potros Equinos e Muares Desmamados em Sistema de Pastejo Rotacionado**. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O crescimento dos potros é marcado por mudanças dietéticas e essas variações proporcionam a maturação na microbiota presente no trato digestório, no entanto o desmame é um momento decisivo, visto que os potros terão que se alimentar de forma eficiente para garantir a manutenção e desenvolvimento. Esta pesquisa avaliou se os equídeos, forrageiras e períodos após o desmame refletiram em diferenças no crescimento e ganho de peso de potros desmamados, na microbiota e na diversidade bacteriana fecal. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3x2, sendo: 1º fator – potros *Equus caballus* e os potros híbridos muares ♂*Equus asinus* x ♀*Equus caballus*; o 2º fator – pastagens com os cultivares de Coast-cross, Florakirk e Tifton-85; e 3º fator – períodos I (período imediato pós-desmame) e II (período tardio pós-desmame). Realizou-se mensurações de peso corporal e medidas lineares em 12 potros recém-desmamados, sendo seis potros da raça Mangalarga Machador e seis potros muares resultantes do acasalamento de jumento Pêga e éguas Mangalarga Marchador. Os potros foram mantidos nas pastagens de *Cynodon dactylon*: Coast-cross, Florakirk e Tifton-85, em manejo rotacionado em cada tipo de forrageira, em intervalos de 20 dias, durante quatro meses. Em cada rotação de pastagem, amostras fecais foram coletadas em seis potros (3 equinos e 3 muares), no início e ao final do pastejo, para análises bromatológicas e microbiológicas. As técnicas dependentes de cultivo foram utilizadas para obter contagens de microrganismos com função fibrolíticas e independentes de cultivo para avaliar a composição da população bacteriana. Realizou-se o sequenciamento de nova geração Illumina Miseq da região V3-V4 do gene que codifica o RNA ribossomal 16S. As variáveis de desempenho animal, contagens em meio de cultivo, abundâncias relativas e índices de riqueza e diversidade foram submetidos a análise de variância utilizando o teste F ($p < 0,05$) e normalidade dos resíduos através do teste Shapiro Wilk ($p > 0,05$). As médias foram comparadas através do Teste Tukey ($p < 0,05$). Foram realizadas as análises multivariadas: Permanova ($p < 0,05$) e NMDS (Ordenação multidimensional não métrica) a partir dos dados das distribuições da OTUs. Comparou-se os grupos de tratamentos através do Lefse (análise discriminante linear do tamanho do efeito) com base nos grupos observados na análise de ordenação. Observou-se o predomínio da microbiota fecal de potros desmamados pelo filo Firmicutes (57%) seguido por Bacteroidetes (22%). Os muares apresentaram maior diversidade de espécies fibrolíticas indicando que eles possuem uma eficiência superior na degradação das fibras. Os fatores espécies, forrageiras e períodos após desmame refletiram em diferenças na comunidade bacteriana fecal nas contagens bacterianas, nas abundâncias relativas, nos índices de diversidade e no pH fecal. Apenas as forrageiras e períodos promoveram diferenças nas variáveis de desempenho corporal e as forrageiras que repercutiram em melhores ganhos foram o Florakirk e o Coast-cross. No período imediato ao desmame houve maior desenvolvimento dos animais e os potros superaram a altura mínima esperada, porém não atingiram o peso vivo estimado de acordo com o padrão racial para equino adulto Mangalarga Marchador.

Palavras-chave: pós-desmame, microbioma, crescimento, Mangalarga Machador.

ABSTRACT

ARAÚJO, Layanne Sthefany de Andrade. **Fecal Microbiota and Performance of Equine and Mule Foals Weaned in Rotational Grazing System**. 2021. 53p. Dissertation (Master Science in Animal Science). Animal Science Institute. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The development of foals is surrounded by dietary changes, and these variations provide for maturation in the microbiota present in digestive tracts. However, weaning is a turning point as foals will need to feed efficiently to ensure their maintenance and growth. This research evaluated whether equine species, forage and post weaning periods reflect differences in growth and weight gain of weaned foals, the microbiota and bacterial diversity of fecal samples. The research was carried out in completely randomized design in 2x3x2 factorial arrangement, being: 1st factor - *Equus caballus* foals and the mule foals ♂*Equus asinus* x ♀*Equus caballus*; the 2nd factor - pastures with Coast-cross, Florakirk and Tifton-85 cultivars; and 3rd factor - periods I (immediate post-weaning period) and II (late post-weaning period). Body weight measurements and linear measurements were carried out in 12 newly weaned foals, six foals of the Mangalarga Machador breed and six mule foals resulting from the mating of Pêga donkey and Mangalarga Marchador mares. The foals were kept in *Cynodon dactylon* pastures: Coast-cross, Florakirk and Tifton-85, in rotational management in each type of forage, at intervals of 20 days, for four months. In each pasture rotation, fecal samples were collected from six foals (3 horses and 3 mules), at the beginning and at the end of grazing, for bromatological and microbiological analyses. Culture-dependent techniques were used to obtain counts of microorganisms with fibrolytic function and culture-independent techniques to evaluate the composition of the bacterial population. Illumina Miseq next-generation sequencing of the V3-V4 region of the gene encoding 16S ribosomal RNA was performed. The variables of animal performance, counts in culture medium, relative abundances and richness and diversity indices were submitted to analysis of variance using the F test ($p < 0.05$) and normality of residuals was tested by the Shapiro Wilk test ($p > 0.05$). The means were compared using the Tukey test ($p < 0.05$). Multivariate analyses were performed: Permanova ($p < 0.05$) and NMDS (Non-metric multidimensional ordination) from the data of OTUs distributions. The treatments were compared using Lefse (linear discriminant analysis of effect size) based on the groups observed in the ordination analysis. The fecal microbiota of weaned foals was observed to be dominated by the phylum Firmicutes (57%) followed by Bacteroidetes (22%). Mules showed a higher diversity of fibrolytic species, indicating that they have a higher efficiency in fiber degradation. The factors species, pastures and periods reflected in differences in the fecal bacterial community in: bacterial counts, relative abundance, diversity indices and fecal pH. Only the pastures and periods promoted differences between the body performance measures, the forages that resulted in better gains were Florakirk and Coast-cross. In the period immediately after weaning, there was greater development of the animals and the foals exceeded the minimum expected height, but did not reach the estimated body weight according to the breed standard for the mature Mangalarga Marchador horse.

Keywords: post-weaning, microbiome, growth, Mangalarga Marchador.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.	Peso vivo e ganho de peso diário de equídeos em crescimento e adultos.....	8
Tabela 2.	Medidas morfométricas de equídeos em crescimento e adultos.....	8
Tabela 3.	Composição percentual dos ingredientes do sal mineralizado	9
Tabela 4.	Composição bromatológica das forrageiras Coast-cross, Florakirk e Tifton-85, na base da matéria seca.....	15
Tabela 5.	Efeitos dos tratamentos sobre os ganhos de peso e medidas corporais.....	21
Tabela 6.	Ganhos médios de peso e medidas lineares em função das interações entre forrageiras e períodos pós-desmame.....	22
Tabela 7.	Efeitos dos tratamentos sobre os valores médios de pH fecais e contagens bacterianas em meio de cultivo seletivos.....	22
Tabela 8.	Valores médios de pH fecal em função da interação entre forrageiras e períodos pós-desmame.....	23
Tabela 9.	Contagens médias de <i>Lactobacillus</i> spp. em função da interação entre espécies e períodos pós-desmame	23
Tabela 10.	Efeito dos tratamentos sobre a média do número de OTUs e os índices de Chao 1, Shannon e Simpson.....	24
Tabela 11.	Efeitos das interações entre espécies e forrageiras sobre as médias dos números de OTUs e dos índices de diversidade de Shannon e Simpson.....	25
Tabela 12.	Efeitos dos tratamentos sobre os percentuais médios das abundâncias relativas dos filos, famílias e gêneros bacterianos.....	27

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1.	Quadro de análise de variância das variáveis de desempenho animal.....	11
Quadro 2.	Quadro de análise de variância das análises microbianas das técnicas dependentes de cultivo.....	11
Quadro 3.	Quadro de análise de variância das análises microbianas das técnicas independentes de cultivo.....	12

,

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1.	Linha temporal da pesquisa: períodos, tipo de forrageira e eventos experimentais	10
Figura 2.	Mensuração da altura com hipômetro.....	13
Figura 3.	Mensuração de altura e perímetro.....	13
Figura 4.	Mensuração dos perímetros com fita métrica.....	14
Figura 5.	Coleta das amostras fecais nos potros.....	15
Figura 6.	Medição do pH fecal com pHmetro.....	16
Figura 7.	Diluição seriadas em solução mineral.....	16
Figura 8.	Resultado da inoculação em meio líquido.....	17
Figura 9.	Triplicata das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} no meio sólido.....	18
Figura 10.	Eletroforese em gel de agarose.....	19
Figura 11.	Curva de rarefação dos números de OTUs observados em doze tratamentos, que são combinação dos fatores espécies (equinos e muares), das forrageiras (Coast-cross, Florakirk e Tifton-85) e dos períodos (I e II)	24
Figura 12.	Percentual de abundância relativa dos filos nas espécies (equinos e muares), forrageiras (Coast-cross, Florakirk e Tifton-85) e períodos (I e II)	25
Figura 13.	Filos com abundância relativa inferior a 1% encontrados nos diferentes tratamentos experimentais.....	26
Figura 14.	Escala multidimensional não métrica (NMDS) da distribuição das OTUs utilizando o índice de similaridade Bray-Curtis dos fatores espécies, pastagens e períodos	28
Figura 15.	Comparação dos percentuais de abundância relativa das OTUs entre os dois grupos formados por equinos em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período I (EFP1+ETP1); equinos em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período II (EFP2+ETP2). Foram representadas as OTUs com diferenças significativas ($p < 0,05$) e frequências relativas igual ou maior que 0,6.....	29
Figura 16.	Comparação dos percentuais de abundância relativa das OTUs entre os dois grupos formados por muares em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período I (MFP1+MTP1); muares em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período II (MFP2+MTP2). Foram representadas as OTUs com diferenças significativas ($p < 0,05$) e frequências relativas igual ou maior que 0,6.....	29
Figura 17.	Comparação dos percentuais de abundância relativa das OTUs entre os três grupos formados pelas pastagens Coast-cross, Florakirk e Tifton-85. Foram representadas as OTUs com diferenças significativas ($p < 0,05$) e frequências relativas igual ou maior que 0,6	30

LISTAS DE ABREVIACÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µl	Microlitro
ml	Mililitro
g	Grama
kg	Quilograma
g/kg	Grama por quilograma
t	Tonelada
ng	Nanograma
m	Metros
cm	Centímetro
ha	Hectare
mm	Milímetro
mA	Miliampere
UV	Radiação ultravioleta
V	Volt
O ₂	Oxigênio
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
AGVs	Ácidos graxos voláteis
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Ácido desoxirribonucléico
LefSe	Linear discriminant analysis Effect Size
MRS	Meio de Man, Rogosa e Sharpe
NGS	Next Generation Sequencing
NMDS	Non-metric Multidimensional Scaling
NMP	Número mais provável
NRC	National Research Council
OTU	Operational Taxonomic Unit
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction
PE	Extremidade pareada
PERMANOVA	Permutational Multivariate Analysis of Variance
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Real-time quantitative PCR
RDP	Ribosomal Database Project
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _r	RNA ribossomal
16S	Subunidade do RNA ribossomal
T-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Importância da Equinocultura no Brasil	2
2.2 Colonização Inicial do Trato Digestório dos Potros	2
2.3 Desenvolvimento Alimentar de Potros	3
2.4 Pastagens para Potros em Crescimento	3
2.5 Técnicas para Análise da Microbiota do Trato Digestório dos Equídeos	4
2.5.1 Técnicas dependentes de cultivo	4
2.5.2 Técnicas independentes de cultivo	5
2.6 Colonização da Microbiota Fecal dos Potros	5
2.7 Microbiota Fecal dos Potros no Desmame e Pós-Desmame	6
2.8 Avaliação de Desempenho de Potros	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Local	9
3.2 Animais	9
3.3 Manejo e Dietas	9
3.4 Delineamento Experimental	10
3.5 Mensurações Lineares e de Peso	12
3.6 Coleta de Amostras das Pastagens	14
3.7 Análises Bromatológicas das Forragens	14
3.8 Coleta de Amostras Fecais	15
3.9 Mensuração do pH fecal	16
3.10 Análises Microbianas Dependentes de Cultivo	16
3.10.1 Concentração de anaeróbicos totais	17
3.10.2 Concentração de celulolíticas	17
3.10.3 Contagens de <i>Streptococcus</i>	17
3.10.4 Contagens de <i>Lactobacillus</i>	18
3.11 Análises Microbianas Independente de Cultivo	18
3.11.1 Extração do DNA	18
3.11.2 Eletroforese em gel de agarose	18
3.11.3 Quantificação do DNA	19
3.11.4 Construção da biblioteca genômica	19
3.11.5 Sequenciamento do DNA	19
3.12 Análises Estatísticas	19
3.13 Análises Bioinformáticas	20
3.14 Depósito das Sequências de Nucleotídeos	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Avaliação do Desempenho Corporal dos Potros	21
4.2 Análise Microbiana através de Técnicas Dependentes de Cultivo	21
4.3 Análise Microbiana através de Técnicas Independentes de Cultivo	23
4.3.1 Índices de diversidade e riqueza de espécies	23
4.3.2 Abundância relativa das comunidades bacterianas fecais	25

4.3.3 Análise multivariada das distribuições das OTUs.....	27
4.3.4 Análise das OTUs indicadoras (LefSe)	28
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	34
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
8 ANEXOS	42
A – Declaração de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso Animal.....	42
B – Análises de variância das variáveis de desempenho corporal	43
C – Análises de variância microbiológicas das técnicas dependentes de cultivo	44
D – Análises de variância utilizando testes não paramétricos.....	44
E – Análises de variância dos índices de riqueza e diversidade.....	45
F - Análises de variância da abundância relativa dos filos > 1%.....	46
G - Análises de variância da abundância relativa dos filos < 1%	48
H – Análises de variância da abundância relativa das famílias.....	50
I – Análises de variância da abundância relativa dos gêneros	52
J – Análises de variância da multivariada da distribuição das OTUs	53

1 INTRODUÇÃO

A microbiota do trato digestório de equídeos é composta por diversos microrganismos, que possuem papel fundamental para sobrevivência desses animais. Por serem herbívoros, há um consumo elevado de fibras provenientes das dietas, sendo indispensável a degradação desses componentes fibrosos, por esta diversidade de microrganismos através da fermentação. Gerando a energia necessária para a sobrevivência e a manutenção da saúde desses animais.

Em potros, a colonização microbiana ocorre de forma rápida e dinâmica, ela se inicia durante o nascimento, conforme o potro se desenvolve, esta microbiota sofre variações devido a mudanças dietéticas. Onde inicialmente ele é dependente da égua devido ingestão de leite materno, gradualmente os potros passam a pastear, consumir as fezes das éguas e tem contato com alimentos sólidos concentrados, seja devido a introdução deles no *creeper-feeding* ou em conjunto com as mães. Essas mudanças graduais para uma dieta sólida aliada ao desmame, tornam as comunidades bacterianas mais eficientes na digestão das dietas. Não há um consenso entre os estudos, de quando ocorre a estabilização microbiana em potros, porém sabe-se que a estrutura da comunidade bacteriana torna-se semelhante à de um equino adulto. O desmame ocorre entre 4 a 6 meses de idade, nessa fase ocorre o aumento da ingestão de volumoso e o crescimento rápido dos potros, sendo necessário um manejo nutricional adequado para que eles desenvolvam o esperado para seu padrão racial.

As gramíneas do gênero *Cynodon* destacam-se na alimentação de equídeos, devido a qualidade e quantidade de matéria seca produzida em clima tropical, bom valor nutritivo de proteínas e fibras e boa aceitação pelos animais. Sendo uma possível fonte alimentar, por apresentaram menores custos quando comparadas a produção de uma ração comercial.

A evolução das técnicas independentes de cultivo, em especial o sequenciamento de nova geração (NGS), tem ampliado o número de publicações com a temática de microbiota em diversas áreas. Os trabalhos com equídeos, são voltados a elucidar o papel e quais mudanças ocorrem na comunidade bacteriana nas fases do desenvolvimento dos potros, nas mudanças dietéticas e na compreensão de doenças. Essa técnica, tem proporcionado novos insights sobre as possíveis relações entre a microbiota, alimentação e o desempenho dos animais. Portanto, espera-se que as espécies, as pastagens e os períodos do desmame promovam diferenças na microbiota fecal, no crescimento e no ganho de peso dos potros.

São objetivos do presente estudo a descrição da composição da comunidade microbiana fecal de potros desmamados; a descrição e avaliação dos efeitos das espécies, forrageiras e períodos após desmame na diversidade bacteriana, na microbiota fecal bacteriana e no desempenho corporal dos potros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância da Equinocultura no Brasil

O Brasil apresenta a maior tropa de equídeos da América Latina, que ao somar as populações de equinos, muares (mulas e burros) e asininos (asnos), estima-se que eles representem 8 milhões de cabeças. O agronegócio do cavalo brasileiro, movimenta anualmente mais de R\$ 16 bilhões de reais e 3 milhões de empregos diretos e indiretos, com atividades voltadas para trabalho, esporte, lazer, terapia, dentre outros (MAPA, 2016).

Dentre as raças nacionais, a raça Mangalarga Machador, destaca-se pelo número expressivo de animais (600 mil cavalos registrados), por sua distribuição geográfica pelo território nacional e a beleza zootécnica dos animais, devido a conformação e aptidões para sela (MAPA, 2016; ABCCMM, 2016).

Os muares são equídeos híbridos provenientes do cruzamento entre machos asininos (*Equus asinus*) e fêmeas equinas (*Equus caballus*) ou machos equinos (*Equus caballus*) e fêmeas asininas (*Equus asinus*). Eles possuem características intermediárias das duas espécies, possuindo maior porte que asininos, beleza zootécnica, resistência física sendo capaz de suportar exercícios prolongados, tem adaptabilidade a climas quentes e alta capacidade de conversão alimentar (MIRANDA e PALHARES, 2017). As principais raças utilizadas para produção de muares no país são: jumento Nordestino, Paulista e Pêga. Os jumentos Pêga possuem atrativos econômicos no mercado nacional, na produção de novos reprodutores e de muares marchadores, criando híbridos com aptidões para montaria, transporte de cargas e em concursos de diversas modalidades (OLIVEIRA et al., 2007; McMANUS et al., 2010).

2.2 Colonização Inicial do Trato Digestório dos Potros

A colonização do trato digestório dos potros ocorre de modo rápido e dinâmico. Ela se inicia durante o nascimento, onde os recém-nascidos são expostos as microbiotas provenientes da vagina e pele da égua, do colostro e do ambiente (COSTA et al., 2016; LINDENBERG et al., 2019). No primeiro dia de vida dos potros, é possível encontrar no mecônio uma microbiota rica e diversa. Esta riqueza de espécies está relacionada a exposição dos animais ao ambiente, enquanto que o aumento na diversidade provém da variedade de microrganismos que possuem baixas abundâncias e tem caráter transitório (COSTA et al., 2019).

A alimentação com leite materno e a coprofagia são processos cruciais para a estabilização do microbioma intestinal dos potros. Nas primeiras semanas, a microbiota dos potros tem influência direta das éguas, devido a alimentação com leite materno e por ocorrer os primeiros episódios de coprofagia, onde o potro se alimenta com as fezes da mãe e adquire microrganismos capazes de digerir fibras (QUERCIA et al., 2019). Espera-se que até o primeiro mês de vida, ocorram mudanças na microbiota digestiva dos potros, pelo fato deles gradualmente terem contato com alimentos sólidos. O consumo de forragens e concentrado pode ocorrer durante o pastejo ou em conjunto com as éguas (DE LA TORRE et al., 2019).

Não há um consenso da comunidade acadêmica, de quando a comunidade bacteriana torna-se semelhante à de animais adultos. Os artigos citam 15 dias (QUERCIA et al., 2019), 30 dias (FAUBLADIER et al., 2014), 50 dias (LINDENBERG et al., 2019) e 60 dias de idade (COSTA et al., 2016; DE LA TORRE et al., 2019).

O mesmo ocorre com o desmame, quando artigos citam que detectaram algumas mudanças na microbiota na separação dos potros e éguas, porém Lindenberg et al. (2019) discordam que o desmame afete na composição bacteriana, isto porque os potros lactentes têm

acesso a alimentos sólidos junto as suas mães e, a transição para uma dieta sólida ocorre progressivamente antes do desmame propriamente dito.

2.3 Desenvolvimento Alimentar de Potros

O desenvolvimento dos potros é cercado de mudanças nutricionais sendo a primeira delas ocorrendo após o nascimento, visto que durante a gestação ele obtia nutrientes e energia através da placenta, em seguida, passou a se alimentar de forma ativa mamando o úbere da égua (EARING et al., 2012).

As primeiras fontes de alimentares são o colostro e o leite materno, que fornecem energia, imunoglobulinas, fatores que ativam o sistema imunológico e promovem o desenvolvimento ósseo, muscular e metabólico (BECVAROVA e BUECHNER-MAXWELL, 2012). A égua apresenta uma produção de leite crescente, até atingir o pico da lactação, por volta do 2º mês de lactação. Após esta fase, o leite materno não supre as exigências nutricionais requeridas para um potro em crescimento (SANTOS et al., 2005), sendo utilizada a estrutura de *creeper-feeding*, para fornecer uma suplementação concentrada exclusivamente para os potros antes do desmame e garantir que o potro alcance o desenvolvimento adequado de seu potencial genético (REZENDE et al., 2000).

Do nascimento até o desmame, os potros também passam a ingerir alimentos sólidos, devido aos hábitos de pastejo e coprofagia das fezes maternas (QUERCIA et al., 2019). O aumento gradual da ingestão de volumoso permite a maturação e eficiência da digestão das dietas, da fermentação anaeróbica e da microbiota especializada em degradar as paredes celulares vegetais das forragens. No entanto, essa eficiência da digestão de fibras é resultante de adaptações anatômicas que decorrem desde a seletividade e ingestão de melhores pastagens devido aos lábios, língua e dentes molares e pré-molares que tem a função de triturar as forragens, até a degradação e absorção do conteúdo celular no estômago, intestinos delgado e grosso (MEYER, 1995). Cerca de 75 a 90 % do conteúdo celular é digerido no intestino delgado (ALMEIDA et al., 1999) e, são definidos como os componentes não fibrosos (carboidratos não estruturais, lipídios e proteínas) e digeridos através da ação das enzimas pancreáticas. Por outro lado, a fração fibrosa composta por carboidratos estruturais, celulose, hemicelulose e ligninas são degradadas através da fermentação microbiana gerando vitaminas, ácidos graxos voláteis e aminoácidos (FRAPE, 2008; MORGADO et al., 2009). A produção de AGV's (acetato, propionato e butirato) fornecem a energia necessária para animais em manutenção e produção (SADET-BOURGETEAU e JULLIAND, 2012).

2.4 Pastagens para Potros em Crescimento

As forragens gênero *Cynodon* destaca-se na alimentação de animais em sistemas de produção de equinos, bovinos, ovinos e suínos (BURTON et al., 1993). Devido sua alta produtividade de matéria seca (MS), boa palatabilidade e digestibilidade, elevado valor nutritivo protéico e de fibras, baixos teores de fatores antinutricionais (VICTOR et al., 2007; GONÇALVES, 2012).

O Coast-cross surgiu do cruzamento *Cynodon dactylon* cv. Coastal bermuda e *Cynodon nlemfuensis* cv. Robusto, ele não possui rizomas, apresenta estolões longos, crescimento prostrado facilitando sua cobertura no solo, exige solos de alta fertilidade, não suporta alagamentos, mas é resistente a secas, geadas e ao pisoteio (LEITE e MACHADO, 1999).

O Florakirk também é um híbrido fruto do cruzamento do cultivar Callie (*Cynodon dactylon* var. *aridus*) com o Tifton 44, o cultivar é destinado para produção de feno por apresentar caule fino, boa produção e qualidade. Também exigem solos férteis, é estolonífera e

rizomatosa que possui persistência a seca e resistência ao frio. Quando comparada aos demais cultivares o Florakirk se diferencia das demais, por suportar melhor terras úmidas e períodos de encharcamento (MISLEVY et al., 1999).

O híbrido Tifton-85 surgiu do cruzamento do cultivar Tifton 68 (*Cynodon nlemfuensis*) com a espécie introduzida *Cynodon dactylon* (PI-290884) oriunda da África do Sul. Esta gramínea possui grande massa foliar, porte alto, rizomas grossos e estolões. Esses estolões são caules subterrâneos, que tem a função de armazenar carboidratos e nutrientes, permitindo que a planta resista a secas, geadas e pastejo. Este cultivar é recomendado na produção de equinos, gado de corte e leite, caprinos, suínos e ovinos. Devido sua alta palatabilidade, digestibilidade de aproximadamente 60%, alto teor de fibras e proteína bruta, por volta de 16% da matéria seca (BURTON et al., 1993).

Como o Brasil é um país de clima tropical, as gramíneas C4 possuem vantagem em relação as plantas C3. Como ambiente é quente e com elevada incidência solar, essas gramíneas são capazes de fixar maior quantidade de CO₂ através da fotossíntese e economizar água (OLTRAMARI e PAULINO, 2009). Esta alta atividade fotossintética do dossel das gramíneas do gênero *Cynodon*, possibilita a elevação da produtividade de matéria seca (kg/ha) (PEDREIRA, 1996).

Os principais constituintes das forragens são os carboidratos, eles são separados em duas categorias: fibrosos e não fibrosos. Os carboidratos fibrosos ou estruturais, celulose, hemiceluloses, juntamente a lignina compõem a parede celular vegetal, componentes que são digeridos lentamente através da fermentação microbiana. Os carboidratos não fibrosos são aqueles que podem ser degradados por hidrólise enzimática, sendo representados pelo amido, monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, frutanas, β -glucanas, galactanas e pectinas (HOFFMAN, 2009; MORGADO et al., 2009)

Trabalhos de pesquisa que avaliaram a composição bromatológica do gênero *Cynodon* citam que o teor médio de proteína bruta (PB) varia de 11 a 16% (HILL et al., 1996). A fibra de detergente neutro (FDN) possui os teores entre 65,86 a 82,25% (ÍTAVO et al., 2002; SARMENTO, 2010). Os teores médios de fibra de detergente ácido (FDA) devem ser inferiores a 40% e em relação a matéria seca (MS), quanto maior a idade da gramínea, conseqüentemente será mais elevada a produção de matéria seca, proporção de colmos e de tecido estrutural (GONÇALVES et al., 2012). O estudo desenvolvido por Dittrich et al. (2005) evidenciam que os equinos possuem seletividade de pastejo, onde os mesmos têm preferência por plantas com maior massa de folhas verdes, dosséis altos e perfilhos com maior altura para que o animal possa colher maior quantidade de forragem a cada bocado realizado. A preferência por cultivares do gênero *Cynodon* spp foram: Tifton-85, Coast-cross 1 e Jiggs (DITTRICH et al., 2001; RADÜNZ, 2005).

2.5 Técnicas para Análise da Microbiota do Trato Digestório dos Equídeos

2.5.1 Técnicas dependentes de cultivo

As primeiras avaliações da microbiota bacteriana presente no trato digestório de equídeos foram baseadas em técnicas de cultivo. Havia duas formas de avaliação: uma geral, quantificando-se o número total de bactérias presentes no intestino delgado (MACKIE e WILKINS, 1988), estômago e alguns segmentos intestinais e fezes (DE FOMBELLE et al., 2003) ou apenas das fezes (FURET et al., 2009). A outra forma de análise é direcionada a microrganismos específicos: anaeróbios totais, bactérias celulolíticas, *Lactobacillus* e *Streptococcus* no ceco (BAILEY et al., 2003), no estômago (VARLOUD et al., 2007), colón (RESPONDEK et al., 2008; MUHONEN et al., 2009) e fezes (GARRETT et al., 2002;

HARLOW et al., 2015).

Entretanto, o cultivo bacteriano tem a capacidade de isolar uma pequena fração da microbiota, não representando a comunidade como um todo e, em alguns casos, o cultivo não possui sensibilidade necessária para detectar diferenças ou mudanças nas populações bacterianas. Por outro lado, se essas ferramentas forem direcionadas para detecção de microrganismos específicos, cultiváveis, em especial para aqueles que apresentam baixa abundância através do enriquecimento de culturas, a técnica torna-se mais eficiente que as metodologias independentes de cultivo (COSTA e WEESE, 2012).

A evolução para técnicas independentes de cultivo e bioinformática tem ampliado a compreensão da complexidade do microbioma do trato digestório de equídeos buscando compreender as relações entre a microbiota, os animais e o ambiente, assim como, avaliar quais fatores auxiliam na manutenção da saúde e quais mudanças repercutem em doenças nos animais (COSTA e WEESE, 2012).

2.5.2 Técnicas independentes de cultivo

Os primeiros trabalhos utilizando ferramentas da biologia molecular eram baseados na impressão digital da comunidade bacteriana (*fingerprinting*), ou seja, cada espécie bacteriana gerava um padrão de banda específico na eletroforese. Há dois trabalhos utilizam técnicas eletroforéticas (EARING et al., 2012; FAUBLADIER et al., 2014) e cinco que empregam a plataforma de sequenciamento Illumina (COSTA et al., 2016; DE LA TORRE et al., 2019; LINDENBERG et al., 2019; QUERCIA et al., 2019; HUSSO et al., 2020).

2.6 Colonização da Microbiota Fecal dos Potros

O início da colonização da microbiota do trato digestório de potros ocorre durante o parto, pelo contato com a vagina e com a pele da égua, em seguida pela amamentação com colostro (DOMINGUEZ-BELLO et al., 2010).

Corroborando o trabalho anterior, Husso et al. (2020) utilizando o PCR quantitativo (qPCR) e sequenciamento de nova geração (NGS) Illumina, foram capazes de detectar no mecônio 20 minutos após o nascimento pequenas quantidades de DNAs bacterianos, eles apresentavam um perfil mais similar as fezes das éguas do que a microbiota oral, sendo composta pelos filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Também verificaram que a diversidade no momento imediato ao nascimento era maior do que a observada após 24 horas, por isso que os filos dominantes reduziram apenas para Firmicutes e Proteobacteria, enquanto alguns potros eram dominados por gêneros únicos e, no 7º dia os potros possuíam gêneros diferentes das fezes de cavalos adultos. A microbiota pertencente a égua contribuiu com a colonização da microbiota 1º e 7º dia após o nascimento, os microrganismos mais abundantes na microbiota vaginal eram *Lactobacillus* representados pelos gêneros *Corynebacterium*, *Porphyromonas*, *Campylobacter* e *Helcococcus*, na mucosa oral houve predomínio do gênero *Gemella*. Os autores concluíram que o intestino dos potros é colonizado imediatamente após o nascimento, mas que essa microbiota do recém-nascido muda rapidamente.

Quercia et al. (2019), utilizando a mesma técnica de sequenciamento, investigaram a microbiota de potros do parto até 10º dia de idade através de amostras do líquido amniótico, colostro, mecônio e fezes. Identificou-se que do 1º ao 3º dia, nas amostras fecais são encontrados microrganismos provenientes do colostro, como *Enterococcus* e *Enterobacteriaceae*, enquanto do 3º ao 5º dia começa haver perda de bactérias presentes no leite. Os autores associam a mudança na microbiota ao hábito de coprofagia onde os potros

adquiriram microrganismos dos gêneros *Prevotella*, *Blautia* e *Ruminococcus*, bactérias capazes de degradar e fermentar a fibra, gerando ácidos graxos de cadeia curta que são uma das principais fontes de energia para equinos. Desta forma, a égua proporciona ao potro a maturidade intestinal, através do consumo do leite materno, como também através da ingestão de suas fezes e de outros animais, gerando mudanças gradativas na microbiota dos potros e tornando-a semelhante à égua.

Lindenberg et al. (2019) examinaram a microbiota de potros, do nascimento até o pós-desmame, quando estavam sendo alimentados com ração concentrada, alfafa e feno de gramíneas, concluindo que do 7º ao 20º dia de idade a microbiota fecal eram semelhantes a observadas no leite e canal vaginal da éguas e, que entre o 20º e o 50º dia pós-parto a microbiota fecal tornou-se cada vez mais dominada por espécies que fermentam fibras, com estabilização da microbiota intestinal ocorrendo por volta 50º dia pós-parto.

Ao pesquisar o microbioma fecal de éguas e potros, do nascimento ao 9º mês de idade, em pares de égua e potros Quarto de Milha, Costa et al. (2016) relatam que a microbiota no primeiro dia de vida do potro é complexa e possui predomínio de bactérias do filo Firmicutes e outros gêneros únicos desse período e, que entre o 2º ao 30º dia há o predomínio de espécies bacterianas do gênero *Akkermansia*, no entanto quando a microbiota é comparada com a do equino adulto, apresenta menor diversidade, sendo o microbioma estável e similar ao da égua mãe aos 60 dias após do nascimento.

Ao verificar a microbiota do nascimento até o desmame, De La Torre et al. (2019) relatam que a população bacteriana inicial (Dia 1) são dominadas por microrganismos capazes de metabolizar leite, principalmente do filo Proteobacteria e gênero *Acinetobacter*. Do 7º ao 28º dia continua o predomínio do mesmo filo, do 28º dia até o desmame, Firmicutes e Bacteroidetes tornam-se os filos dominantes. As alterações estão associadas a mudanças da alimentação aos 2 meses de idade, quando a microbiota dos potros passa a ser composta de bactérias capazes de digerir o material vegetal fibroso (forragens) e se assemelham à de equinos adultos, similar ao observado por Costa et al. (2016).

2.7 Microbiota Fecal dos Potros no Desmame e Pós-Desmame

O desmame é uma fase crítica do desenvolvimento do cavalo, porque nela ocorre a separação da égua e o potro (SARRAFCHI e BLOKHUIS, 2013). Na natureza essa separação ocorre de forma tardia por volta dos oito meses de idade porque é necessário que a égua em gestação se prepare para novo ciclo de amamentação de um novo potro (HENRY et al., 2012).

Ele pode ocorrer de forma abrupta ou progressiva, durante o período de amamentação, sendo recomendado o uso de *creep feeding* que é uma estrutura de alimentação exclusiva para os potros e que tem o objetivo de suplementar a dieta láctea dos potros com concentrado afim de garantir sua nutrição e crescimento, visto que a égua bem nutrida supre totalmente as necessidades nutricionais dos potros apenas nos dois primeiros meses de idade (APTER e HOUSEHOLDER, 1996; SANTOS et al., 2005).

Mach et al. (2017) avaliaram se o método de desmame dos potros afeta a composição da microbiota fecal através do IlluminaMiseq. E observaram que os potros submetidos ao desmame abrupto apresentam espécies benéficas pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Paraprevotella* e *Ruminococcus*, enquanto bactérias do gênero *Streptococcus* e fungos predominaram após o desmame progressiva. O desmame reduziu a composição da microbiota dos potros em três comunidades distintas, mas aqueles potros que continham a comunidades bacterianas compostas por *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Clostridium* XI e *Blautia* spp. alcançaram maior ganho médio diário de peso, sendo assim essas espécies proporcionaram melhor adaptação ao estresse do potro após o desmame.

Costa et al. (2016) utilizando NGS Illumina acompanharam o desenvolvimento da microbiota de potros do nascimento até os nove meses. Eles foram alimentados com feno e ração concentrada com polpa de beterraba. Os autores verificaram mudanças na diversidade microbiana a nível de filo e que no pós-desmame há maior abundância de Fibrobacteres, ou seja, houve aumento do número de bactérias que degradam o material fibroso da dieta.

Em outra pesquisa avaliou-se as mudanças na diversidade bacteriana do nascimento até o desmame, os autores relatam que as populações bacterianas seguiram um padrão ao longo da infância dos potros. À medida que os potros fazem a transição alimentar do leite materno para uma dieta de grãos e forragem, ocorre mudanças reconhecíveis na microbiota fecal. Durante a infância predominam nas fezes bactérias com capacidade de metabolizar o leite, após o desmame ocorrem mudanças nas populações passando a serem capazes de utilizar material vegetal fibroso (DE LA TORRE et al., 2019).

Pesquisadores chineses analisaram a diversidade microbiana de asininos em diferentes idades, a dieta era composta por concentrado padrão e palha de soja. Aos autores também apontam a idade como um fator chave de sucessão microbiana, visto que a diversidade aumentou conforme os animais envelheceram. O desmame foi um momento crucial, visto que a microbiota tornou-se semelhante à de um animal adulto. Assim como, a microbiota muda com a idade as vias metabólicas tornaram-se melhores em jumentos adultos por volta dos 12 a 24 meses de idade (XING et al., 2020).

Discordando dos resultados dos três artigos anteriores, Lindenberg et al. (2019) observaram que o desmame não teve grande impacto na composição microbiana, pelo fato da introdução gradual da dieta sólida ocorrer bem antes do desmame, visto que os potros têm acesso ao concentrado em conjunto com suas mães. Faubladier et al. (2017) avaliaram a digestibilidade e os principais microrganismos presentes nas fezes de potros aos 6 meses de idade, alimentados com feno e concentrado peletizado. Os autores associaram as mudanças à transição da dieta a base de leite para sólida, refletiu no aumento no coeficiente de digestibilidade aliada a elevada degradação da fibra dietética durante o pós-desmame.

No pós-desmame as taxas de crescimento dos potros são reduzidas e, aumenta-se o risco de doenças e lesões desses animais, sendo recomendado que antes ou após o desmame os animais sejam vacinados e vermifugados, isto porque após o desmame a imunidade diminui deixando os potros mais susceptíveis a doenças (APTER e HOUSEHOLDER, 1996).

2.8 Avaliação de Desempenho de Potros

Há trabalhos voltados a avaliar o desempenho dos potros com o intuito de investigar se os animais estão com peso e crescimento adequado para o padrão da raça estudada (Tabela 1), sendo realizadas a avaliação do peso corporal utilizando balanças ou fita métrica afim de obter o peso vivo (PV), ganhos de peso (GP) ou ganho de peso diários (GPD) dos animais. Dentre os principais artigos científicos com enfoque no desempenho dos pesos corporais de equídeos, quatro abordam equinos Puro sangue (TOMPSON, 1995; NRC, 1989; NRC, 2007; RINGLER e LAWRENCE, 2008), outros dois equinos Mangalarga Machador (REZENDE et al., 2000; ABCCMM, 2016) e, um artigo com asininos da raça Jumento Pêga (MOREIRA et al., 2016).

Na avaliação do desempenho e crescimento dos potros são realizadas mensurações das medidas lineares ou morfométricas (Tabela 2). Um artigo utilizou equinos da raça Puro sangue inglês (THOMPSON, 1995), três artigos citam as medidas de Mangalarga Machador (REZENDE et al., 2000; ABCCMM, 2016; RIBEIRO et al., 2018), um artigo com equinos da raça Quarto de Milha (RODRIGUES et al., 2017) e há três artigos investigando muare e asininos (ESCODRO et al., 2014; MOREIRA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017).

Tabela 1. Peso vivo e ganho de peso diário de equídeos em crescimento e adultos.

Artigo	Raça	Idade	PV (kg)	GPD (g/dia)
NRC (1989)	PSI	6 meses	240	0,73 (CM)
		12 meses	254	0,93 (CR)
Thompson (1995)	PSI	6 meses	260,5 M	0,63 (CM)
		12 meses	256,4 F	0,78 (CR)
Rezende (2000)	MM	6 meses	364,5 M	
		12 meses	363,3 F	
NRC (2007)	PSI	6 meses	181,6	
		12 meses	253	
Ringler e Lawrence (2008)	PSI	6 meses	252	0,84
		12 meses	375	0,54
Moreira et al. (2016)	JP	6 meses	254	0,82
		12 meses	367	0,42
ABCCMM (2016)	MM	Adultos	119,5	
			350 a 550	

Legenda: PSI= Puro Sangue Inglês; MM= Mangalarga Machador; JP= Jumento Pêga; PV= Peso vivo; GPD= ganho de peso diário; M= Macho; F= fêmea; CM= crescimento moderado; CR= crescimento rápido.

Tabela 2. Medidas morfométricas de equídeos em crescimento e adultos.

Artigo	Raça	Idade	AC (cm)	AG (cm)	CC (cm)	PT (cm)	PC (cm)
Thompson (1995)	PSI	6 meses	132,1 M	134,4 M	123,4 M	123,4 M	
			132,6 F	135,1 F	123,2 F	123,2 F	
		12 meses	146,3 M	148,8 M	141 M	364,5 M	
			146,6 F	148,3 F	140 F	363,3 F	
Rezende (2000)	MM	6 meses	125,9			131	
			123,2			127,6	
		12 meses	134,3			145,5	
			133,2			141,7	
Escodro et al. (2014)	Equinos	Adultos	138	137	138	159	17,5
	Muare		129	130	129	149	15,8
	Asininos		106	109	113	124	13,5
ABCCMM (2016)	MM	Adultos	152 M				
			146 F				
Moreira et al. (2016)	JP	6 meses	110,7	114,7	104,4	108,4	14,1
Rodrigues et al. (2017)	QM	Adultos	149,5	151,6	104,2	182,6	19,5
	Muare		145,4	146,3	101	167,6	18,4
	JP		130,2	134,1	110,8	15,1	16,6
Ribeiro et al. (2018)	MM	6 meses	125,5 M				
			123,4 F				
		12 meses	127,3 M				
			132,3 F				

Legenda: PSI= Puro Sangue Inglês; MM= Mangalarga Machador; JP= Jumento Pêga; QM= Quarto de Milha; M= machos; F= fêmeas; AC= altura na cernelha; AG= altura na garupa; CC= comprimento corporal; PT= perímetro torácico; PC= perímetro da canela.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi conduzido no Setor de Equideocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em Seropédica, Rio de Janeiro. As análises microbianas dependentes de cultivo foram desenvolvidas no Laboratório de Pesquisas em Saúde Equina (EQUILAB) e as independentes de cultivo no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Instituto de Veterinária. As análises bromatológicas foram conduzidas no Laboratório de Bromatologia Animal do Instituto de Zootecnia. O projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais - CEUA/IZ/UFRRJ nº 0063-07-2019.

3.2 Animais

Utilizou-se doze potros recém-desmamados, sendo seis equinos da raça Mangalarga Machador e seis muares resultantes do cruzamento de Jumento Pêga e éguas Mangalarga Machador. Os animais nasceram de outubro a novembro de 2018 e foram desmamados de modo abrupto por volta dos seis meses de idade. O ensaio experimental teve duração de quatro meses, de junho a outubro de 2019. Nas avaliações do desempenho animal foram utilizados 12 potros (seis equinos e seis muares). Nas análises microbianas dependentes de cultivo foram avaliados em 8 potros (quatro equinos e quatro muares) e, nas análises microbianas independentes de cultivo foram avaliados 6 potros (três equinos e três muares).

3.3 Manejo e Dietas

O manejo sanitário consistiu no controle de ectoparasitas e endoparasitas. Houve a doma inicial com o uso de cabrestos, escovação e manuseio semanal dos animais. Os potros foram mantidos em três piquetes em manejo rotacionado, onde consumiram *ad libitum* as forragens de Coast-cross (*Cynodon dactylon* (L.) Pers. cv. Coast-cross), Florakirk (*Cynodon dactylon*) e Tifton-85 (*Cynodon* spp. cv. Tifton-85). A cada 20 dias coletava-se as amostras fecais, mensurava-se os potros e a permuta dos animais para um novo piquete. Ocorreram duas rotações nos três piquetes, onde o período I, com os animais na idade de 6 a 8 meses, correspondendo a primeira rotação nos piquetes. Neste período foram realizadas três coletas fecais e de mensurações. No período II, com os animais na idade de 8 a 10 meses, houve a segunda rotação nos piquetes e as três últimas coletas fecais e mensurações dos potros. Dentro de cada piquete os animais tinham livre acesso a água e havia um cocho coletivo onde foram fornecidos em média 20 g de sal mineralizado por potro diariamente (Tabela 3).

Tabela 3. Composição percentual dos ingredientes do sal mineralizado.

Ingredientes	g / kg	%
Cloreto de Sódio	338g	33,8
Fosfato Bicálcico	416g	41,6
Calcário Calcítico	243g	24,3
Sulfato de Cobre	3g	0,3

Legenda: g/kg= gramas por quilo; %= Porcentagem.

3.4 Delineamento Experimental

A pesquisa foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em um esquema fatorial, de acordo com modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = m + E_i + F_j + P_k + E_{Fij} + E_{Pik} + F_{Pjk} + E_{FPijk} + e_{ijkl}, \text{ em que:}$$

Y_{ijkl} = corresponde ao l -ésimo nível das variáveis respostas avaliadas para a espécie i , pastagens j e períodos k ;

m = corresponde à média geral do experimento;

E_i = corresponde ao efeito do fator espécie ($i = 1, 2$);

F_j = corresponde ao efeito do fator pastagens ($j = 1, 2$ e 3);

P_k = corresponde ao efeito do fator períodos ($k = 1, 2$);

E_{Fij} = corresponde ao efeito de interação entre os fatores espécies e pastagens;

E_{Pik} = corresponde ao efeito de interação entre os fatores espécies e períodos;

F_{Pjk} = corresponde ao efeito de interação entre os fatores pastagens e períodos;

E_{FPijk} = corresponde ao efeito de interação entre os fatores espécies, pastagens e períodos;

e_{ijkl} = corresponde ao erro (resíduo) experimental.

O esquema em fatorial triplo $2 \times 3 \times 2$ teve como: fator A – potros equinos (*Equus caballus*) e potros híbridos muars ($\text{♂}Equus asinus \times \text{♀}Equus caballus$); o fator B – as pastagens de Coast-cross, Florakirk e Tifton-85; o fator C – os dois períodos de avaliação, sendo o Período I (pós-desmame imediato) abrangendo o período de 60 dias iniciais compreendendo a permanência e pastejo sequencial de 20 dias nos pastos de Coast-cross, Florakirk e Tifton-85. O Período II (pós-desmame tardio) abrangendo o período de 60 dias finais compreendendo a permanência e pastejo sequencial de 20 dias nos pastos de Coast-cross, Florakirk e Tifton-85, conforme ilustrado na linha temporal da pesquisa (Figura 1).

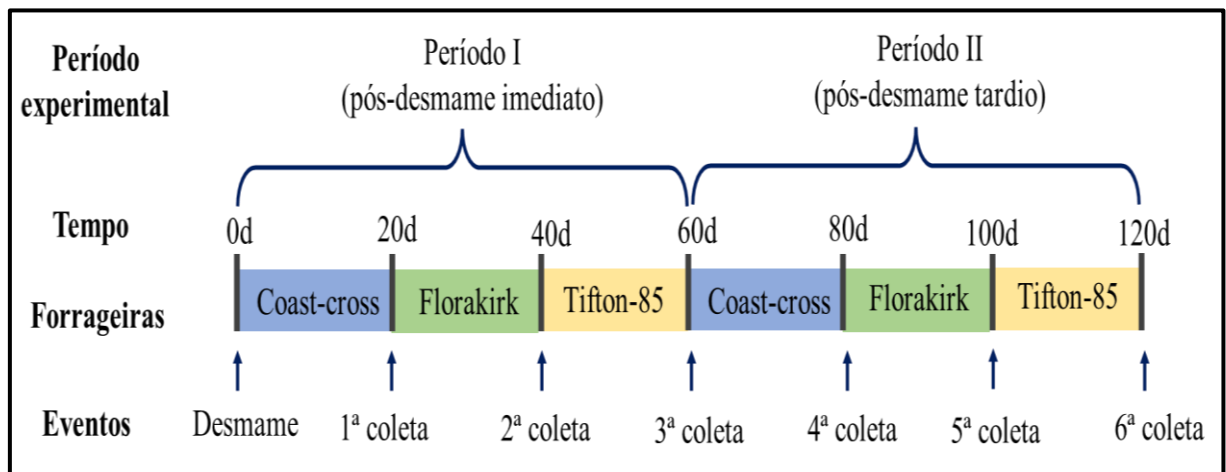


Figura 1. Linha temporal da pesquisa: períodos, tipo de forrageiras e eventos experimentais.

Os modelos de análise dos resultados estão apresentados nos quadros de análise de variância (Quadros 1, 2 e 3).

Quadro 1. Quadro de análise de variância das variáveis de desempenho animal.

Fonte de variação	Graus de liberdade
FATOR A (Espécies: Equina e Muar)	$2-1 = 1$
FATOR B (Pastagens: Coast-cross, Florakirk e Tifton-85)	$3-1 = 2$
FATOR C (Períodos: Pós-desmame imediato e tardio)	$2-1 = 1$
AxB	$1 \times 2 = 2$
AxC	$1 \times 1 = 1$
BxC	$2 \times 1 = 2$
AxBxC	$1 \times 2 \times 1 = 2$
Tratamentos	$2 \times 3 \times 2 - 1 = 11$
Resíduos	$71-11 = 60$
Total	$2 \times 3 \times 2 \times 6 - 1 = 72-1 = 71$

Quadro 2. Quadro de análise de variância das análises microbianas das técnicas dependentes de cultivo.

Fonte de variação	Graus de liberdade
FATOR A (Espécies: Equina e Muar)	$2-1 = 1$
FATOR B (Pastagens: Coast-cross, Florakirk, e Tifton-85)	$3-1 = 2$
FATOR C (Períodos: Pós-desmame imediato e tardio)	$2-1 = 1$
AxB	$1 \times 2 = 2$
AxC	$1 \times 1 = 1$
BxC	$2 \times 1 = 2$
AxBxC	$1 \times 2 \times 1 = 2$
Tratamentos	$2 \times 3 \times 2 - 1 = 11$
Resíduos	$47-11 = 36$
Total	$2 \times 3 \times 2 \times 4 - 1 = 48-1 = 47$

Quadro 3. Quadro de análise de variância das análises microbianas das técnicas independentes de cultivo.

Fonte de variação	Graus de liberdade
FATOR A (Espécies: Equina e Muar)	$2-1 = 1$
FATOR B (Pastagens: Coast-cross, Florakirk e Tifton-85)	$3-1 = 2$
FATOR C (Períodos: Pós-desmame imediato e tardio)	$2-1 = 1$
AxB	$1 \times 2 = 2$
AxC	$1 \times 1 = 1$
BxC	$2 \times 1 = 2$
AxBxC	$1 \times 2 \times 1 = 2$
Tratamentos	$2 \times 3 \times 2 - 1 = 11$
Resíduos	$35-11 = 24$
Total	$2 \times 3 \times 2 \times 3 - 1 = 36-1 = 35$

3.5 Mensurações Lineares e de Peso

Os animais foram mensurados a cada 20 dias, sendo avaliações da altura na cernelha (Figura 1A), na garupa (Figura 1B) e do costado (Figura 2A) e, do comprimento corporal com auxílio do hipômetro. Os perímetros torácicos (Figura 3B), do antebraço (Figura 4A), do joelho (Figura 4B) e da canela (Figura 4C) foram medidos através de fita métrica. Nas mensurações os animais estavam em estação forçada e as medidas foram efetuadas pelo lado esquerdo do corpo. Na estação forçada os animais devem estar com os membros anteriores e posteriores de forma mais regular, perpendicularmente sobre o piso de cimento plano e no formato de paralelogramo retangular.

As descrições das mensurações de altura são: altura na cernelha, que é a medida do ponto mais alto da região interescapular até o solo. Está situada nos processos espinhosos situado entre as vertebrae torácicas T5 e T6. A altura na garupa é compreendida como o ponto mais alto da garupa sendo mensurada da tuberosidade sacral até o solo, a altura do costado se apresenta como a distância entre os processos espinhosos localizados entre as vertebrae T5 e T6 até o processo xifóide. O comprimento do corpo é a distância da porção cranial do tubérculo maior do úmero até porção caudal da tuberosidade isquiática. As descrições dos perímetros são: perímetro torácico, que é a medida da circunferência posicionada após o final da cernelha localizado entre os processos espinhosos das vertebrae torácicas T8 e T9 passando pelos espaços intercostais da 8ª e 9ª costelas até última articulação da costela com o processo xifoide, o perímetro do antebraço que é a mensuração da circunferência posicionada na região mediana do antebraço formada pelo ossos do rádio e da ulna, perímetro do joelho que é a medida da circunferência da região mediana do joelho compreendida como ossos carpianos e o perímetro da canela é a medida da circunferência situada na região mediana da canela onde estão localizados nos ossos do metacarpo 2 ao 4 (CABRAL et al., 2004; PINTO et al., 2005). Foram feitas seis avaliações do peso corporal dos potros utilizando balança mecânica, com capacidade de mensuração de uma tonelada, previamente calibrada.



Figura 2. Mensuração da altura com hipômetro. A - Altura na cernelha; B - Altura na garupa. (Fonte: Acervo pessoal)

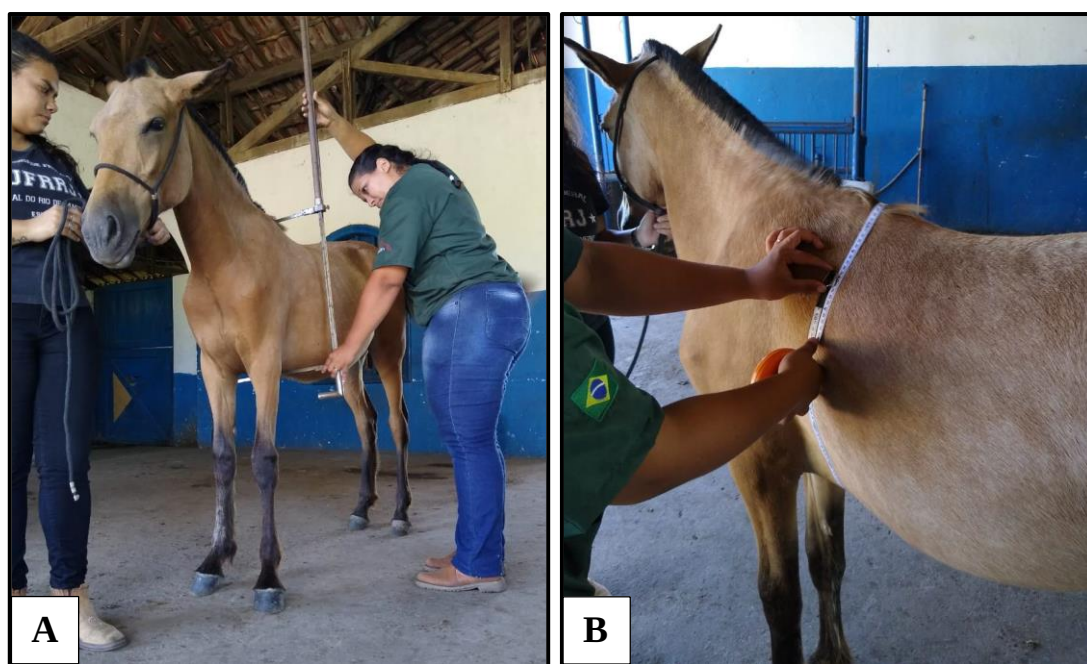


Figura 3. Mensuração de altura e perímetro. A - Altura do costado; B - Perímetro torácico. (Fonte: Acervo pessoal)

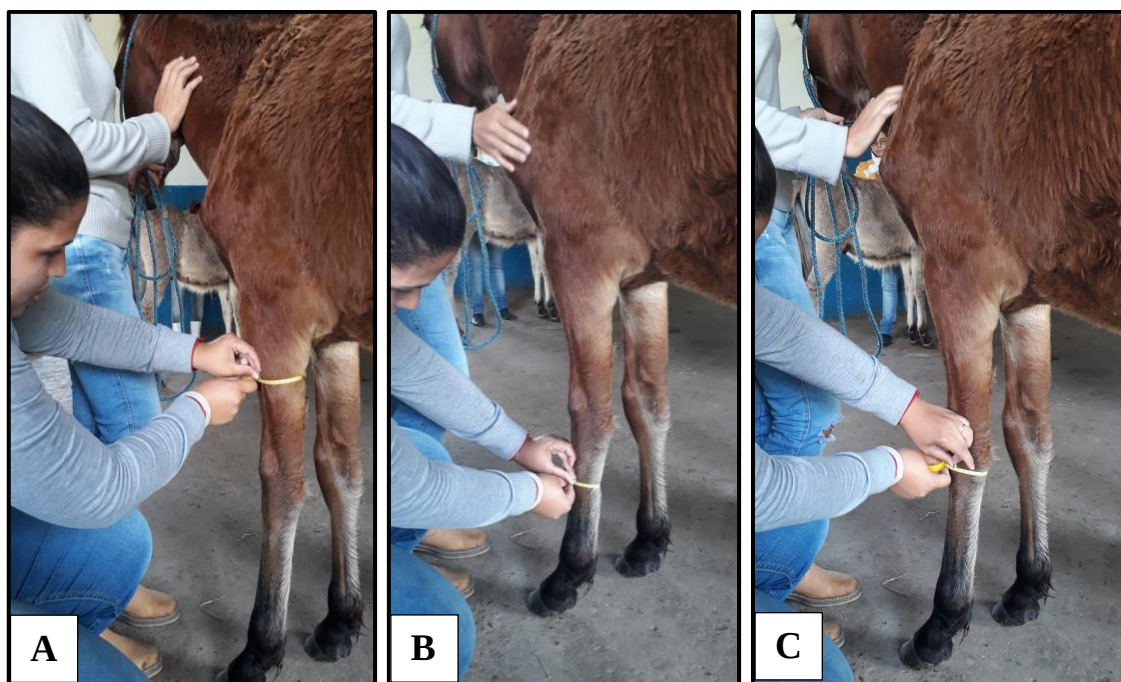


Figura 4. Mensuração dos perímetros com fita métrica. A - Perímetro do antebraço; B – Perímetro da canela; C - Perímetro do joelho. (Fonte: Acervo pessoal)

3.6 Coleta de Amostras das Pastagens

Foram feitas duas coletas de amostras das pastagens dos cultivares de *Cynodon dactylon*: Coast-cross, Florakirk e Tifton-85, com auxílio de um quadrante 1x1 m e tesoura de poda. A primeira coleta ocorreu no antes e a segunda após o pastejo dos potros nos piquetes e, posteriormente realizou-se análises bromatológicas.

3.7 Análises Bromatológicas das Forragens

As gramíneas coletadas no antes e após o pastejo foram pesadas e submetidas a pré-secagem em estufa de circulação forçada, em seguida ocorreu a moagem no moinho de facas tipo Willey com peneira de 1 mm (SILVA et al., 2014). Após determinou-se a porcentagem de: matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) (AOAC, 1995), extrato etéreo (EE) (SILVA e QUEIROZ, 2006), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), hemicelulose (HEM) (VAN SOEST et al., 1991) e lignina (LIG) através da oxidação com permanganato de potássio (VAN SOEST e ROBERTSON, 1980). Os resultados da composição bromatológica das pastagens foram expressas em gramas por quilo na (Tabela 4).

Tabela 4. Composição bromatológica das forrageiras Coast-cross, Florakirk e Tifton-85, na base da matéria seca.

Itens	Forrageiras					
	Coast-cross		Florakirk		Tifton-85	
	Períodos experimentais					
	I	II	I	II	I	II
Matéria seca, g/Kg	959	933	943	925	954	933
Composição química, g/Kg MS						
Matéria mineral	66	89	76	76	72	85
Extrato etéreo	39	16	24	18	27	18
Proteína bruta	126	102	98	109	129	153
Fibra em detergente neutro	759	760	756	802	776	804
Fibra em detergente ácido	359	381	384	355	364	381
Celulose	340	305	291	296	288	294
Hemicelulose	400	380	372	447	413	422
Lignina ¹	68	54	59	39	44	64
Carboidratos não fibrosos ²	9	32	0	0	46	0

¹ Lignina determinada pela oxidação de permanganato de potássio

² Carboidratos não fibrosos (CNF) = 100 - (%PB + %FDN + %EE + % MM)

3.8 Coleta de Amostras Fecais

Foram realizadas seis coletas fecais diretamente da ampola retal dos potros, em oito animais e a cada 20 dias (Figura 5). A primeira coleta ocorreu no 20º dia, após os animais terem sido inseridos na pastagem de Coast-cross; no 40º dia, na pastagem de Florakirk; e no 60º dia, na pastagem de Tifton-85. Foram estabelecidas duas rotações nas três pastagens, sendo a última coleta fecal realizada no 120º dia experimental. Após a coleta, as amostras fecais foram armazenadas em sacos plásticos e mantidos em caixa térmica até a preparação das subamostras.

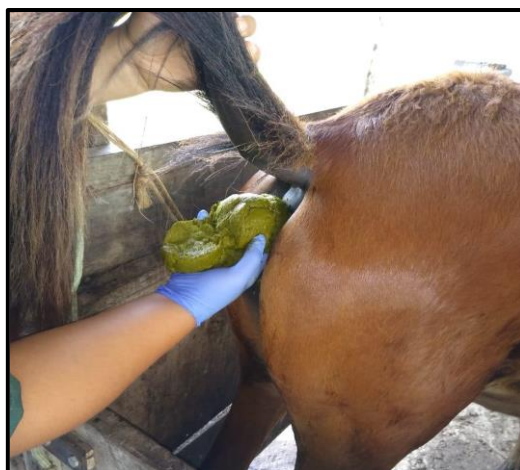


Figura 5. Coleta das amostras fecais nos potros. (Fonte: Acervo pessoal)

No EQUILAB as amostras fecais foram divididas em três subamostras: a primeira foi destinada para as técnicas dependentes de cultivo, sendo realizadas diluições seriadas de 1 g da fezes e inoculação nos meio seletivos líquidos e sólidos; a segunda subamostra foi utilizada para as técnicas independentes de cultivo, sendo inseridas três tubos criogênicos de 2 mL e, em

seguida esses tubos foram congelados -20°C até a extração do DNA total; a terceira subamostra foi filtrada e aferido o pH do líquido fecal.

3.9 Mensuração do pH fecal

O pH fecal foi mensurado utilizando o pHmetro previamente calibrado. As amostras fecais foram filtradas com o filtro Blutex de 100 mm e o líquido fecal foi submetido a sonda do pHmetro até a estabilização do pH (BERG et al., 2005) (Figura 6).

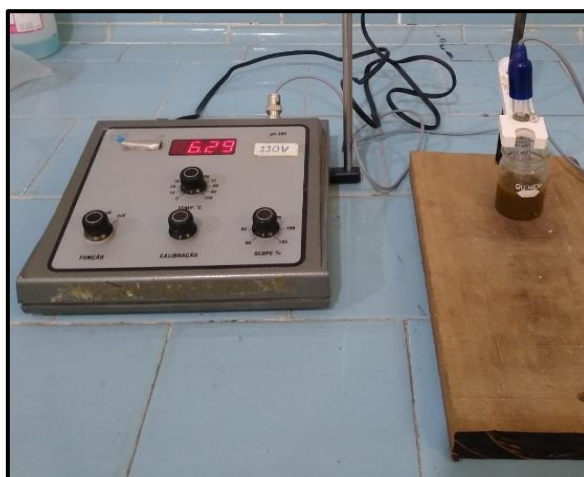


Figura 6. Medição do pH fecal com pHmetro. (Fonte: Acervo pessoal)

3.10 Análises Microbianas Dependentes de Cultivo

Com a finalidade de avaliar o perfil dos microrganismos fibrolíticos, realizou-se inoculações em meios seletivos líquidos e sólidos para obter contagens de anaeróbicos totais, bactérias celulolíticas, *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. Nesta análise foram utilizadas amostras fecais de oito potros (4 equinos e 4 muare).

Cerca de 1 g de fezes foram homogeneizadas no vórtex e distribuídas para os demais tubos contendo solução mineral (BRYANT e BURKEY, 1953). Ao distribuir as diluições, os tubos foram saturados com CO₂ para manter a anaerobiose (Figura 7). Em seguida inoculou-se nos meios seletivos para avaliação:

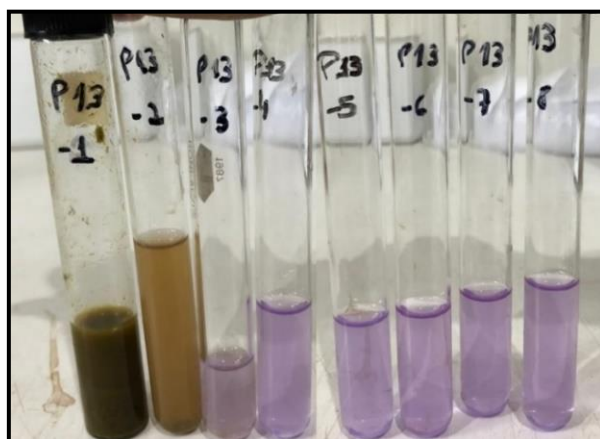


Figura 7. Diluição seriadas em solução mineral. (Fonte: Acervo pessoal)

3.10.1 Concentração de anaeróbicos totais

Foram inoculados 1 mL em três *roll tubos* (triplicatas) das diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Em 4 mL do meio completo modificado (LEEDLE e HESPELL, 1980) sob ambiente de CO_2 . Os tubos foram postos na jarra de anaerobiose e incubados na estufa bacteriológica por 48 horas a 39°C . Após as 48 horas, comparou-se a turvação em relação a um tubo que continha apenas meio completo modificado (controle negativo). Quando houve turvação, havia presença de anaeróbicos totais. Caso o tubo estivesse semelhante ao controle, o resultado era considerado negativo (Figura 8A). As concentrações bacterianas foram determinadas pelo método do número mais provável (NMP), que se baseia nos padrões de presença ou ausência (nesse caso, turvação ou não) em cada diluição (SILVA et al., 2007).

3.10.2 Concentração de celulolíticas

Inoculou-se 1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em três *roll tubos* em 8 mL do meio de cultura líquido (HALLIWELL e BRYANT, 1963; JULLIAND et al., 1999) e modificado por (BARUC et al., 1983). Cada tubo continha um papel Whatman nas dimensões de 8x1 cm (Figura 8B). Os tubos foram postos em jarra de anaerobiose e incubados em estufa bacteriológica, por 15 dias a 39°C . Após a incubação verificou-se a degradação o papel filtro. Quando houve degradação do papel, havia presença de bactérias celulolíticas. Também foi usado o método de número mais provável (NMP) (SILVA et al., 2007) para obtenção das concentrações bacterianas. Os resultados foram transformados e expressos na base logarítmica.

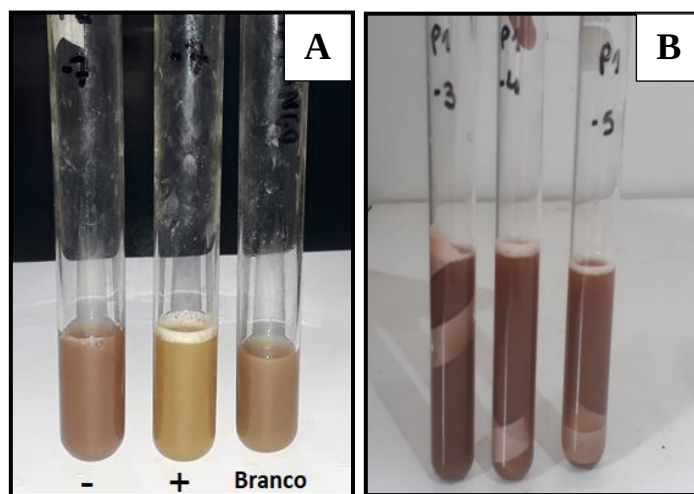


Figura 8. Resultado da inoculação em meio líquido. A - Anaeróbicos totais; B - Bactérias celulolíticas. (Legenda: += presença de anaeróbicos totais; -= ausência de anaeróbicos totais; Branco= controle negativo. (Fonte: Acervo pessoal)

3.10.3 Contagens de *Streptococcus*

Foi semeado 100 μL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em triplicatas, com auxílio da alça Drigalski, no meio Ágar Azida Bile Esculina (Acumedia), meio seletivo para contagens de *Streptococcus spp.* (Figura 9A). Em seguida, as placas foram incubadas na estufa por 48 horas a 38°C (FAUBLADIER et al., 2013). Após a incubação foi feita a contagem das colônias e obteve-se a média da triplicata. Os valores foram transformados para base logarítmica e

expressos em $\log_{10}$ UFC/g⁻¹ (unidades formadoras de colônias em log por grama de fezes frescas).

3.10.4 Contagens de *Lactobacillus*

Cerca de 100 μ L das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas com a alça Drigalski em triplicatas no meio Ágar MRS (Kasvi), meio seletivo para contagens *Lactobacillus spp.* (Figura 9B). Em seguida, incubou-se em estufa a 38°C por 48 horas (FAUHLADIER et al., 2013). As médias das contagens das colônias foram transformadas para base logarítmica e expressas em $\log_{10}$ UFC/g⁻¹ (unidades formadoras de colônias em log por grama de fezes frescas).

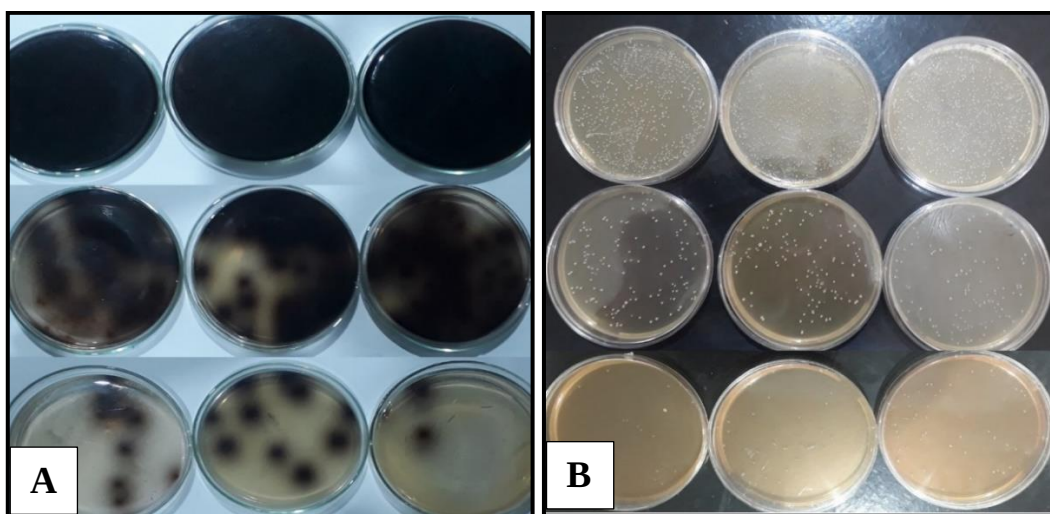


Figura 9. Triplicata das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em meio sólido. A - Meio seletivo para *Streptococcus spp.*; B - Meio seletivo para *Lactobacillus spp.* (Fonte: Acervo pessoal)

3.11 Análises Microbianas Independente de Cultivo

Utilizou-se técnicas moleculares com objetivo de amplificar e sequenciar a região correspondente ao gene do rDNA 16S:

3.11.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de 250 mg de fezes. Foram extraídas 36 amostras fecais provenientes de seis potros (3 equinos e 3 muare) utilizando o QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen Ltd., UK), conforme as instruções do fabricante.

3.11.2 Eletroforese em gel de agarose

Na avaliação da integridade e pureza do DNA extraído, foram realizados géis de agarose a 0,8 % e eletroforese a 127 V e 400 mA por 60 minutos. Em seguida, os géis foram submetidos a luz ultravioleta (UV) no transluminador. As amostras que apresentaram bandas fortes e sem rastro seguiram para as demais análises moleculares. A presença de bandas com intensidade forte indica que há DNA e em quantidade elevada, por isso que se comparou as bandas ao marcador Lambda (λ) ajustado a concentração de 10 ng/ μ L para se ter uma base da quantidade de DNA presente na amostra. A não ocorrência do rastro indica que o DNA está fragmentado (Figura 10).

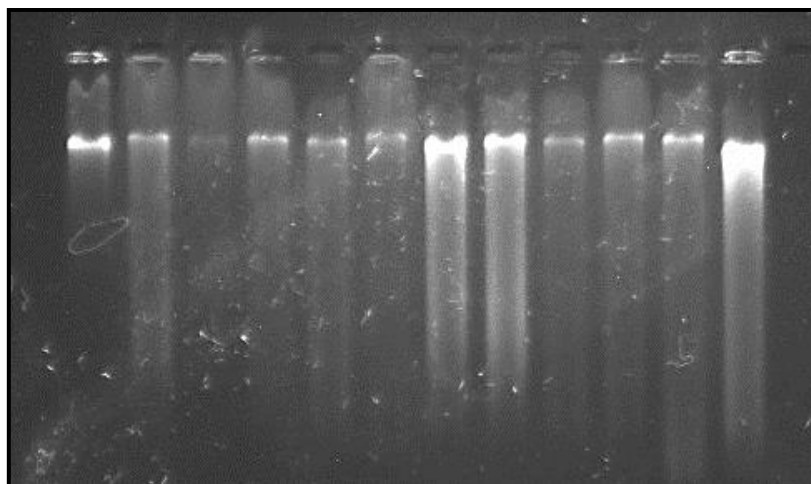


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose. Legenda: Marcador Lambda (1ª banda da esquerda para direita), as demais bandas indicam que há DNA integro nas amostras, visto que não há formação de rastro. (Fonte: Acervo pessoal)

3.11.3 Quantificação do DNA

Para a quantificação utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos) empregando 1µL do DNA total e o tampão de eluição do kit da QIAGEN® como controle negativo (branco).

3.11.4 Construção da biblioteca genômica

Foram enviadas 36 amostras de DNA para empresa Macrogen em Seul na Coréia do Sul (<https://dna.macrogen.com>). Primeiramente as amostras foram submetidas a um controle de qualidade onde os DNAs foram quantificados com o fluorômetro Victor 3 (PerkinElmer) e submetidos a gel de eletroforese. Em seguida, foi construída a biblioteca genômica visando amplificar DNA correspondente a região V3 a V4 do gene RNA ribossomal 16S utilizando os primers Bakt 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) e Bakt 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC). Os produtos de PCR também passaram por um controle de qualidade. Para avaliar a qualidade utilizou-se o Bioanalyzer 2100 (Agilent, CA, Estados Unidos) e, para estimar a quantidade de fragmentos foi utilizado o fluorômetro Qubit™ 3.0, com intuito de criar bibliotecas com alta qualidade e com densidade de clusters ideais para as células de fluxo da plataforma Illumina.

3.11.5 Sequenciamento do DNA

Os produtos da PCR foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina MiSeq 300 pares de base (bp) emparelhados (PE), com biblioteca controle (PhiX) e com 100 mil leituras por amostra. Os produtos do sequenciamento foram convertidos para dados brutos no formato fastq para serem conduzidas as análises de bioinformáticas.

3.12 Análises Estatísticas

As variáveis respostas de desempenho animal, contagens microbiológicas, abundâncias relativas dos filos, ordens, famílias e gêneros, índices de diversidade e riqueza de espécies

foram avaliados com delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 2x3x2. Os resultados foram testados quanto a normalidade e homogeneidade dos resíduos através do teste Shapiro Wilk. Os resultados que atenderam as premissas da análise de variância (ANOVA) foram submetidas ao teste F para avaliar se há diferenças e interações significativas entre os fatores e, quando foram verificadas diferenças entre as médias, elas foram comparadas com o teste Tukey a 5% de probabilidade. Nas variáveis que não seguiram a distribuição normal dos resíduos aplicou-se o teste não paramétrico Kruskal Wallis para avaliar a diferenças entre as médias dos tratamentos e o teste Dunn para comparar as médias. As análises estatísticas foram conduzidas no software R versão 4.0.3.

3.13 Análises Bioinformáticas

As sequências brutas do NGS com formato fastq foram processadas através do software Mothur versão 1.45.2 (SCHLOSS et al., 2009). Esse processamento consistiu no emparelhamento das sequências *forward* e *reverse* gerando os *contigs*. Os dados foram submetidos a uma filtragem de qualidade retirando: sequências de baixa qualidade (inferiores a 420 ou superiores a 470 pb), ambíguas ou aquelas que continham mais de oito homopolímeros. As sequências filtradas, foram alinhadas ao banco de dados referência de RNAr do Silva versão 138.1 (QUAST et al., 2013).

As sequências mal alinhadas e com colunas não informativas foram removidas através dos comandos *screen.seqs* e *filter.seqs*. Em seguida, as sequências foram pré-agrupadas por meio do comando *pre.cluster* empregando o parâmetro *diffs=4*. Em seguida, foram detectadas as sequências quiméricas no chimera.vsearch e removidas através do comando *remove.seqs* (EDGAR et al., 2011). As sequências resultantes foram classificadas com confiabilidade de 80% de identidade dos nucleotídeos com banco de dados Ribosomal Database Project (RDP) versão 18 (COLE et al., 2014). Empregando o comando *remove.lineage* foram identificadas e removidas as sequências de cloroplastos, mitocôndrias, dos reinos Archaea e Eukaria, assim como as com reino desconhecido. Foi efetuada a normalização do número de leituras, tendo como base na amostra com menor número de sequências (28.779), posteriormente usando o comando *cluster.split* as sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), tendo como parâmetro 97% de similaridade entre as sequências (COLE et al., 2014).

Retirou-se as OTU raras aplicando o *cluster.split* e calculou-se as curvas de rarefação, distribuição das OTUs, os índices de diversidade de espécies Chao1 (CHAO, 1984), Shannon (SHANNON, 1948) e Simpson (SIMPSON, 1949). A composição bacteriana foi avaliada através do resumo taxonômico de cada amostra, da distribuição das OTUs através da ordenação de escala multidimensional não métrica (NMDS) com índice de similaridade Bray-Curtis, usando o programa Past 4.03 (HAMMER et al., 2001).

Com base nos grupos observados na ordenação, realizou-se no Past 4.03 a análise multivariada Permanova para avaliar se há diferenças significativas entre os grupos. Quando confirmada as diferenças, realizou-se a análise discriminante linear do tamanho do efeito (LefSe) no Mothur versão 1.45.2 com intuito de comparar quais OTUs diferiram entre os tratamentos (SEGATA et al., 2011). A partir dos resultados do LefSe, realizou-se a análise das espécies indicadoras (ISA), identificando as OTUs que promoveram as diferenças significativas entre os tratamentos experimentais (DUFRÊNE e LEGENDRE, 1997).

3.14 Depósito das Sequências de Nucleotídeos

As sequências oriundas do sequenciamento foram depositadas no NCBI Sequence Read Archive (SRA) e podem ser acessadas através do bioprojeto PRJNA766695.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do Desempenho Corporal dos Potros

O fator espécies não proporcionou efeitos significativos ($p>0,05$) sobre as variáveis de ganho de peso e medidas corporais. Entretanto, houve efeito do fator forrageiras ($p<0,05$) sobre os ganhos médios de: pesos diários, nas alturas nas cernelhas, nas alturas do costado e nos perímetros dos antebraços, joelhos e canelas. Também houve efeito dos períodos após desmame ($p<0,05$) nos ganhos médios das: alturas dos costados e nos perímetros torácicos, dos antebraços e dos joelhos dos potros (Tabela 5).

Tabela 5. Efeitos dos tratamentos sobre os ganhos de peso e medidas corporais.

Ganhos	Espécies			Forrageiras				Períodos			DP
	E	M	p	C	F	T	p	I	II	p	
Peso (g/dia)	49,8	45,0	0,5166	55,6 ^A	59,9 ^A	26,7 ^B	<0,0001	44,2	50,6	0,4060	36,9
Alturas (cm)											
Cernelha	1,8	1,7	0,6476	1,4 ^B	2,5 ^A	1,3 ^B	0,0065	1,7	1,8	0,8423	1,4
Garupa	1,8	1,8	0,8838	1,5	2,1	1,8	0,2591	2,1	1,5	0,0713	1,4
Costado	1,0	0,9	0,6775	1,4 ^A	0,9 ^{AB}	0,6 ^B	0,0027	1,2 ^a	0,7 ^b	0,0171	0,8
Comprimento (cm)											
Corporal	2,0	1,8	0,5084	2,5	1,7	1,5	0,0565	2,2	1,6	0,0917	1,7
Perímetros (cm)											
Torácico*	2,9	3,1	0,9481	2,6	3,6	2,8	0,3437	3,7 ^a	2,3 ^b	0,0019	2,9
Antebraço	2,8	2,3	0,1512	1,6 ^B	3,3 ^A	2,7 ^A	<0,0001	3,4 ^a	1,6 ^b	<0,0001	2,1
Joelho*	0,7	0,6	0,9180	0,2 ^B	1,6 ^A	0,2 ^B	0,0001	1,1 ^a	0,2 ^b	0,0053	1,1
Canela*	0,7	0,6	0,6940	0,1 ^B	1,6 ^A	0,1 ^B	0,0002	1,1 ^a	0,2 ^b	0,0408	1,1

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. * Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Dunn, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade. Legenda: E= Equinos; M= Muare; C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-8; DP= desvio padrão.

Houve interações duplas significativas entre os fatores forrageiras e períodos pós-desmame para os ganhos médios de: pesos diários ($p=0,0014$), na altura na cernelha ($p=0,0142$), na altura na garupa ($p=0,0087$), na altura do costado ($p=0,0083$), do comprimento corporal ($p=0,0011$) e no perímetro do antebraço ($p<0,0001$). Ocorreu interação tripla entre os fatores espécies x forrageiras x períodos para os ganhos médios da altura na garupa ($p=0,0487$).

4.2 Análise Microbiana através de Técnicas Dependentes de Cultivo

Houve efeitos significativos do fator espécies nos valores médios de pH fecal ($p<0,0001$), nas contagens de *Streptococcus* spp. ($p=0,0046$) e *Lactobacillus* spp. ($p<0,0001$). As forrageiras proporcionaram efeitos sobre o pH fecal ($p<0,0001$) e nas contagens de anaeróbios totais ($p=0,0338$). O fator períodos pós-desmame propiciou efeitos nos valores

médios de: pH fecal ($p < 0,0001$), nas contagens de *Lactobacillus* spp. ($p < 0,0001$) e de bactérias anaeróbias totais ($p = 0,0045$) (Tabela 6).

Tabela 6. Ganhos médios de peso e medidas lineares em função das interações entre forrageiras e períodos pós-desmame.

Ganhos	Forrageiras						p-valor
	C	F	T	C	F	T	
	Período I			Período II			
Peso diário(g/dia)	62,8 ^{Aa}	67,1 ^{Aa}	2,8 ^{Bb}	48,4 ^{Aa}	53,5 ^{Aa}	51,0 ^{Aa}	0,0014
Altura na cernelha (cm)	0,8 ^{Bb}	3,0 ^{Aa}	1,3 ^{Ba}	2,0 ^{Aa}	1,9 ^{Aa}	1,4 ^{Aa}	0,0142
Altura na garupa (cm)	1,3 ^{Ba}	3,0 ^{Aa}	1,9 ^{Ba}	1,7 ^{Aa}	1,1 ^{Ab}	1,6 ^{Aa}	0,0087
Altura no costado (cm)	1,2 ^{Aa}	1,2 ^{Aa}	1,9 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	0,5 ^{Bb}	0,1 ^{Bb}	0,0083
Comprimento corporal (cm)	3,8 ^{Aa}	1,3 ^{Ba}	1,5 ^{Ba}	1,3 ^{Ab}	2,1 ^{Aa}	1,5 ^{Aa}	0,0011
Perímetro do antebraço (cm)	1,2 ^{Ba}	5,3 ^{Aa}	3,9 ^{Aa}	1,9 ^{Aa}	1,4 ^{Ab}	1,6 ^{Ab}	<0,0001

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade. Legenda: C= Coast-cross; F= Florakirk; T =Tifton-85.

Tabela 7. Efeitos dos tratamentos sobre os valores médios de pH fecais e contagens bacterianas em meio de cultivo seletivos.

	Espécies			Forrageiras				Períodos			DP
	E	M	p	C	F	T	p	I	II	p	
pH fecal	6,3 ^b	6,6 ^a	<0,0001	6,6 ^A	6,3 ^B	6,5 ^A	<0,0001	6,6 ^a	6,3 ^b	<0,0001	0,4
Contagens bacterianas (log ₁₀ UFC/g de fezes frescas)											
<i>Streptococcus</i> spp.	5,9 ^a	3,8 ^b	0,0046	4,4	4,6	5,4	0,4577	4,2	5,4	0,0744	2,6
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,5 ^a	3,2 ^b	<0,0001	4,7	4,7	3,7	0,9122	3,2 ^b	5,5 ^a	<0,0001	2,8
Anaeróbios totais*	7,1	6,7	0,2010	6,7 ^B	6,8 ^A	7,1 ^A	0,0338	6,5 ^b	7,2 ^a	0,0045	1,1
Celulolíticas*	2,6	2,5	0,7876	2,8	2,4	2,4	0,5746	2,5	2,7	0,7402	1,2

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. * Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Dunn, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste Kruskal Wallis, a 5% de probabilidade. Legenda: E= Equinos; M= Muas; C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-85; DP= desvio padrão.

Também verificou interações duplas entre forrageiras x períodos para os valores médios de pH fecais ($p = 0,0012$) e entre espécies x períodos para as contagens médias de *Lactobacillus* spp. ($p = 0,0411$) conforme demonstrado nas (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Valores médios de pH fecal em função da interação entre forrageiras e períodos pós-desmame.

Forrageiras							
	Período I			Período II			p-valor
	C	F	T	C	F	T	
pH fecal	6,9 ^{Aa}	6,4 ^{Ba}	6,5 ^{Ba}	6,3 ^{ABb}	6,1 ^{Bb}	6,6 ^{Aa}	0,0012

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade. Legenda: C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-85.

Tabela 9. Contagens médias de *Lactobacillus* spp. em função da interação entre espécies e períodos pós-desmame.

Espécies	Potros Equinos		Potros muares		p-valor
	Período I	Período II	Período I	Período II	
<i>Lactobacillus</i> spp. ¹	5,1 ^{Aa}	6,4 ^{Aa}	1,3 ^{Bb}	5,4 ^{Aa}	0,0411

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade. ¹ log₁₀ UFC/g de fezes frescas.

4.3 Análise Microbiana através de Técnicas Independentes de Cultivo

As 36 amostras fecais geraram um total de 3.024.207 sequências que foram submetidas a filtragens de qualidade e limpezas, alinhamento aos bancos de dados referência de RNAr do Silva v.138.1 (1.441.464 sequências) e RDP v.18 (369.451 sequências) e uniformização do número de sequências por amostra. Para essa normalização, utilizou-se uma subamostra de 28.779 sequências e esse valor foi baseado na amostra com menor nº de sequências. Logo após, as sequências resultantes foram agrupadas em 12.368 OTUs apresentando 97% de identidade com: 19 filós, 31 classes, 49 ordens, 86 famílias e 199 gêneros.

O número de sequências estabelecido na normalização apresentou cobertura adequada, visto que as curvas de rarefação esboçaram tendência em atingir a estabilidade (Figura 11) para o número total de sequências analisadas (27.665 sequências), demonstrando que o sequenciamento representou 96,13% das sequências analisadas. Em relação aos níveis taxonômicos, aproximadamente 96,51% das sequências foram classificadas a nível de filo, 83,24% a nível de classe, 75,44% a nível de ordem, 63,11% a nível de família e 17,70% a nível de gênero.

4.3.1 Índices de diversidade e riqueza de espécies

Houve efeito do fator espécies sobre os valores médios: do número de OTUs (p=0,0165) e índices de Shannon (p=0,006) e Simpson (p=0,0016). O fator forrageias proporcionou diferenças nas médias dos números de OTUs (p=0,0260) e índice de riqueza de Chao 1 (p=0,0320). Verificou-se efeitos significativos dos períodos experimentais sobre todos os índices de diversidade avaliados, número de OTUs (p=0,0160) e índices de Chao1 (p=0,0470), Shannon (p=0,0160) e Simpson (p=0,0240) (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito dos tratamentos sobre a média do número de OTUs e os índices de Chao 1, Shannon e Simpson.

Índices	Espécies			Forrageiras				Períodos			DP
	Equinos	Muare	p	C	F	T	p	I	II	p	
Nº OTU	2209 ^b	2371 ^a	0,0165	2416 ^A	2198 ^B	2255 ^B	0,0255	2371 ^a	2208 ^b	0,0155	244
Chao 1	3194,7	3350,2	0,0977	3436,6 ^A	3126,3 ^B	3254,2 ^{AB}	0,0322	3366,8 ^a	3178,2 ^b	0,0474	324,8
Shannon	5,7 ^b	6,0 ^a	0,0060	6,0	5,8	5,8	0,1367	6,0 ^a	5,7 ^b	0,0157	0,43
Simpson	0,02 ^a	0,01 ^b	0,0161	0,01	0,01	0,02	0,3737	0,01 ^b	0,02 ^a	0,0409	0,02

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Legenda: C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-85; DP= desvio padrão.

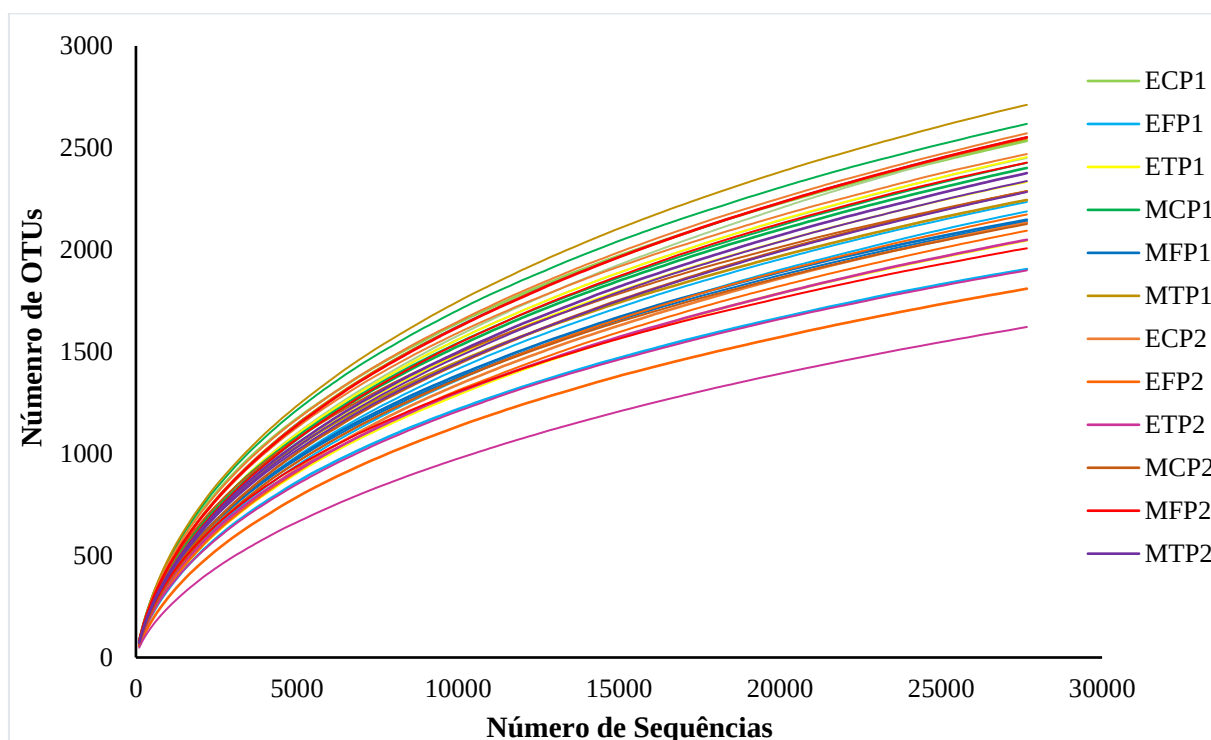


Figura 11. Curva de rarefação dos números de OTUs observados em doze tratamentos, que são combinação dos fatores espécies (equinos e muare), das forrageiras (Coast-cross, Florakirk e Tifton-85) e dos períodos (I e II). Legenda: E= Equinos; M= Muare; C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-85; P1= Período I; P2= Período II.

Verificou-se efeitos significativos entre espécies x forrageiras para os valores médios dos números de OTUs ($p=0,0235$) e sobre os índices de diversidade de Shannon ($p=0,0390$) e Simpson ($p=0,0490$), conforme ilustrado na (Tabela 11).

Tabela 11. Efeitos das interações entre espécies e forrageiras sobre as médias dos números de OTUs e dos índices de diversidade de Shannon e Simpson.

Forrageiras	Índices de diversidade					
	Nº de OTU		Shannon		Simpson	
	Equinos	Muare	Equinos	Muare	Equinos	Muare
Coast-cross	2463 ^a	2369	6,1 ^a	6,0	0,01 ^b	0,01
Florakirk	2082 ^{Bb}	2314 ^A	5,5 ^{Bb}	6,0 ^A	0,02 ^{Aab}	0,01 ^B
Tifton-85	2082 ^{Bb}	2429 ^A	5,4 ^{Bb}	6,1 ^A	0,03 ^{Aa}	0,01 ^B

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade.

4.3.2 Abundância relativa das comunidades bacterianas fecais

A comunidade bacteriana das amostras fecais continha o total de 19 filos, os três filos que apresentaram abundâncias relativas elevadas foram: Firmicutes (57%), Bacteroidetes (22%) e Verrucomicrobia (9%). Há seis filos que possuem abundâncias superiores a 1%: Spirochaetes, Candidatus Saccharibacteria, Actinobacteria, Proteobacteria e Fibrobacteres (Figura 12). Os demais 11 filos representam juntos 1,2% da abundância relativas das amostras fecais: Synergistetes, Planctomycetes, Armatimonadetes, SR1, Campilobacterota, Lentisphaerae, Tenericutes, Elusimicrobia, Chloroflexi, Chlamydiae e Fusobacteria (Figura 13). Cerca de 3,5% das sequências não conseguiram ser atribuídas a um filo bacteriano.

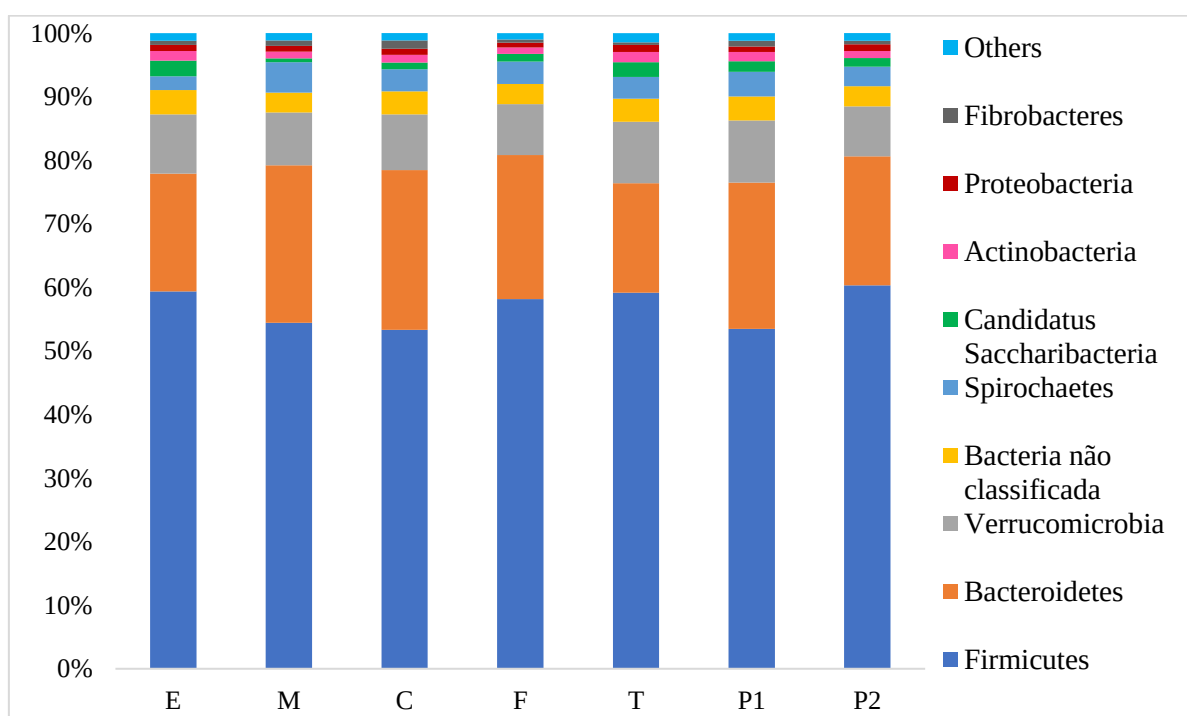


Figura 12. Percentual de abundância relativa dos filos nas espécies (equinos e muare), forrageiras (Coast-cross, Florakirk e Tifton-85) e períodos (I e II). Legenda: E= Equinos; M= Muare; C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-85; P1= Período I; P2= Período II.

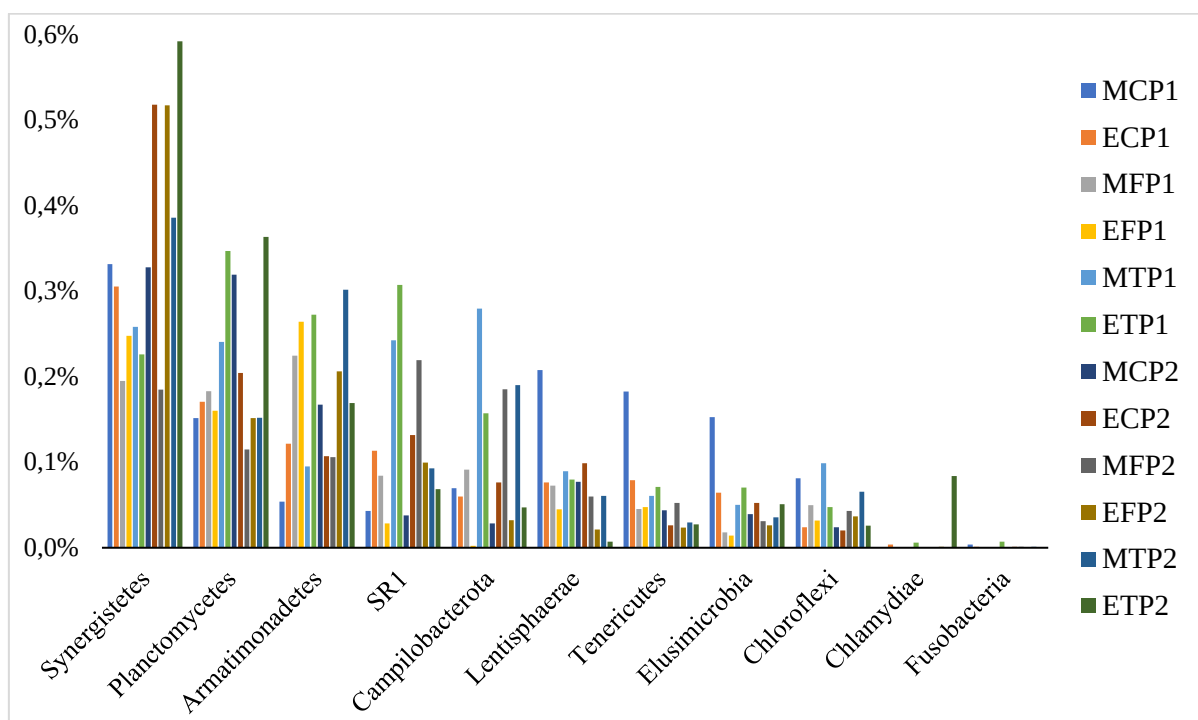


Figura 13. Filos com abundância relativa inferior a 1% encontrados nos diferentes tratamentos experimentais. Legenda: E= Equinos; M= Muares; C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-85; P1= Período I; P2= Período II.

O fator espécies proporcionou efeitos nos valores médios das abundâncias relativas dos filos Firmicutes ($p=0,0348$), Bacteroidetes ($p=0,0045$), Spirochaetes ($p<0,0001$), Candidatus Saccharibacteria ($p<0,0001$) e Fibrobacteres ($p=0,0223$). Também foram identificados efeitos desse tratamento sobre as famílias Lactobacillaceae ($p=0,0041$), Acidaminococcaceae ($p<0,0001$) e Clostridiales Incertae Sedis XIII ($p=0,0151$), pertencentes a Firmicutes. Na família Prevotellaceae ($p<0,0001$), do filo Bacteroidetes. Assim como a família Spirochaetaceae ($p<0,0001$), do filo Spirochaetes e, da família Fibrobacteraceae ($p=0,0223$), representantes de Fibrobacteres.

As pastagens propiciaram diferenças significativas nos percentuais das abundâncias relativas da família Lachnospiraceae e gênero Agathobacter ($p=0,0124$), membros de Firmicutes. Também verificou-se efeitos no filo Bacteroidetes ($p=0,0101$) e família Prevotellaceae ($p<0,0001$). Entre os períodos experimentais, houve efeitos nas frequências relativas do filo Firmicutes ($p<0,0047$), da família Lactobacillaceae ($p=0,0441$) e do gênero Lysinibacillus ($p=0,0455$) (Tabela 12).

Ocorreram efeitos entre dois fatores (espécies e forrageiras) sobre os percentuais médios das abundâncias relativas dos filos Spirochaetes ($p=0,0048$), Candidatus Saccharibacteria ($p=0,0045$) e Actinobacteria ($p=0,0267$); das famílias Lachnospiraceae ($p=0,0213$), Prevotellaceae ($p=0,0044$), Spirochaetaceae ($p=0,0046$), Erysipelotrichaceae ($p=0,0172$), Eggerthellaceae ($p=0,0409$), Akkermansiaceae ($p=0,0125$) e Acidaminococcaceae ($p=0,0092$); e dos gêneros Treponema ($p=0,0041$), Akkermansia ($p=0,0125$), Ruminococcus ($p=0,0171$) e Phascolarctobacterium ($p=0,0048$).

Tabela 12. Efeitos dos tratamentos sobre os percentuais médios das abundâncias relativas dos filós, famílias e gêneros bacterianos.

Níveis Taxonômicos	Espécies		Forrageiras			Períodos	
	E	M	C	F	T	I	II
Firmicutes (P)	59,4 ^a	54,4 ^b	53,3	58,2	59,2	53,5 ^b	60,3 ^a
Lachnospiraceae (F)	23,5	24,4	21,1 ^B	28,8 ^A	22,1 ^B	23,6	24,3
Lactobacillaceae (F)	3,1 ^a	0,6 ^b	1,8	2,3	1,5	0,9 ^b	2,9 ^a
Clostridiales Incertae Sedis XIII (F)	1,8 ^a	1,2 ^b	1,5	1,4	1,7	1,7	1,4
Acidaminococcaceae (F)	0,5 ^b	1,1 ^a	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8
Lysinibacillus (G)	1,8	0,4	1,2	1,3	0,8	0,1 ^b	2,1 ^a
Phascolarctobacterium (G)	0,5 ^b	1,1 ^a	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8
Agathobacter (G)	0,4 ^b	0,8 ^a	0,5 ^B	0,9 ^A	0,5 ^B	0,7	0,5
Bacteroidetes (P)	18,6 ^b	24,8 ^a	25,1 ^A	22,6 ^{AB}	17,2 ^B	23	20,3
Prevotellaceae (F)	2,2 ^b	3,8 ^a	3,5 ^{AB}	3,7 ^A	1,9 ^B	3,2	2,8
Spirochaetes (P)	2,1 ^b	4,8 ^a	3,5	3,5	3,4	3,9	3,1
Spirochaetaceae (F)	2,1 ^b	4,8 ^a	3,5	3,5	3,4	3,8	3,0
Treponema (G)	2,0 ^b	4,2 ^a	3,3	3,1	3,1	3,5	2,7
Candidatus Saccharibacteria (P)	2,5 ^a	0,6 ^b	1,1	1,2	2,3	1,7	1,4
Fibrobacteres (P)	0,7 ^b	0,8 ^a	1,3	0,5	0,4	0,9	0,6
Fibrobacteraceae (F)	0,7 ^b	0,8 ^a	1,3	0,5	0,4	0,9	0,6
Fibrobacter (G)	0,7 ^b	0,8 ^a	1,3	0,5	0,4	0,9	0,6

Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste F da Anova, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Unidade de medida: Porcentagem (%). Legenda: P= Filo; F= Família; G= Gênero; E= Equinos; M= Muare; C= Coast-cross; F= Florakirk; T= Tifton-85; I= Período I; II= Período II.

4.3.3 Análise multivariada das distribuições das OTUs

Ocorreram efeitos significativos dos fatores espécies ($p=0,0001$), forrageiras ($p=0,0023$), períodos ($p=0,0249$) e da interação entre os fatores espécies e forrageiras ($p=0,0079$) sobre a distribuição das OTUs nos tratamentos experimentais.

Ocorreram diferenças entre: potros equinos e muare ($p=0,0001$), as forrageiras Coast-cross e Florakirk ($p=0,0089$) e Coast-cross e Tifton-85 ($p=0,0479$), entre os períodos iniciais e final do desmame ($p=0,0390$) e na interação espécies x forrageiras em potros equinos em todas as combinações entre as forrageiras e nos muare no Coast-cross e Florakirk ($p=0,0224$). Também houve semelhanças entre as forrageiras de Florakirk e Tifton-85 ($p=0,0819$), na interação espécies x forrageiras em potros equinos e muare no Coast-cross ($p=0,2295$) e nos muare em Coast-cross e Tifton-85 ($p=0,0797$) e também no Florakirk e Tifton-85 ($p=0,2632$).

A ordenação da distribuição das OTUs confirmou os resultados da análise multivariada (Figura 14). Houve a formação de três grupos: o 1º contendo potros equinos que se alimentaram com as forrageiras Florakirk e Tifton-85 (EFP1, EFP2, ETP1 e ETP2), esse grupo se subdividiu devido suas diferenças no período I (EFP1 e ETP1) e II (EFP2 e ETP2); o 2º grupo houve o agrupamento dos equinos e muare na pastagem de Coast-cross independente dos períodos (ECP1, ECP2, MCP1 e MCP2); o 3º grupo uniu os potros muare nas pastagens de Florakirk e Tifton-85 (MFP1, MFP2, MTP1 e MTP2), que também se subdividiu de acordo com os períodos experimentais: I (MFP1 e MTP1) e o II (MFP2 e MTP2).

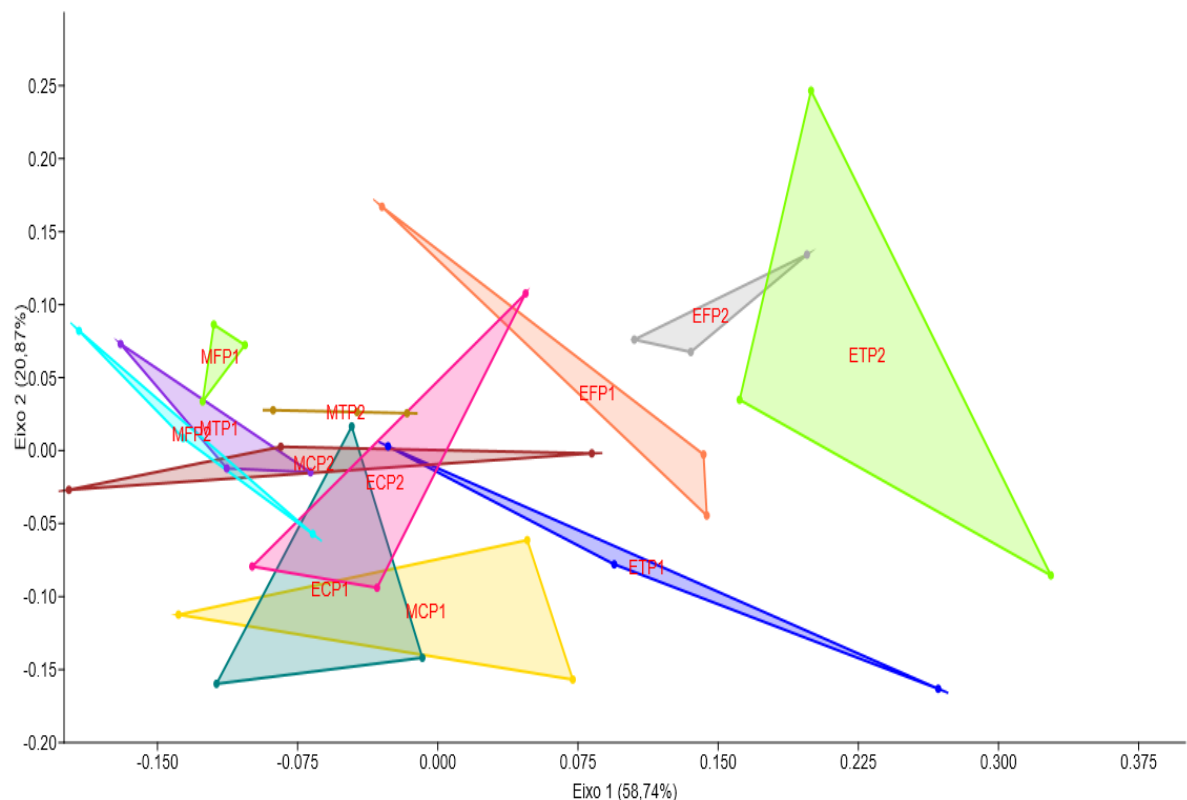


Figura 14. Escala multidimensional não métrica (NMDS) da distribuição das OTUs utilizando o índice de similaridade Bray-Curtis dos fatores espécies, pastagens e períodos.

4.3.4 Análise das OTUs indicadoras (LefSe)

Observou-se OTUs que promoveram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados os períodos experimentais de equinos e muarens nas pastagens de Florakirk e Tifton-85. Nos equinos detectou-se no total doze OTUs, sendo cinco no período inicial (Bacteroidales, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Limosilactobacillus e Agathobacter) e sete no período final do desmame (Bacteroidetes, Subdivisão 5, Bacteroidales, Synergistaceae, Muribaculaceae, Rumeliibacillus e Akkermansia) (Figura 15).

Nos muarens, verificou-se um total de seis OTUs indicadoras, havendo três OTUs em cada período experimental. No período inicial as OTUs eram representadas por Candidatus Saccharibacteria, Bacteroidales e Ruminococcus e no período final por Bacteroidetes, Lachnospiraceae e Ruminococcus (Figura 16).

Em potros equinos e muarens havia membros pertencentes aos filos mais abundantes (Firmicutes e Bacteroidetes), no entanto os equinos no período II apresentaram membros pertencentes aos filos Verrucomicrobia e Synergistetes, enquanto os muarens no período I apresentou uma OTU correspondente a Candidatus Saccharibacteria.

Ao comparar os efeitos das forrageiras identificou-se o total de 17 OTUs indicadoras, sendo seis no Coast-cross (Bacteroidetes, Bacteroidales, Bacteroidaceae, Ruminococcaceae e Prevotella), nove no Florakirk (Bacteroidetes, Bacteroidales, Lachnospiraceae, Prevotellaceae e Streptococcus) e duas no Tifton-85 (Clostridiales e Ruminococcaceae), que promoveram diferenças significativas. As pastagens de Coast-cross e Florakirk apresentaram membros dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, enquanto na pastagem de Tifton-85 apenas representantes de Firmicutes (Figura 17).

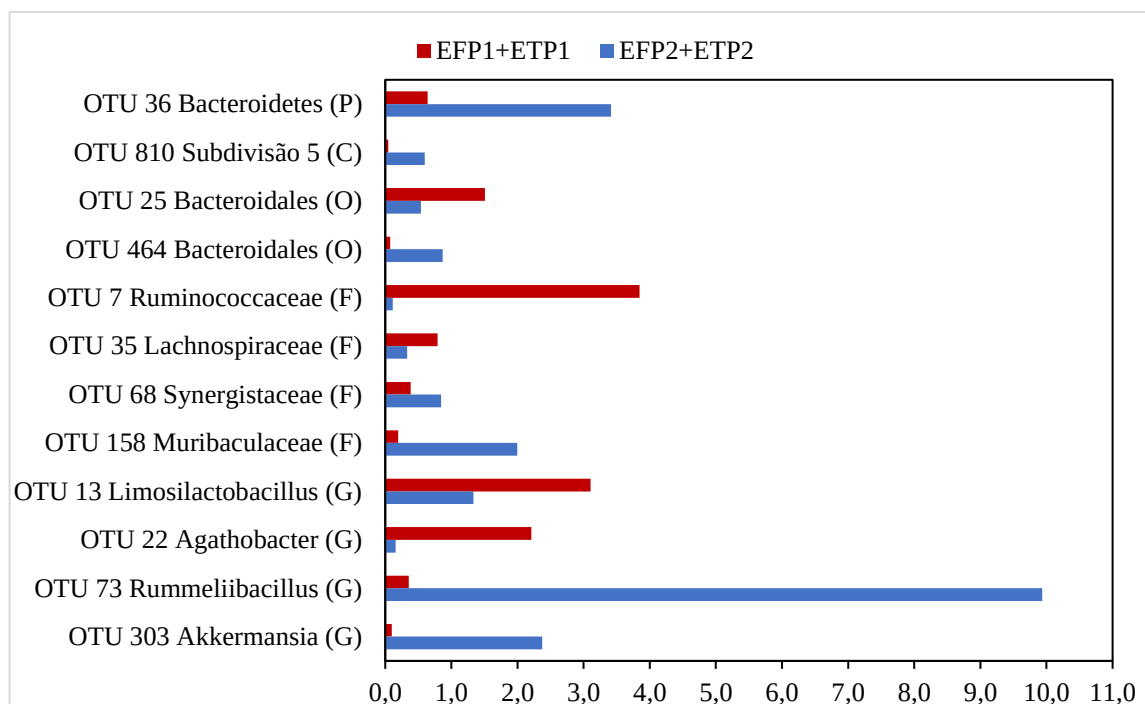


Figura 15. Comparação dos percentuais de abundância relativa das OTUs entre os dois grupos formados por equinos em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período I (EFP1+ETP1); equinos em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período II (EFP2+ETP2). Foram representadas as OTUs com diferenças significativas ($p < 0,05$) e frequências relativas igual ou maior que 0,6. Legenda da classificação das OTUs: P= Filo; C= Classe; O= Ordem; F= Família; G= Gênero.

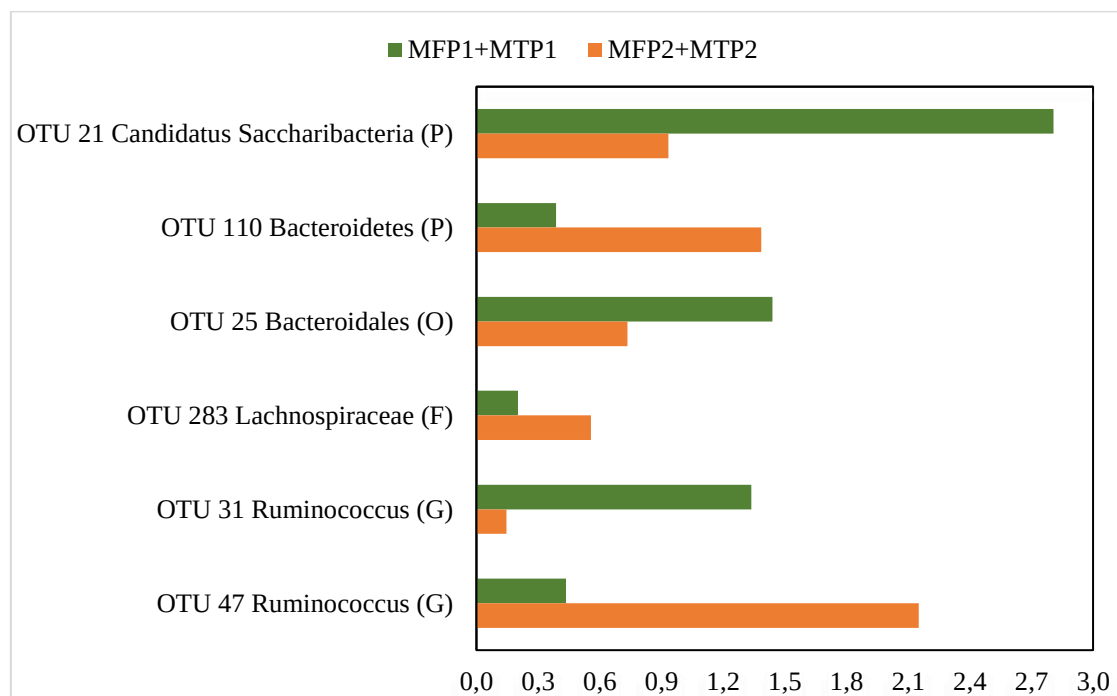


Figura 16. Comparação dos percentuais de abundância relativa das OTUs entre os dois grupos formados por muarees em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período I (MFP1+MTP1); muarees em pastagem de Florakirk e Tifton-85 no período II (MFP2+MTP2). Foram representadas as OTUs com diferenças significativas ($p < 0,05$) e frequências relativas igual ou maior que 0,6. Legenda da classificação das OTUs: P= Filo; O= Ordem; F= Família; G= Gênero.

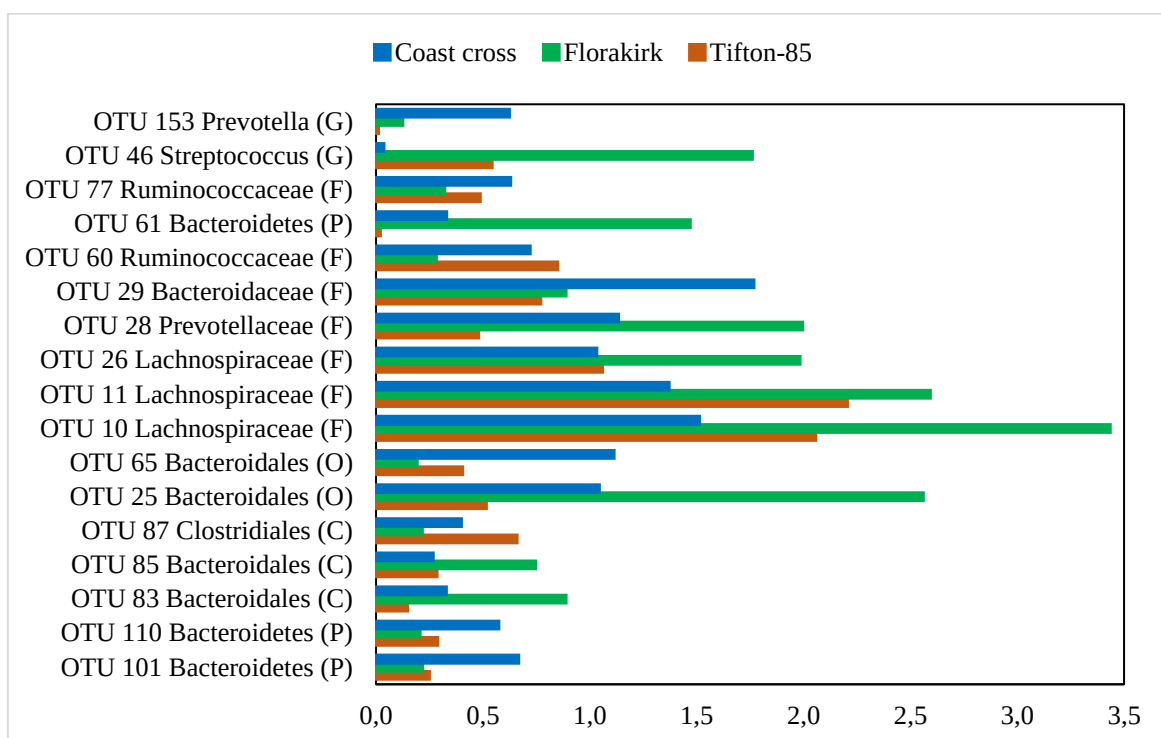


Figura 17. Comparação dos percentuais de abundância relativa das OTUs entre os três grupos formados pelas pastagens Coast-cross, Florakirk e Tifton-85. Foram representadas as OTUs com diferenças significativas ($p < 0,05$) e frequências relativas igual ou maior que 0,6. Legenda da classificação das OTUs: P= Filo; O= Ordem; F= Família; G= Gênero.

5 DISCUSSÃO

Os equídeos são herbívoros monogástricos, que possuem a anatomia digestiva especializada na degradação dos componentes fibrosos das dietas, o consumo de alimentos volumosos são a principal fonte de energia para animais em manutenção (SANTOS et al., 2011).

Houve diferenças entre a microbiota e a diversidade das comunidades bacterianas de potros equinos Mangalarga Machador e potros muares híbridos de jumento Pêga, por outro lado esse fator não proporcionou efeitos sobre as medidas de desempenho corporais dos potros. Houve concordância entre os resultados das técnicas dependentes e independentes de cultivo, visto que as contagens de *Streptococcus* e *Lactobacillus* spp., os percentuais das abundâncias relativas do filo e família (Firmicutes e Lactobacillaceae) a que esses dois microrganismos pertencem foram elevados em potros da espécie equina.

Também ocorreram diferenças entre os índices de diversidade de espécies, os potros equinos apresentaram o índice de Simpson elevado, enquanto os muares apresentaram valores superiores de OTUs e do índice de Shannon. O índice de Simpson elevado indica que a comunidade bacteriana possui uma maior dominância, neste caso, os membros do filo Firmicutes e famílias Lactobacillaceae e Clostridiales Incertae Sedis XIII dominaram a comunidade bacteriana, resultando em uma menor diversidade quando comparados aos muares. Os potros muares por outro lado, apresentaram número superior de espécies bacterianas que refletiram em abundâncias relativas elevadas, no entanto essas abundâncias se distribuíram nos filos Bacteroidetes, Spirochaetes e Fibrobacteres, nas famílias Spirochaetaceae e Prevotellaceae e no gênero Treponema. Desta forma os muares, de modo geral, apresentaram maior diversidade de espécies bacterianas fibrolíticas e melhor distribuição dos microrganismos que compõem a microbiota bacteriana fecal.

As diferenças entre as espécies avaliadas, potros equinos e muares, podem estar relacionadas a adaptações ou a associações entre essas estratégias de sobrevivência adquiridas pelos muares evolutivamente: anatomia digestiva favorável, aumento do tempo de retenção das partículas e microbiota fermentativa. Os asininos apresentam uma melhor digestibilidade da matéria seca dos componentes das dietas, atingindo uma melhor eficiência digestiva quando comparados aos equinos (SMITH e BURDEN, 2013). Eles são capazes de sobreviver com dietas contendo forragens de baixa qualidade e com escassez de água, como os muares são híbridos que possuem características intermediárias da espécie equina e asinina, essa estratégia adaptativa pode estar presente nos muares, conferindo uma maior capacidade de degradação das dietas ricas em fibras. A maior eficiência na degradação dos componentes fibrosos é resultado da retenção das forragens por períodos mais elevados e pelo fato desses animais utilizarem toda a capacidade do intestino grosso (ceco e colón), contribuindo para que os componentes da dieta sejam digeridos completamente (PEARSON et al., 2006). De acordo com CUDDEFORD et al. (1995), o aumento no consumo de forragens refletiu em uma maior capacidade de digestão do FDN e FDA dos muares em comparação a equinos e pôneis, resultando na elevação do pH fecal.

O uso de pastagens mistas ou consorciadas entre gramíneas e leguminosas é comum na Europa, porém ainda não é uma realidade aplicada ao sistema de produção brasileiro, que utiliza sistema de monocultura. No presente estudo os potros foram submetidos a manejo rotacionado em três piquetes contendo cultivares distintos de gramíneas do gênero *Cynodon*. As gramíneas do gênero *Cynodon* destacam-se na alimentação de equídeos, devido sua elevada produtividade de MS/hectare, bom valor nutritivo e possuem metabolismo C4 tendo maior eficiência fotossintética em ambientes tropicais com elevada incidência solar e clima quente (BRANDI e FURTADO, 2009).

O manejo rotacionado consiste na subdivisão das pastagens em piquetes, onde os animais permanecem no piquete por um determinado número de dias, seguido por um período de descanso para recuperação das forragens. Esse tipo de manejo permite o melhor aproveitamento das pastagens produzidas porque há uma uniformidade no pastejo, proporciona uma maior taxa de lotação de animais e, os períodos regulares de descanso garantem que o rebrote atinja a altura e a produção em matéria seca esperada. A altura ideal para os animais iniciarem o pastejo nos piquetes com gramíneas do gênero *Cynodon* é de 25 a 30 cm e de saída de 10 a 15 cm, o período recomendado de descanso para as gramíneas é de 21 a 28 dias, por isso adotou-se o intervalo entre a rotação entre as pastagens de 21 dias (MACHADO e KICHEL, 2004; TOWNSEND et al., 2012).

O consumo das forrageiras refletiu em diferenças nas medidas de desempenho, no pH fecal, nas concentrações de anaeróbicos totais, nas abundâncias relativas e nos índices de diversidade. A pastagem de Florakirk proporcionou ganhos superiores na altura na cernelha e nos perímetros do joelho e canela. As cultivares Florakirk e Coast-cross permitiram os melhores ganhos de peso, enquanto o Florakirk e Tifton-85 refletiram ganhos elevados do perímetro do antebraço, havendo valores superiores das alturas do costado no Coast-cross e valores intermediários no Florakirk. Em relação as medidas de desempenho as pastagens de Florakirk e Coast-cross de maneira geral proporcionaram ganhos superiores, e o melhor desempenho pode estar relacionado a maior disponibilidade de matéria seca por hectare do Coast-cross (13,1 t MS/ha), seguido pelo Florakirk (8,3 t MS/ha) e em terceiro o Tifton-85 (5,4 t MS/ha).

O pastejo dos potros no piquete de Coast-cross também resultou maiores valores do número de OTUs fecais, que refletiu em uma elevada riqueza de espécies confirmada pelo índice de Chao1. A maior disponibilidade desta forrageira pode ter favorecido o aumento do pH fecal devido a ingestão de alimentos ricos em fibras (Hillebrant e Dittrich, 2015), assim como a ingestão elevada de alimentos sólidos, nesse caso a forrageira proporcionou o aumento na abundância do filo Bacteroidetes e frequências intermediários da família Prevotellaceae, conforme relatado anteriormente por RODRIGUEZ et al. (2015).

O pastejo dos potros no piquete de Florakirk refletiu em diferenças nas comunidades bacterianas, ao consumir essa gramínea os potros elevaram as abundâncias das famílias Lachnospiraceae, Prevotellaceae e do gênero Agatobacter, assim como houve frequências relativas intermediárias do filo Bacteroidetes. A família Lachnospiraceae auxilia na colonização do trato digestório dos potros, além de contribuir na produção de ácidos graxos de voláteis (QUERCIA et al., 2019). Os valores intermediários de Bacteroidetes pode estar associado ao Florakirk apresentar a segunda maior disponibilidade de forragens, permitindo um bom consumo da forrageira pelos animais.

O pastejo dos potros no piquete de Tifton-85 apresentou valores intermediários do índice de riqueza de Chao1. Também houve valores elevados do pH fecal e nas contagens de anaeróbicos totais quando os animais consumiram as pastagens de Florakirk e Tifton-85, mesmo sendo a pastagem de Tifton-85 a que apresentou menor disponibilidade de MS/hectare. O Tifton-85 apresentou as maiores concentrações de matéria mineral, proteína bruta e frações fibrosas (FDN e FDA) e, os percentuais elevados dos componentes da fração fibrosa propiciaram elevação das populações bacterianas e do pH fecal.

Houve diferenças entre o período imediato ao desmame e o período tardio nas medidas de desempenho corporais, pH fecal, microbiota bacteriana fecal e diversidade de espécies. No período imediato ao desmame ocorreu maiores ganhos nas alturas no costado e nos perímetros torácico, antebraço, joelho e canela. Assim como foi elevado os valores de OTUs, dos índices Chao1 e Shannon e do pH fecal. No período tardio pós-desmame ocorreram maiores contagens de *Lactobacillus* spp., anaeróbicos totais, do índice de diversidade de Simpson e das abundâncias relativas do filo Firmicutes, família Lactobacillaceae e do gênero *Lysinibacillus*.

Com o desmame há um aumento no consumo de componentes fibrosos nas pastagens, visto que os potros passaram a se alimentar exclusivamente de volumosos e sal mineral, repercutindo assim na elevação de uma microbiota especializada na digestão de fibras. Aliada a maturação microbiana ocorrem mudanças anatômicas que podem auxiliar a adaptação a mudança alimentar. Aos seis meses de idade acontece a erupção dos dentes pré-molares que tem a função de esmagar e triturar os alimentos e também ocorre o aumento do intestino grosso, permitindo que as partículas fibrosas tenham um tempo de retenção maior promovendo uma melhor digestibilidade dos componentes da dieta (FAUBLADIER et al., 2017). Como consequência da estabilização microbiana, ocorre o aumento de microrganismos fibrolíticos, resultando na elevação das OTUs e na riqueza e diversidade de espécies. Assim como, esse aumento da ingestão de carboidratos estruturais da parede vegetal das gramíneas, especificamente o FDN e FDA proporcionaram a elevação do pH fecal.

No período tardio pós-desmame também houve similaridade entre as técnicas dependentes e independentes de cultivo. As contagens de *Lactobacillus* spp., as abundâncias relativas a nível de filo, família, gênero Firmicutes, Lactobacillaceae e *Lysinibacillus* e o índice de diversidade de Simpson foram elevados nesse período experimental. Como houve dominância do filo Firmicutes, a comunidade bacteriana mostrou-se mais diversa no período imediato ao desmame, confirmando o resultado do índice de Shannon.

Os períodos pós-desmame proporcionaram diferenças entre as abundâncias relativas dos filos Firmicutes, família Lactobacillaceae e gênero *Lysinibacillus* que foram elevadas no período tardio pós-desmame. As contagens em meios de cultivo de *Lactobacillus* spp. e de anaeróbicos totais e o índice de Simpson também foram superiores no período tardio, por outro lado os valores médios de pH fecal, número de OTUs, índice de riqueza de Chao1 e de diversidade de Shannon foram maiores no período inicial pós-desmame.

Novas e promissoras pesquisas avaliando outras forrageiras e o manejo das pastagens com potros desmamados devem ser conduzidas relacionando as mudanças na disponibilidade e composição bromatológica das forrageiras e as implicações nas populações bacterianas no trato digestório e no desempenho dos potros.

6 CONCLUSÕES

Os filos Firmicutes (57%) e Bacteroidetes (22%) predominaram na microbiota fecal de potros desmamados, representando juntos cerca de 79% da microbiota de potros desmamados. Os mares apresentaram maior diversidade de espécies fibrolíticas indicando que eles possuem uma eficiência superior na degradação das fibras.

Os fatores espécies (potro equino e potro mar), forrageiras e períodos pós-desmame refletiram em diferenças na comunidade bacteriana fecal: nas contagens bacterianas, abundâncias relativas, nos índices de diversidade e no pH fecal, sendo possível detectar mudanças na microbiota fecal através das técnicas dependentes e independentes de cultivo.

Apenas as forrageiras e períodos pós-desmame promoveram diferenças entre as medidas de desempenho corporal. As forrageiras que repercutiram em melhores ganhos foram o Florakirk e o Coast-cross, e, no período imediato ao desmame houve maior desenvolvimento dos potros.

Os potros equinos superaram o mínimo esperado em altura, porém não atingiram o peso vivo estimado de acordo com o padrão racial de equino adulto Mangalarga Marchador.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. I. V. D.; FERREIRA, W. M.; ALMEIDA, F. Q. D.; GONÇALVES, L. C.; REZENDE, A. S. C. Composição química e predição do valor nutritivo de dietas para eqüinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p. 1268-1278, 1999. doi: 10.1590/S1516-35981999000600014
- APTER, R. C.; HOUSEHOLDER, D. D. Weaning and weaning management of foals: a review and some recommendations. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 16, n. 10, p. 428-435, 1996. doi: 10.1016/S0737-0806(96)80208-5
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DO CAVALO MANGALARGA MARCHADOR – ABCCMM. **Estatuto**. Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <<http://www.abccmm.org.br/estatutos>>. Acesso em 02 de set. 2021.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.
- BAILEY, S. R.; BAILLON, M. L.; RYCROFT, A. N.; HARRIS, P. A.; ELLIOTT, J. Identification of equine cecal bacteria producing amines in an in vitro model of carbohydrate overload. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2087-2093, 2003. doi: 10.1128/AEM.69.4.2087-2093.2003
- BARUC, C. I.; DAWSON, K. A.; BAKER, J. P. The characterization of nitrogen metabolism of equine caecal bacteria. In: Equine Nutrition and Physiology Symposium, 8, Lexington. **Proceedings...** University of Kentucky, p. 151-156, 1983.
- BECVAROVA, I.; BUECHNER-MAXWELL, V. Feeding the foal for immediate and long-term health. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 149-156, 2012. doi: 10.1111/j.2042-3306.2011.00522.x
- BERG, E. L.; FU, C. J.; PORTER, J. H.; KERLEY, M. S. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: Effects on fecal pH, microbial content and volatile fatty acid concentrations. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1549-1553, 2005. doi: 10.2527 / 2005.8371549x
- BRYANT, M. P.; BURKEY, L. A. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p. 205–217, 1953. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(53)91482-9
- BURTON, G. W.; GATES, R. N.; HILL, G. M. Registration of “Tifton-85” bermudagrass. **Crop Science**, v. 33, n. 3, p. 644-645, 1993. doi: 10.2135/cropsci1993.0011183X003300030045x
- CABRAL, G. C.; ALMEIDA, F. Q.; QUIRINO, C. R.; PINTO, L. F. B.; SANTOS, E. M.; CORASSA, A. Avaliação morfométrica de eqüinos da raça Mangalarga Marchador: medidas lineares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 989-1000, 2004. doi: 10.1590/s1516-35982004000700018
- CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, p. 265-270, 1984. doi: 10.2307/4615964

- COLE, J. R.; WANG, Q.; FISH, J. A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D. M.; SUN, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1244
- COSTA, M. C.; STÄMPFLI, H. R.; ALLEN-VERCOE, E.; WEESE, J. S. Development of the faecal microbiota in foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, n. 6, p. 681-688, 2016. doi:10.1111/evj.12532
- COSTA, M. C.; WEESE, J. S. The equine intestinal microbiome. **Animal Health Research Reviews**, v. 13, n. 1, p. 121-128, 2012. doi: 10.1017 / S1466252312000035
- DE FOMBELLE, A.; VARLOUD, M.; GOACHET, A. G.; JACOTOT, E.; PHILIPPEAU, C.; DROGOUL, C.; JULLIAND, V. **Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 293-304, 2003. doi: 10.1017/S1357729800059038
- DE LA TORRE, U.; HENDERSON, J. D.; FURTADO, K. L.; PEDROJA, M.; ELENAMARIE, O.; MORA, A.; PECHANEC, M. Y.; MAGA, E. A.; MIENALTOWSKI, M. J. Utilizing the fecal microbiota to understand foal gut transitions from birth to weaning. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. 1–18, 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0216211
- DITTRICH, J. R.; CARVALHO, P. C. F.; MORAES, A.; LUSTOSA, S. B. C.; SILVEIRA, E. O.; OLIVEIRA, E. B. Preferência de equinos em pastejo: efeito da altura de dosséis de gramíneas do gênero *Cynodon*. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, 2005. doi: 10.5380/avs.v10i2.4418
- DITTRICH, J. R. **Relações entre a estrutura das pastagens e a seletividade de equinos em pastejo**. 2001. 77p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 26, p. 11971-11975, 2010. doi: 10.1073 / pnas.1002601107
- DUFRENE, M.; LEGENDRE, P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. **Ecological monographs**, v. 67, n. 3, p. 345-366, 1997. doi: 10.2307/2963459
- EARING, J. E.; DURIG, A. C.; GELLIN, G. L.; LAWRENCE, L. M.; FLYTHE, M. D. Bacterial colonization of the equine gut; comparison of mare and foal pairs by PCR-DGGE. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 79-86, 2012. doi: 10.4236/aim.2012.22010
- EDGAR, R. C.; HAAS, B. J.; CLEMENTE, J. C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381
- ESCODRO, P. B.; TOBYAS, M.; DITTRICH, J. R.; NETO, M. S.; LIMA, C. B.; RIBEIRO, J. S. Padrão biométrico, medidas de atrelagem e índice de carga de equídeos de tração urbana do município de Arapiraca, Alagoas. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, n. 2, 2014. doi: 10.5380/avs.v19i2.34085

- FAUBLADIER, C.; JULLIAND, V.; BEUNEICHE, L.; PHILIPPEAU, C. Comparative fibre-degrading capacity in foals at immediate and late post-weaning periods. **Animal**, v. 11, n. 9, p. 1497-1504, 2017. doi: 10.1017/S1751731117000349
- FAUBLADIER, C.; JULLIAND, V.; DANIEL, J.; PHILIPPEAU, C. Bacterial carbohydrate-degrading capacity in foal faeces: changes from birth to pre-weaning and the impact of maternal supplementation with fermented feed products. **British Journal of Nutrition**, v.1, p.1-13, 2013. doi: 10.1017 / S0007114512006162
- FAUBLADIER, C.; SADET-BOURGETEAU, S.; PHILIPPEAU, C.; JACOTOT, E.; JULLIAND, V. Molecular monitoring of the bacterial community structure in foal feces pre- and post-weaning. **Anaerobe**, v. 25, p. 61–66, 2014. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.11.010
- FRAPE, D. **Nutrição e alimentação de equinos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. 602p.
- FURET, J. P.; FIRMESSE, O.; GOURMELON, M.; BRIDONNEAU, C.; TAP, J.; MONDOT, S.; DORÉ, J.; ORTHIER, G. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 3, p. 351-362, 2009. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00671.x
- GARRETT, L. A.; BROWN, R.; POXTON, I. R. A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 81-88, 2002. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00018-4
- GONÇALVES, G. D.; DOS SANTOS, G. T.; CECATO, U.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C., BRANCO, A. F.; FARIA, K. P. Produção e valor nutritivo de gramíneas do gênero *Cynodon* em diferentes idades ao corte durante o ano. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, n. 24, p. 1163-1174, 2012.
- HALLIWELL, G.; BRYANT, M. The cellulolytic activity of pure culture strains of bacteria from the rumen of cattle. **Journal Genetic Microbiology**, v. 32, p. 441-448, 1963. doi: 10.1099 / 00221287-32-3-441
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electrônica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.
- HARLOW, B. E.; LAWRENCE, L. M.; FLYTHE, M. D. Sample-handling factors affecting the enumeration of lactobacilli and cellulolytic bacteria in equine feces. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 9, p. 744-748. e1, 2015. doi: 10.1016/j.jevs.2015.07.011
- HENRY, S.; ZANELLA, A. J.; SANKEY, C.; RICHARD-YRIS, M. A.; MARKO, A.; HAUSBERGER, M. Adults may be used to alleviate weaning stress in domestic foals (*Equus caballus*). **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 4, p. 428-438, 2012. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.02.025
- HILL, G. M.; GATES, R. N.; WEST, J. W.; BURTON, G. W. Tifton-85 bermudagrass utilization in beef, dairy, and hay production. In: Workshop sobre o potencial forrageiro do Gênero *Cynodon*. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa - CNPGL, p. 139-150, 1996.
- HILLEBRANT, R.; DITTRICH, J. R. Anatomia e fisiologia do aparelho digestório de equinos aplicadas ao manejo alimentar. **Revista Acadêmica de Ciência Equina**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2015.
- HOFFMAN, R. M. Carbohydrate metabolism and metabolic disorders in horses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 270-276, 2009. doi: 10.1590/S1516-35982009001300027

- HUSSO, A.; JALANKA, J.; ALIPOUR, M. J.; HUHTI, P.; KARESKOSKI, M.; PESSA-MORIKAWA, T.; IIVANAINEN, A.; NIKU, M. The composition of the perinatal intestinal microbiota in horse. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. doi: 10.1038/s41598-019-57003-8
- ÍTAVO, L. C. V.; MORAES, E. H. B. K; PAULINO, P.V. R. Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente de fenos de gramíneas do gênero *Cynodon* e rações concentradas utilizando indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 1024-1032, 2002. doi: 10.1590/S1516-35982002000400027
- JULLIAND, V.; DE VAUX, A.; MILLET, L.; FONTY, G. Identification of *Ruminococcus flavefaciens* as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3738-3741, 1999. doi: 10.1128 / AEM.65.8.3738-3741.1999
- LEEDLE, J. A. Z.; HESPELL, R. B. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 709-719, 1980. doi: 10.1128 / aem.39.4.709-719.1980
- LEITE, G. G.; MACHADO, F. O. C. **Capim “Coast-cross” (*Cynodon dactylon* (L.) Pers).** Embrapa Cerrados - Comunicado Técnico, n. 1, p. 6, 1999.
- LINDENBERG, F.; KRYCH, L.; KOT, W.; FIELDEN, J.; FRØKLÆR, H.; VAN GALEN, G.; NIELSEN, D. S.; HANSEN, A. K. Development of the equine gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1 – 9, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-50563-9
- MACH, N.; FOURY, A.; KITTELMANN, S.; REIGNER, F.; MOROLDO, M.; BALLESTER, M.; MOISAN, M. P. The effects of weaning methods on gut microbiota composition and horse physiology. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 535, 2017. doi: 10.3389/fphys.2017.00535
- MACHADO, L. A. Z; KICHEL, A. N. **Ajuste de lotação no manejo de pastagens.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, vol. 62, 2004.
- MACKIE, R. I.; WILKINS, C. A. Enumeration of anaerobic bacterial microflora of the equine gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2155-2160, 1988. doi: 10.1128/aem.54.9.2155-2160.1988
- MAPA - **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.** BRASIL. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>. Acesso em 02 de setembro de 2021.
- McMANUS, C.; PAIVA, S.; LOUVANDINI, H.; MELO, C.; SEIXAS, L. **Jumentos no Brasil.** INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira, 2010.
- MEYER, H. **Alimentação de cavalos.** 2.ed. São Paulo: Varela, 303 p.1995.
- MIRANDA, A. L. S.; PALHARES, M. S. Mares: Características, origem e particularidades clínico-laboratoriais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 29, p. 1-8, 2017.
- MISLEVY, P.; BROWN, W. F.; KALMBACHER, R. S.; DUNAVIN, L. S.; JUDD, W. S.; KUCHAREK, T. A.; RUELKE, O. C.; NOLING, J. W.; STANLEY JR. R. L. Registration of Florakirk'bermudagrass. **Crop Science**, v. 39, n. 2, p. 587-588, 1999. doi: 10.2135/cropsci1999.0011183X003900020055x

MOREIRA, C. G. **Estudo exploratório sobre biometria e estimativa de peso vivo de jumentos da raça Pêga**. 2016. 54p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

MORGADO, E. S.; ALMEIDA, F. Q.; GODOI, F. N.; GOMES, A. V. C.; GALZERANO, L.; FRANÇA, A. B.; BRASILEIRO, L. S. Digestão de carboidratos em equinos alimentados com dietas compostas de volumoso ou de volumoso suplementado com concentrado e/ou óleo de soja. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1112-1119, 2009. doi: 10.1590/S0102-09352009000500014

MUHONEN, S.; JULLIAND, V.; LINDBERG, J. E.; BERTILSSON, J.; JANSSON, A. Effects on the equine colon ecosystem of grass silage and haylage diets after an abrupt change from hay. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 7, p. 2291-2298, 2009. doi: 10.2527/jas.2008-1461

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, **Nutrient requirements of horses**. 6^a ed. Washington: National Academy Press, 2007. 341p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, **Nutrient requirements of horses**. 5^a ed. Washington: National Academy Press, 1989. 112p.

OLIVEIRA, V. B.; SANCHEZ, S. B.; ALMEIDA, F. Q. **Muares: tema transversal para o ensino médio e técnico em agropecuária**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Publitz Ed., 2007. 127p.

OLTRAMARI, C. E.; PAULINO, V. T. Forrageiras para gado leiteiro. **Curso de Produção Animal Sustentável**, Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, v. 1, p. 1–22, 2009.

PEDREIRA, C. G. S. Avaliação de novas gramíneas do gênero *Cynodon* para a pecuária do sudeste dos Estados Unidos. In: Workshop sobre o potencial forrageiro do gênero *Cynodon*, Juiz de Fora. **Anais...** EMBRAPA. p.111-126, 1996.

PINTO, L. F. B.; ALMEIDA, F. Q.; QUIRINO, C. R.; CABRAL, G. C.; AZEVEDO, P. C. N D.; SANTOS, E. M. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise discriminante. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 600-612, 2005. doi: 10.1590/S1516-35982005000200030

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2012. doi: 10.1093/nar/gks1219

QUERCIA, S.; FRECCERO, F.; CASTAGNETTI, C.; SOVERINI, M.; TURRONI, S.; BIAGI, E.; RAMPELLI, S.; LANCI, A.; MARIELLA, J.; CHINELLATO, E.; BRIGIDI, P.; CANDELA, M. Early colonisation and temporal dynamics of the gut microbial ecosystem in Standardbred foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 2, p. 231–237, 2019. doi: 10.1111/evj.12983

RADÜNZ, E. **A estrutura de gramíneas do gênero *Cynodon* e o comportamento ingestivo de equinos**. 2008. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RESPONDEK, F.; GOACHET, A. G.; JULLIAND, V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 316-323, 2008. doi: 10.2527/jas.2006-782

- REZENDE, A. S. C. D.; SAMPAIO, I. B. M.; LEGORRETA, G. L.; MOREIRA, D. C. D. A. Efeito de dois diferentes programas nutricionais sobre o desenvolvimento corporal de potros Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n. 2, p. 495-501, 2000. doi: 10.1590/S1516-35982000000200024
- RIBEIRO, R. A.; SOUZA, F. A. C.; MUNIZ, J. A.; FERNANDES, T. J.; MOURA, R. S. Curva de crescimento em altura na cernelha de equinos da raça Mangalarga Marchador considerando-se heterocedasticidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 272-278, 2018. doi: 10.1590/1678-4162-9322
- RINGLER, J. E.; LAWRENCE, L. M. Comparison of Thoroughbred growth data to body weights predicted by the NRC. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 2, p. 97-101, 2008. doi: 10.1016/j.jevs.2008.01.007
- RODRIGUES, A. N.; RAMOS, G.; HILGEMBERG, B.; COSTA, V.; FERREIRA, E. M.; BIAVA, J. S. Caracterização morfométrica e índices corporais de *Equus caballus* e *Equus asinus*. In: Encontro Anual de Iniciação Científica, 16. Ponta Grossa/PR. **Anais...**, 2017.
- RODRÍGUEZ, J. M.; MURPHY, K.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; KOBER, O. I.; JUGE, N.; AVERSHINA, E.; RUDI, K.; NARBAD, A.; JENMALM, M. C.; MARCHESI, J. R.; COLLADO, M. C. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, n. 1, p. 26050, 2015. doi: 10.3402/mehd.v26.26050
- SADET-BOURGETEAU, S.; JULLIAND, V. La diversité de l'écosystème microbien du tractus digestif équin. **Production Animale**, v.25, n.5, p. 407-418, 2012. doi: 10.20870/productions-animales.2012.25.5.3228
- SANTOS, A. S.; RODRIGUES, M. A. M.; BESSA, R. J. B.; FERREIRA, L. M.; MARTIN-ROSSET, W. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. **Animal**, v. 5, n. 1, p. 48-56, 2011. doi: 10.1017/S1751731110001588
- SANTOS, E. M.; ALMEIDA, F. Q.; VIEIRA, A. A.; PINTO, L. F. B.; CORASSA, A.; PIMENTEL, R. R. M.; SILVA, V. P.; GALZERANO, L. Lactação em éguas da raça Mangalarga Marchador: produção e composição do leite e ganho de peso dos potros lactentes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 627-634, 2005. doi: 10.1590/S1516-35982005000200032
- SARMENTO, N. L. A. F. **Composição química e degradabilidade ruminal de gramíneas do gênero *Cynodon***. 2010. 49p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Montes Claros. Montes Claros, 2010.
- SARRAFCHI, A.; BLOKHUIS, H. J. Equine stereotypic behaviours: causation, occurrence, and prevention. **Journal of Veterinary Behaviour**, v. 8, p. 386-394, 2013. doi: 10.1016/j.jveb.2013.04.068
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009. doi: 10.1128/AEM.01541-09

- SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. 1-18, 2011. doi: 10.1186 / gb-2011-12-6-r60
- SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**, v. 27, n. 3, p. 379-423, 1948. doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária, 3ª edição, 2006. 235 p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Logomarca Varela, 3ª edição, 2017. 109p.
- SILVA, V. P.; ALMEIDA, F. Q. D.; PIMENTEL, R. R. M.; GODOI, F. N. D.; SANTOS, T. M. D.; PIRES, M. S. Passage kinetics of digesta in horses fed with coastcross hay ground to different degrees. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 5, p. 506-514, 2014. doi: 10.1590/S1413-70542014000500010
- SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688-688, 1949. doi: 10.1038/163688a0
- THOMPSON, K. N. Skeletal growth rates of weanling and yearling thoroughbred horses. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2513-2517, 1995. doi: 10.2527/1995.7392513x
- TOWNSEND, C. R.; COSTA, N. L.; PEREIRA, R. G. A. **Recuperação e práticas sustentáveis de manejo de pastagens na Amazônia**. Embrapa Rondônia-Documents (INFOTEC-E), 2012.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. p. 49-60. In: Standardization of analytical methodology for feeds. **Proceedings...** IDRC, Ottawa, ON, Canada, 1980.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- VARLOUD, M.; FONTY, G.; ROUSSEL, A.; GUYONVARCH, A.; JULLIAND, V. Postprandial kinetics of some biotic and abiotic characteristics of the gastric ecosystem of horses fed a pelleted concentrate meal. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 10, p. 2508-2516, 2007. doi: 10.2527/jas.2006-182
- VICTOR, R. P.; ASSEF, L. C.; PAULINO, V. T. **Forrageiras para equinos**. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa – SP, 2007. Disponível em: <http://www.iz.sp.gov.br/artigos.php?ano=2007>. Acesso em 23 de agosto de 2021.
- XING, J.; LIU, G.; ZHANG, X.; BAI, D.; YU, J.; LI, L.; WANG, X.; SU, S.; ZHAO, Y.; BOU, G.; DUGARJAVIIN, M. (2020). The Composition and Predictive Function of the Fecal Microbiota Differ Between Young and Adult Donkeys. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3016. 10.3389/fmicb.2020.596394

8 ANEXOS

A – Declaração de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/IZ/UFRRJ

Declaração

Declaro que a atividade de pesquisa intitulada “**Microbiota fecal de potros no pós-desmame.**” – processo nº 0063-07-2019 – coordenada pelo Prof. Dr. Fernando Queiroz de Almeida, está de acordo com as normas do uso de animais em atividades de ensino e pesquisa do CONCEA e foi aprovada na XXXIX Reunião da CEUA/IZ/UFRRJ em 02/07/2019.

Seropédica, 8 de julho de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ
SIAPE: 2142739 DPA-IZ/UFRRJ

B – Análises de variância das variáveis de desempenho corporal

Normalidade - Teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)

Tratamentos	p-valor
Ganho de Peso diário	0,5433961*
Altura na cernelha	0,4958072*
Altura na garupa	0,4264011*
Altura no costado	0,1727682*
Comprimento corporal	0,06574578*
Perímetro torácico	0,008459254
Perímetro do antebraço	0,205023*
Perímetro do joelho	4,894598e-06
Perímetro da canela	1,55234e-09

ANOVA - Teste F ($p < 0,05$)

Ganho de peso diário

FV	p-valor
Espécies	0,5166
Pastagens	7e-04*
Períodos	0,406
Espécies*Pastagens	0,343
Espécies*Períodos	0,4702
Pastagens*Períodos	0,0014*
Espécies*Pastagens*Períodos	0,1527

Ganho da altura na cernelha

FV	p-valor
Espécies	0,6476
Pastagens	0,0065*
Períodos	0,8423
Espécies*Pastagens	0,9706
Espécies*Períodos	0,7296
Pastagens*Períodos	0,0142*
Espécies*Pastagens*Períodos	0,4569

Ganho da altura na garupa

FV	p-valor
Espécies	0,8838
Pastagens	0,2591
Períodos	0,0713
Espécies*Pastagens	0,7812
Espécies*Períodos	0,4313
Pastagens*Períodos	0,0087*
Espécies*Pastagens*Períodos	0,0487*

Ganho da altura do costado

FV	p-valor
Espécies	0,6775
Pastagens	0,0027*
Períodos	0,0171*
Espécies*Pastagens	0,2543
Espécies*Períodos	0,3842
Pastagens*Períodos	0,0083*
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7901

Ganho do comprimento corporal

FV	p-valor
Espécies	0,5084
Pastagens	0,0565
Períodos	0,0917
Espécies*Pastagens	0,0677
Espécies*Períodos	0,3232
Pastagens*Períodos	0,0011*
Espécies*Pastagens*Períodos	0,5641

Ganho do perímetro do antebraço

FV	p-valor
Espécies	0,1512
Pastagens	3e-04*
Períodos	0,0*
Espécies*Pastagens	0,5409
Espécies*Períodos	0,5902
Pastagens*Períodos	0,0*
Espécies*Pastagens*Períodos	0,1151

C – Análises de variância microbiológicas das técnicas dependentes de cultivo

Normalidade - Teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)

Tratamentos	p-valor
pH	0,8465121*
Streptococcus	0,1272897*
Lactobacillus	0,8360060*
Anaeróbicos totais	6,162858e-09
Bactérias celulolíticas	0,00524913

ANOVA - Teste F ($p < 0,05$)

pH fecal

FV	p-valor
Espécies	2e-04*
Pastagens	5e-04*
Períodos	3e-04*
Espécies*Pastagens	0,1828
Espécies*Períodos	0,7125
Pastagens*Períodos	0,0012*
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7423

Contagens de Streptococcus

FV	p-valor
Espécies	0,0046*
Pastagens	0,4577
Períodos	0,0744
Espécies*Pastagens	0,6801
Espécies*Períodos	0,4731
Pastagens*Períodos	0,6296
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7549

Contagens de Lactobacillus

FV	p-valor
Espécies	7e-04*
Pastagens	0,9122
Períodos	2e-04*
Espécies*Pastagens	0,4083
Espécies*Períodos	0,0411*
Pastagens*Períodos	0,8529
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7622

D – Análises de variância utilizando testes não paramétricos

ANOVA - Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Ganho do perímetro da torácico

FV	p-valor
Espécies	0,9481
Pastagens	0,3437
Períodos	0,0019*

Ganho do perímetro do joelho

FV	p-valor
Espécies	0,918
Pastagens	0,0001*
Períodos	0,0053*

Ganho do perímetro da canela

FV	p-valor
Espécies	0,6940
Pastagens	0,0002*
Períodos	0,0408*

Concentração de anaeróbicos totais

FV	p-valor
Espécies	0,2010
Pastagens	0,0338*
Períodos	0,0045*

Concentração de bactérias celulolíticas

FV	p-valor
Espécies	0,7876
Pastagens	0,5746
Períodos	0,7402

E – Análises de variância dos índices de riqueza e diversidade

Normalidade - Teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)

Tratamentos	p-valor
OTUs	0,1425005 *
Chao 1	0,5766783*
Shannon	0,2098725*
Simpson ¹	0,1026591*

¹Dados transformados para base logarítmica

ANOVA - Teste F ($p < 0,05$)

OTUs

FV	p-valor
Espécies	0,0165*
Pastagens	0,0255*
Períodos	0,0155*
Espécies*Pastagens	0,0235*
Espécies*Períodos	0,5081
Pastagens*Períodos	0,2266
Espécies*Pastagens*Períodos	0,4618

Chao 1

FV	p-valor
Espécies	0,0977
Pastagens	0,0322*
Períodos	0,0474*
Espécies*Pastagens	0,0516
Espécies*Períodos	0,4432
Pastagens*Períodos	0,2087
Espécies*Pastagens*Períodos	0,4165

Shannon

FV	p-valor
Espécies	0,006*
Pastagens	0,1367
Períodos	0,0157*
Espécies*Pastagens	0,039*
Espécies*Períodos	0,5183
Pastagens*Períodos	0,3012
Espécies*Pastagens*Períodos	0,5322

Simpson

FV	p-valor
Espécies	0,0161*
Pastagens	0,3737
Períodos	0,0235*
Espécies*Pastagens	0,049*
Espécies*Períodos	0,7138
Pastagens*Períodos	0,3348
Espécies*Pastagens*Períodos	0,5078

F - Análises de variância da abundância relativa dos filos > 1%

Normalidade - Teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)

Tratamentos	p-valor
Firmicutes	0,9177757*
Bacteroidetes	0,4690731*
Verrucomicrobia	0,9032776*
Bacteria Unclassified	0,4378765*
Spirochaetes	0,6206542*
Proteobacteria	0,2174744*
Candidatus Saccharibacteria ¹	0,5133255*
Actinobacteria ¹	0,1318243*
Fibrobacteres ¹	0,1817752*

¹Dados transformados para base logarítmica

ANOVA - Teste F ($p < 0,05$)

Firmicutes

FV	p-valor
Espécies	0,0348*
Pastagens	0,0875
Períodos	0,0047*
Espécies*Pastagens	0,7520
Espécies*Períodos	0,9088
Pastagens*Períodos	0,1801
Espécies*Pastagens*Períodos	0,0634

Bacteroidetes

FV	p-valor
Espécies	0,0045*
Pastagens	0,0101*
Períodos	0,0746
Espécies*Pastagens	0,2312
Espécies*Períodos	0,8110
Pastagens*Períodos	0,3146
Espécies*Pastagens*Períodos	0,1895

Verrucomicrobia

FV	p-valor
Espécies	0,5019
Pastagens	0,6440
Períodos	0,2029
Espécies*Pastagens	0,0633
Espécies*Períodos	0,8849
Pastagens*Períodos	0,8564
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7062

Bacteria Unclassified

FV	p-valor
Espécies	0,1475
Pastagens	0,6864
Períodos	0,2364
Espécies*Pastagens	0,2473
Espécies*Períodos	0,8026
Pastagens*Períodos	0,7639
Espécies*Pastagens*Períodos	0,3257

Spirochaetes

FV	p-valor
Espécies	2e-04*
Pastagens	0,9918
Períodos	0,1951
Espécies*Pastagens	0,0048*
Espécies*Períodos	0,6828
Pastagens*Períodos	0,7694
Espécies*Pastagens*Períodos	0,4140

Proteobacteria

FV	p-valor
Espécies	0,7758
Pastagens	0,2725
Períodos	0,2340
Espécies*Pastagens	0,0618
Espécies*Períodos	0,9609
Pastagens*Períodos	0,0848
Espécies*Pastagens*Períodos	0,63

Candidatus Saccharibacteria

FV	p-valor
Espécies	0*
Pastagens	0,55
Períodos	0,8047
Espécies*Pastagens	0,0045*
Espécies*Períodos	0,7277
Pastagens*Períodos	0,0972
Espécies*Pastagens*Períodos	0,6290

Fibrobacteres

FV	p-valor
Espécies	0,0223*
Pastagens	0,0643
Períodos	0,0733
Espécies*Pastagens	0,1742
Espécies*Períodos	0,5250
Pastagens*Períodos	0,8367
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7538

Actinobacteria

FV	p-valor
Espécies	0,1420
Pastagens	0,2751
Períodos	0,3957
Espécies*Pastagens	0,0267*
Espécies*Períodos	0,7168
Pastagens*Períodos	0,8676
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7924

G - Análises de variância da abundância relativa dos filos < 1%

Normalidade - Teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)

Tratamentos	p-valor
Synergistetes ¹	0,8426446*
Plactomycetes ¹	0,3026495*
Armatimonadetes ¹	0,5593259*
SR1 ¹	0,005213016
Campilobacterota ¹	0,02344848
Lentisphaerae ¹	2,876761e-07
Tenericutes ¹	0,2579066*
Elusimicrobia ¹	0,3985392*
Chloroflexi ¹	0,1874897*
Chlamydiae ¹	9,887573e-06
Fusobacteria ¹	0,0001049377

¹Dados transformados para base logarítmica

ANOVA - Teste F ($p < 0,05$)

Synergistetes

FV	p-valor
Espécies	0,2087
Pastagens	0,2101
Períodos	0,0226*
Espécies*Pastagens	0,5603
Espécies*Períodos	0,0489*
Pastagens*Períodos	0,4369
Espécies*Pastagens*Períodos	0,921

Armatimonadetes

FV	p-valor
Espécies	0,1153
Pastagens	0,0472*
Períodos	0,7362
Espécies*Pastagens	0,7049
Espécies*Períodos	0,0976
Pastagens*Períodos	0,1071
Espécies*Pastagens*Períodos	0,0564

Campilobacterota

FV	p-valor
Espécies	0,8393
Pastagens	0,5972
Períodos	0,0856
Espécies*Pastagens	0,2833
Espécies*Períodos	0,677
Pastagens*Períodos	0,6066
Espécies*Pastagens*Períodos	0,1647

Plactomycetes

FV	p-valor
Espécies	0,5006
Pastagens	0,0858
Períodos	0,7578
Espécies*Pastagens	0,3304
Espécies*Períodos	0,9269
Pastagens*Períodos	0,0914
Espécies*Pastagens*Períodos	0,632

SR1

FV	p-valor
Espécies	0,345
Pastagens	0,6688
Períodos	0,325
Espécies*Pastagens	0,4938
Espécies*Períodos	0,6033
Pastagens*Períodos	0,7364
Espécies*Pastagens*Períodos	0,5092

Lentisphaerae

FV	p-valor
Espécies	0,6865
Pastagens	0,9976
Períodos	0,6567
Espécies*Pastagens	0,8209
Espécies*Períodos	0,2319
Pastagens*Períodos	0,7209
Espécies*Pastagens*Períodos	0,9468

Tenericutes

FV	p-valor
Espécies	0,0943
Pastagens	0,1237
Períodos	6e-04*
Espécies*Pastagens	0,4025
Espécies*Períodos	0,6095
Pastagens*Períodos	0,204
Espécies*Pastagens*Períodos	0,8217

Chloroflexi

FV	p-valor
Espécies	0,0196*
Pastagens	0,2245
Períodos	0,1801
Espécies*Pastagens	0,715
Espécies*Períodos	0,4176
Pastagens*Períodos	0,5692
Espécies*Pastagens*Períodos	0,4141

Fusobacteria

FV	p-valor
Espécies	0,6933
Pastagens	0,5481
Períodos	0,7594
Espécies*Pastagens	0,5076
Espécies*Períodos	0,2272
Pastagens*Períodos	0,5481
Espécies*Pastagens*Períodos	0,1792

Elusimicrobia

FV	p-valor
Espécies	0,439
Pastagens	0,0585
Períodos	0,5987
Espécies*Pastagens	0,7912
Espécies*Períodos	0,6279
Pastagens*Períodos	0,3282
Espécies*Pastagens*Períodos	0,9288

Chlamydiae

FV	p-valor
Espécies	0,0024*
Pastagens	0,3145
Períodos	0,5118
Espécies*Pastagens	0,3145
Espécies*Períodos	0,5118
Pastagens*Períodos	0,1739
Espécies*Pastagens*Períodos	0,1739

H – Análises de variância da abundância relativa das famílias

Normalidade - Teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)

Tratamentos	p-valor
Lachnospiraceae	0,1836172*
Ruminococcaceae	0,3391697*
Planococcaceae ¹	0,5951334*
Spirochaetaceae	0,6000481*
Prevotellaceae	0,5365053*
Lactobacillaceae	7,639492e-05
Akkermansiaceae ¹	0,9496404*
Clostridiales Incertae Sedis XIII	0,3234419*
Erysipelotrichaceae ¹	0,3425103*
Eggerthellaceae ¹	0,1731155*
Acidaminococcaceae	0,46665*
Fibrobacteraceae ¹	0,1768158*
Bacteroidaceae	0,08253865*

¹Dados transformados para base logarítmica

ANOVA - Teste F ($p < 0,05$)

Lachnospiraceae

FV	p-valor
Espécies	0,6009
Pastagens	0,0024*
Períodos	0,6970
Espécies*Pastagens	0,0213*
Espécies*Períodos	0,2434
Pastagens*Períodos	0,0636
Espécies*Pastagens*Períodos	0,2788

Ruminococcaceae

FV	p-valor
Espécies	0,0524
Pastagens	0,1683
Períodos	0,1761
Espécies*Pastagens	0,0677
Espécies*Períodos	0,3855
Pastagens*Períodos	0,5557
Espécies*Pastagens*Períodos	0,6610

Planococcaceae

FV	p-valor
Espécies	0,2964
Pastagens	0,3665
Períodos	0,6464
Espécies*Pastagens	0,6935
Espécies*Períodos	0,0554
Pastagens*Períodos	0,4267
Espécies*Pastagens*Períodos	0,8853

Spirochaetaceae

FV	p-valor
Espécies	2e-04*
Pastagens	0,9915
Períodos	0,1944
Espécies*Pastagens	0,0046*
Espécies*Períodos	0,6776
Pastagens*Períodos	0,7809
Espécies*Pastagens*Períodos	0,4025

Prevotellaceae

FV	p-valor
Espécies	3e-04*
Pastagens	0,0014*
Períodos	0,4168
Espécies*Pastagens	0,0044*
Espécies*Períodos	0,9905
Pastagens*Períodos	0,6145
Espécies*Pastagens*Períodos	0,5701

Akkermansiaceae

FV	p-valor
Espécies	0,5375
Pastagens	0,1175
Períodos	0,6038
Espécies*Pastagens	0,0125*
Espécies*Períodos	0,4706
Pastagens*Períodos	0,9315
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7207

Erysipelotrichaceae

FV	p-valor
Espécies	0,0637
Pastagens	0,4188
Períodos	0,0948
Espécies*Pastagens	0,0172*
Espécies*Períodos	0,9572
Pastagens*Períodos	0,7272
Espécies*Pastagens*Períodos	0,8828

Acidaminococcaceae

FV	p-valor
Espécies	9e-04*
Pastagens	0,5516
Períodos	0,8403
Espécies*Pastagens	0,0092*
Espécies*Períodos	0,2952
Pastagens*Períodos	0,7317
Espécies*Pastagens*Períodos	0,8053

Bacteroidaceae

FV	p-valor
Espécies	0,0919
Pastagens	0,2085
Períodos	0,4488
Espécies*Pastagens	0,7376
Espécies*Períodos	0,4397
Pastagens*Períodos	0,2121
Espécies*Pastagens*Períodos	0,5981

Lactobacillaceae

FV	p-valor
Espécies	0,0141*
Pastagens	0,7829
Períodos	0,0441*
Espécies*Pastagens	0,1924
Espécies*Períodos	0,3503
Pastagens*Períodos	0,7344
Espécies*Pastagens*Períodos	0,079

Clostridiales Incertae Sedis XIII

FV	p-valor
Espécies	0,0151*
Pastagens	0,4539
Períodos	0,2726
Espécies*Pastagens	0,1024
Espécies*Períodos	0,6045
Pastagens*Períodos	0,6301
Espécies*Pastagens*Períodos	0,3441

Eggerthellaceae

FV	p-valor
Espécies	0,1095
Pastagens	0,3715
Períodos	0,3177
Espécies*Pastagens	0,0409*
Espécies*Períodos	0,7841
Pastagens*Períodos	0,9354
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7221

Fibrobacteraceae

FV	p-valor
Espécies	0,0223*
Pastagens	0,0631
Períodos	0,0732
Espécies*Pastagens	0,1747
Espécies*Períodos	0,5255
Pastagens*Períodos	0,8340
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7519

I – Análises de variância da abundância relativa dos gêneros

Normalidade - Teste Shapiro-Wilk ($p > 0,05$)

Tratamentos	p-valor
Treponema	0,1836172*
Akkermansia ¹	0,9496404*
Solibacillus ¹	0,02348105
Lysinibacillus	6,335441e-06
Ligilactobacillus	0,03924019
Ruminococcus	0,3679614*
Limosilactobacillus ¹	0,7749708*
Phascolarctobacterium ¹	0,6336246*
Fibrobacter ¹	0,1768158*
Agathobacter	0,04828742

¹Dados transformados para base logarítmica

ANOVA - Teste F ($p < 0,05$)

Treponema

FV	p-valor
Espécies	5e-04*
Pastagens	0,9485
Períodos	0,1692
Espécies*Pastagens	0,0041*
Espécies*Períodos	0,6030
Pastagens*Períodos	0,8130
Espécies*Pastagens*Períodos	0,3495

Akkermansia

FV	p-valor
Espécies	0,5375
Pastagens	0,1175
Períodos	0,6038
Espécies*Pastagens	0,0125 *
Espécies*Períodos	0,4706
Pastagens*Períodos	0,9315
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7207

Solibacillus

FV	p-valor
Espécies	0,3714
Pastagens	0,7153
Períodos	0,0567
Espécies*Pastagens	0,4252
Espécies*Períodos	0,1589
Pastagens*Períodos	0,346
Espécies*Pastagens*Períodos	0,6356

Lysinibacillus

FV	p-valor
Espécies	0,1666
Pastagens	0,8976
Períodos	0,0455 *
Espécies*Pastagens	0,9697
Espécies*Períodos	0,1782
Pastagens*Períodos	0,7556
Espécies*Pastagens*Períodos	0,9777

Ligilactobacillus

FV	p-valor
Espécies	0,9429
Pastagens	0,7002
Períodos	0,5595
Espécies*Pastagens	0,6934
Espécies*Períodos	0,6678
Pastagens*Períodos	0,8565
Espécies*Pastagens*Períodos	0,9217

Ruminococcus

FV	p-valor
Espécies	0,1207
Pastagens	0,8028
Períodos	0,5640
Espécies*Pastagens	0,0171 *
Espécies*Períodos	0,5430
Pastagens*Períodos	0,0995
Espécies*Pastagens*Períodos	0,6191

Limosilactobacillus

FV	p-valor
Espécies	0,1085
Pastagens	0,1108
Períodos	0,5724
Espécies*Pastagens	0,8263
Espécies*Períodos	0,128
Pastagens*Períodos	0,4403
Espécies*Pastagens*Períodos	0,2204

Fibrobacter

FV	p-valor
Espécies	0,0223*
Pastagens	0,0631
Períodos	0,0732
Espécies*Pastagens	0,1747
Espécies*Períodos	0,5255
Pastagens*Períodos	0,834
Espécies*Pastagens*Períodos	0,7519

Phascolarctobacterium

FV	p-valor
Espécies	0,0017*
Pastagens	0,8096
Períodos	0,9447
Espécies*Pastagens	0,0048*
Espécies*Períodos	0,5942
Pastagens*Períodos	0,9441
Espécies*Pastagens*Períodos	0,8949

Agathobacter

FV	p-valor
Espécies	0,0015*
Pastagens	0,0124*
Períodos	0,0876
Espécies*Pastagens	0,0644
Espécies*Períodos	0,31
Pastagens*Períodos	0,6387
Espécies*Pastagens*Períodos	0,5908

J – Análises de variância da multivariada da distribuição das OTUs

Permanova Two-Way (p<0,05)

Espécies e Pastagens

FV	p-valor
Espécies	0,0001*
Pastagens	0,0023*
Espécies*Pastagens	0,0079*

Espécies e Períodos

FV	p-valor
Espécies	0,0082*
Períodos	0,0249*
Espécies*Períodos	0,8405

Pastagens e Períodos

FV	p-valor
Pastagens	0,0082*
Períodos	0,0317*
Pastagens*Períodos	0,4483