

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL EM BOVINOS
DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS
DE OLEAGINOSAS**

Hilda Silva Araujo de Melo

CAMPO GRANDE, MS 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL EM BOVINOS
DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS
DE OLEAGINOSAS**

Rumen bacterial diversity in beef cattle feeding different oilseeds

Hilda Silva Araujo de Melo

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Vinhas Ítavo

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2018

Certificado de aprovação

HILDA SILVA ARAUJO DE MELO

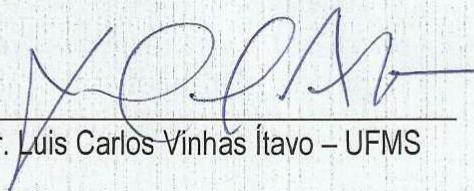
Diversidade bacteriana ruminal em bovinos de corte alimentados
com diferentes grãos de oleaginosas

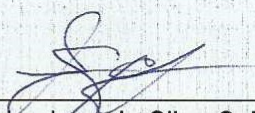
Rumen bacterial diversity in beef cattle feeding different oilseeds

Tese apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de doutora em Ciência Animal

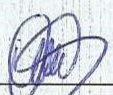
Aprovado(a) em: 27-11-2018


BANCA EXAMINADORA:


Dr. Luis Carlos Vinhas Ítavo – UFMS


Dr. Luciano da Silva Cabral – UFMT


Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes – UFGD


Dra. Aline Gomes da Silva – UFMS


Dr. Gelson dos Santos Difante - UFMS

Dedico e ofereço:

***A Deus,**
por fazer parte da minha vida, guiar os meus passos e me dar persistência, sabedoria e fé.*

***Aos meus pais, Maria Lúcia e Francisco,**
pelo apoio, incentivo, compreensão e confiança incondicionais.*

***Ao meu irmão, Diego,**
pela cumplicidade e parceria em todos os momentos.*

***Ao meu esposo, Jeferson,**
pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos.*

Meus sinceros agradecimentos e minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder o dom da vida e me abençoar em todos os momentos, não me desamparando nos momentos de dificuldade.

Aos **meus pais**, pelo amor incondicional, mas principalmente pela compreensão da minha ausência em alguns momentos. Amo vocês!

A toda a **minha família**, em especial ao meu esposo **Jeferson Sarate de Melo**, ao meu irmão **Diego Silva Araujo**, ao meu sobrinho **Victor Rocha Araujo**, as minhas irmãs do coração **Cleita Natielly Rocha** e **Larissa Sarate de Melo**, ao meu tio **Joaquim Edvaldo Rocha** “*in memoriam*”, pelo incentivo, companhia, conselhos, desabafos e parceria em todos os momentos, mas principalmente por ser o meu alicerce. Amo vocês!

A **todos os amigos** que a vida me concedeu a bênção de conhecer, por todos os momentos vivenciados, cumplicidade, amizade, desabafos, alegrias e tristezas. Não citarei nomes, mas sintam-se incluídos todos os que fizeram parte desses momentos.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Aos **professores** da Pós-Graduação em Ciência Animal, que contribuíram para o meu aprendizado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (**Fundect**) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao **Professor Dr. Luis Carlos Vinhas Ítavo**, pela orientação, pelo suporte, pela confiança concedida, pelo incentivo, pela disponibilidade, pela paciência, pelos ensinamentos dispendidos ao longo do curso, pelo exemplo de profissionalismo, pelo amor à profissão e por não medir esforços para a conclusão do meu curso de doutorado. Muito obrigada!

À **Professora Dra. Alinne Pereira de Castro**, pela coorientação, pelo suporte, pela confiança concedida, pelo incentivo, pela disponibilidade, pela paciência, pelo exemplo de

profissionalismo e pela colaboração despendida para o desenvolvimento desta tese. Muito obrigada!

À **Professora Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo**, pela disponibilidade em auxiliar sempre que necessário, principalmente na realização do projeto, obrigada!

Aos membros da banca de qualificação **Professora Dra. Cássia Rejane Brito Leal e Professor Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos**, pelo tempo disponibilizado e conhecimento compartilhado para a construção e correção deste trabalho. Muito obrigada!

Aos membros da banca de defesa **Professor Dr. Luciano da Silva Cabral, Professor Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Góes, Professora Dra. Aline Gomes da Silva e Professor Dr. Gelson dos Santos Difante**, pelo tempo disponibilizado e conhecimento compartilhado para a construção e correção deste trabalho. Muito obrigada!

Aos **colegas** do grupo de pesquisa “*Nutrição e Produção de Ruminantes em Pastagens e em Confinamento*”, pela ajuda na condução do experimento e auxílio nas análises. Muito obrigada!

Aos **colaboradores** da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que sempre fizeram o possível para auxiliar em todos os momentos, em especial, **Franciela Pezarico**, pelo auxílio nas análises do laboratório de patologia, e **Ricardo de Oliveira dos Santos**, por estar sempre disponível em ajudar quando necessário. Muito obrigada!

À **Universidade Católica Dom Bosco**, pela oportunidade de realização do experimento e análises laboratoriais. Muito obrigada!

Ao **Professor Dr. Rodrigo Gonçalves Mateus**, pela oportunidade de realização do experimento, análises laboratoriais e disponibilidade. Muito obrigada!

À equipe do **projeto de pesquisa**, Prof. Dr. Luis Carlos Vinhas Ítavo, Profa. Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo, Prof. Dr. Alexandre Menezes Dias, Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, Dra. Helène Veronique Petit e Dr. Erikliis Nogueira, pela oportunidade, confiança, incentivo e ensinamentos. Muito obrigada!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.

Muito obrigada!

“A mente que se abre para uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Oliver Wendell Holmes

Resumo

MELO, H.S.A. **Diversidade bacteriana ruminal em bovinos de corte alimentados com diferentes grãos de oleaginosas.** 2018. 81 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Resumo: Foi considerado como hipótese que o fornecimento de grãos de oleaginosas (ricos em ácidos graxos poli-insaturados, ômega 3 e ômega 6) reduz a população das bactérias metanogênicas ruminais. O presente trabalho teve como objetivo realizar a abordagem metagenômica para avaliar a diversidade bacteriana na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada 16S rDNA, em resposta a dietas experimentais com diferentes grãos de oleaginosas (canola, caroço de algodão, girassol, soja) fontes de ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3 e ômega-6). Foram utilizados seis novilhos cruzados, machos castrados, fistulados no rúmen, com peso médio de $416,33 \pm 93,30$ kg distribuídos em quadrado latino 6x6 (seis dietas e seis períodos), com períodos de 14 dias, sendo 13 dias de adaptação e 1 dia de coleta de amostra, totalizando 84 dias de ensaio, além do período pré-experimental de 30 dias em pastagem. Foram realizadas 2.536.247 sequências de DNA combinadas obtidas para o domínio Bacteria, a flora foi considerada bastante rica e diversa. Os resultados demonstraram que a diversidade bacteriana foi composta por 24 filos bacterianos, sendo os mais abundantes Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria. Outros filos com menor diversidade também foram identificados incluindo Eurychaeta, Tenericutes, SR1 Absconditibacteria, Synergistetes, Actinobacteria, Saccharibacteria, Elusimicrobia, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Lentisphaerae. Foi identificada similaridade de 50% na comunidade bacteriana no conteúdo ruminal das diferentes dietas fornecidas. A alimentação com grãos de oleaginosas apresentou similaridade nas bactérias das dietas, indicando que a flora se altera em 47,51% com a mudança de alimentação. Na dieta soja foram identificadas poucas *archaeas* metanogênicas, diferindo das demais oleaginosas, dessa forma, torna-se uma alternativa para a alimentação de bovinos em função de seu baixo potencial de perdas energéticas com a produção de metano. Na dieta pastagem foram identificadas poucas *archaeas* metanogênicas confirmando que em áreas de pastagem onde o manejo é realizado de acordo com a recomendação forrageira, o potencial poluente é reduzido.

Palavras-chave: canola, caroço de algodão, comunidade bacteriana ruminal, girassol, oleaginosas, soja grão

Abstract

MELO, H.S.A. **Rumen bacterial diversity in beef cattle feeding different oilseeds.** 2018. 81 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2018.

Abstract: It was hypothesized that the supply of oilseed grains (rich in polyunsaturated fatty acids, omega 3 and omega 6) reduces the population of methanogenic ruminal bacteria. The objective of the present study was to perform the metagenomic approach to evaluate the bacterial diversity in the solid fraction of the ruminal content, through the gene sequences of the conserved 16S rDNA region, in response to experimental diets feed to fistulated beef cattle receiving diets with different oilseed grains (canola, cottonseed, sunflower, soybean) sources of polyunsaturated fatty acids (omega-3 and omega-6). Six crossbred steers, castrated male, rumen fistulated, with an average weight of 416.33 ± 93.30 kg were distributed in a 6x6 latin square (six diets and six periods), the periods were of 14 days, thirteen of which were for adaptation and one day of sample collection, totaling 84 days of experiment, in addition to the pre-experimental period 30 days in pasture. A total of 2,536,247 DNA sequences were obtained for the Bacteria domain, the flora was considered quite rich and diverse. The results showed that bacterial diversity was composed of 24 bacterial phyla, with the most abundant being Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria. Other phyla with less diversity have also been identified including Eurychaeta, Tenericutes, SR1 Absconditibacteria, Synergistetes, Actinobacteria, Saccharibacteria, Elusimicrobia, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Lentisphaerae. It was identified a 50% similarity in the bacterial community among the ruminal content of the different diets provided. Feeding with oilseeds showed similarity in the bacteria of the diets, indicating that the flora changes in 47.51% with the diet change. In the soybean diet, few methanogenic *archaeas* were identified, differing from the other oleaginous, it becomes an alternative for the feeding of cattle due to its low potential of energy losses with the production of methane. In the pasture diet, few methanogenic *archaeas* have been identified confirming that in pasture areas where management is carried out according to the forage recommendation, the pollutant potential is reduced.

Keywords: canola, cottonseed, rumen bacterial community, sunflower, oilseeds, soybean grain

Lista de ilustrações

Artigo I

- Figura 1. Curva de rarefação, estimado pela descrição de OTU observadas. 32
Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA). 33
Figura 3. Dendograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de bactérias..... 34

Artigo II

- Figura 1. Diagrama de Venn representando o número de OTU de bactérias..... 53
Figura 2. Diagrama de Venn representando o número de OTU de bactérias..... 55

Artigo III

- Figura 1. Espécie de *archaea* metanogênica identificada nas dietas..... 76

Lista de tabelas

Artigo I

Tabela 1. Composição bromatológica da <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu syn. <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu.....	20
Tabela 2. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais	21
Tabela 3. Quantificação média de DNA total extraído no conteúdo ruminal	25
Tabela 4. Análise de abundância relativa de filos bacterianos	25
Tabela 5. Análise de abundância relativa de classes bacterianas	28
Tabela 6. Análise de abundância relativa de ordens bacterianas.....	29
Tabela 7. Análise de abundância relativa de famílias bacterianas	30

Artigo II

Tabela 1. Composição bromatológica da <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu syn. <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu.....	48
Tabela 2. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais	49
Tabela 3. Espécies bacterianas identificadas pelo sequenciamento	57

Artigo III

Tabela 1. Composição bromatológica da <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu syn. <i>Urochloa brizantha</i> cv. Marandu.....	70
Tabela 2. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais	71
Tabela 3. <i>Archaeas</i> metanogênicas identificadas pelo sequenciamento	74

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
ATP	Adenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etéreo
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
G	Gramma
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
Kg	Quilograma
LA	Ácido linoleico
LNA	Ácido linolênico
m ²	Metro quadrado
ml	Mililitro
MM	Matéria mineral
Mm	Milímetro
MO	Matéria orgânica
Mol	Massa molecular
MS	Matéria seca
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
OTU	Unidade taxonômica operacional
PB	Proteína bruta
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RCF	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
TBE	Tampão tris ácido bórico e EDTA
TE	Tampão tris HCl
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Sumário

INTRODUÇÃO.....	1
Hipótese.....	2
Objetivo Geral.....	2
Objetivos específicos.....	2
Revisão de Literatura.....	3
1.1. Rúmen.....	3
1.1.1. Fermentação microbiana.....	3
1.1.2. Proteína microbiana.....	4
1.1.3. Metano.....	5
1.2. Micro-organismos.....	6
1.2.1. Bactérias.....	6
1.2.2. Archaea.....	7
1.3. Grãos de oleaginosas.....	8
1.4. Abordagem metagenômica.....	9
Referências.....	10
ARTIGO I: DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL DE NOVILHOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS DE OLEAGINOSAS.....	15
Resumo.....	15
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	18
Resultados.....	24
Discussão.....	34
Conclusão.....	38
Referências.....	39
ARTIGO II: ESPÉCIES BACTERIANAS RUMINAIS DE NOVILHOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS DE OLEAGINOSAS.....	43
Resumo.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	47
Resultados.....	52
Discussão.....	59
Conclusão.....	61
Referências.....	62
ARTIGO III: ARCHAEAS METANOGÊNICAS DE NOVILHOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS DE OLEAGINOSAS.....	65

Resumo	65
Introdução	67
Material e Métodos	68
Resultados	74
Discussão	76
Conclusão	78
Referências	78

INTRODUÇÃO

Durante a fermentação anaeróbica dos carboidratos no rúmen, há formação de ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, principalmente), amônia, dióxido de carbono e metano. Os ácidos graxos de cadeia curta compõem a fonte principal de energia para os ruminantes, suprindo 60 a 80% da exigência energética (BERGMAN, 1990).

O metano representa perda de energia consumida, que varia de 2 a 15% (JOHNSON & WARD, 1996; ULYATT et al., 2005). O metano é produzido pelos micro-organismos metanogênicos presentes no rúmen, os quais utilizam o dióxido de carbono e o hidrogênio livres nesse ambiente. Para que ocorra uma digestão normal, a pressão de hidrogênio no rúmen deve ser baixa, sendo que isso só acontece quando os micro-organismos metanogênicos utilizam esse hidrogênio para formar metano. A maior parte do metano é eliminado via eructação.

As emissões médias de metano (kg ano^{-1}) para diferentes espécies segundo o Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC, 2007) são da ordem de: 49 a 64 $\text{kg animal}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para bovinos, 5 $\text{kg animal}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para ovinos, 5 $\text{kg animal}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para cabras, 55 $\text{kg animal}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para búfalos, 20 $\text{kg animal}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para veados e 8 $\text{kg animal}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para alpacas.

Os principais gases de efeito estufa são: dióxido de carbono, óxido nitroso, com potencial de aquecimento global 298 vezes maior que o dióxido de carbono e o metano, com potencial de aquecimento 25 vezes mais que o dióxido de carbono (IPCC, 2007). Durante as últimas décadas as concentrações atmosféricas de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso aumentaram 0,8; 0,5 e 0,3% por ano (WANG et al., 2013).

São veiculadas informações que alegam que a produção de metano entérico pelos ruminantes é responsável na emissão dos gases de efeito estufa, influenciando no aquecimento global, todavia é conhecido por todos que a queima de combustíveis fósseis é a grande vilã, apesar disso muitos estudos têm sido realizados para melhorar a eficiência alimentar e a produtividade, com o intuito de mitigar esse potencial poluente.

Nos últimos anos tem aumentando a preocupação das autoridades acerca dos impactos do aquecimento global causado principalmente pelos gases do efeito estufa e em função disso, tem gerado ações com o intuito de mitigar ou minimizar os impactos negativos. O setor agropecuário está nos holofotes e tem sido destacado como principal responsável pela emissão desses gases, sendo imprescindível que ocorra um avanço na mitigação e adaptação do sistema produtivo de forma global.

Acredita-se que a melhor estratégia para mitigar a emissão de metano pelos ruminantes seja através do uso correto das áreas de pastagem, através da recuperação das áreas de pastagem

degradada, uso de pressão de pastejo recomendado por cada cultivar, proporcionando maior fixação de carbono no solo e maior produção animal por área, reduzindo assim a emissão de metano por kg de carcaça produzida (COTTLE et al., 2011).

O efeito estufa natural ocorre devido às concentrações de gases na atmosfera antes do aparecimento do homem, sendo esse essencial para a existência da vida no planeta. Caso não houvesse esses gases na atmosfera, a temperatura média da Terra seria -18°C , o que inviabilizaria a vida atualmente existente (CARVALHO et al., 2010).

Quando ocorre uma elevada produção de hidrogênio no rúmen, as metanogênicas, principalmente o gênero *Methanobacterium* o utilizam como fonte de energia, o dióxido de carbono é reduzido, contribuindo desta forma para a reciclagem do NAD oxidado e auxiliam na continuidade dos processos fermentativos (KOZLOSKI, 2011).

O uso de fontes de óleo e grãos de oleaginosas na nutrição animal são uma alternativa para melhorar a eficiência alimentar, reduzindo perdas energéticas com a produção de metano, uma vez que o hidrogênio será utilizado no processo de biohidrogenação. Além disso, o uso de grãos nos sistemas de produção animal permite que os animais atinjam a idade de abate precocemente, através da maior disponibilidade de energia na dieta, permitindo assim maiores ganhos diários e melhorias da conversão alimentar (BEIRANVAND et al., 2014).

Hipótese

O fornecimento de grãos de oleaginosas (ricos em ácidos graxos poli-insaturados, ômega 3 e ômega 6) reduz a população da comunidade das bactérias metanogênicas ruminais.

Objetivo Geral

Desenvolver conhecimentos científicos e tecnológicos que permitam a utilização de diferentes fontes de ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3 e ômega 6) provenientes de grãos de oleaginosas (caroço de algodão, canola, girassol e soja) na nutrição de bovinos de corte, analisando sob forma interdisciplinar o potencial de uso na dieta de animais.

Objetivos específicos

Utilizar a abordagem metagenômica para avaliar a diversidade bacteriana na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada 16S rDNA em bovinos recebendo dietas com diferentes fontes de grãos de oleaginosas (caroço de algodão, canola, girassol e soja) fontes de ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3 e ômega 6).

Revisão de Literatura

1.1.Rúmen

Os ruminantes possuem a capacidade para converter alimentos de baixa qualidade em proteína de alta qualidade (VARGA & KOLVER, 1997). O rúmen é considerado um ecossistema microbiano diverso e único, com três tipos de micro-organismos ativos no seu interior: bactérias, protozoários e fungos, sendo as bactérias constituintes de 60 a 90% da biomassa microbiana (KOZLOSKI, 2002).

O rúmen-retículo é o principal local de digestão dos componentes dietéticos nos ruminantes, ação exercida pela numerosa e diversa população microbiana deste compartimento (VAN SOEST, 1994). O crescimento microbiano no rúmen está associado à capacidade digestiva do animal e influencia a produção de ácidos graxos de cadeia curta e o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado (NOCEK & RUSSELL, 1988; HOOVER & STOKES, 1991).

O ambiente ruminal não pode ser definido em termos de energia metabolizável ou energia bruta, pois pode somente ser descrito pela quantidade de bactérias e pelos produtos finais da digestão (PRESTON, 1986); dessa forma, a taxa de degradação da proteína degradada no rúmen é influenciada pela ação proteolítica dos micro-organismos ruminais e pelo fluxo do conteúdo ruminal (BOENKER, 1987).

1.1.1. Fermentação microbiana

A fermentação anaeróbia do alimento ocorre devido ao sinergismo existente entre a população microbiana, permitindo a degradação pela ação de complexos de enzimas, agindo sobre a parede celular das plantas (VARGA & KOLVER, 1997).

A maior parte dos nutrientes do alimento, principalmente as fontes energéticas e proteicas, são transformados em ácidos graxos de cadeia curta, em massa microbiana e em gases como metano, dióxido de carbono e hidrogênio.

Os ácidos graxos de cadeia curta representam a principal fonte de energia, em torno de 75 a 80% da energia originalmente presente nos carboidratos fermentados e, contribuem em 50 a 70% da energia digestível do alimento (KOZLOSKI, 2002).

A manipulação da fermentação ruminal tem sido empregada para aumentar a produtividade animal e reduzir as perdas por fermentações indesejáveis. No caso do metabolismo das proteínas, isto pode ser feito com uso de fontes de proteína com menor degradabilidade ruminal, mas de boa qualidade; uso de maior quantidade de proteína degradada em rações quando há maior disponibilidade de carboidratos mais facilmente degradáveis

(SNIFFEN et al., 1992); uso de ionóforos como a monensina e outros moduladores de fermentação ruminal (LANA & RUSSELL, 1997); uso de aminoácidos protegidos, dentre outros.

Os parâmetros fermentativos do rúmen podem ser modificados pela adição de fontes de lipídio à dieta, porém a extensão dessa interferência depende tanto da fonte como da porcentagem de adição à ração. A maioria dos trabalhos confirma que o uso de lipídios exerce pouco ou nenhum efeito sobre as atividades microbianas e as demais características do ambiente ruminal, desde que não ultrapasse o valor de 7% da matéria seca total da dieta. A presença de lipídios insaturados em rações pode estimular as bactérias ruminais produtoras de propionato e, concomitantemente, reduzir a produção de acetato e butirato (VAN NEVEL & DEMEYER, 1988).

O máximo de atividade fermentativa ruminal é obtido quando a amônia ruminal alcança valores entre 19 e 23 mg/dl (MEHREZ et al., 1977), sendo 10 mg/dl nível ótimo (VAN SOEST, 1994). Todavia, este valor não deve ser considerado como um número fixo, devido ao fato de a capacidade de síntese de proteína e captação de amônia pelas bactérias depender da taxa de fermentação dos carboidratos.

1.1.2. Proteína microbiana

A proteína microbiana pode suprir de 50 a 100% da proteína metabolizável requerida para bovinos de corte, dependendo do conteúdo de proteína não-degradável na dieta (NRC, 1996). A dieta é fundamental para otimizar a produção microbiana e sua eficiência fermentativa no ambiente ruminal.

A composição de aminoácidos da proteína microbiana é similar à da proteína dos tecidos do próprio animal, bem como da proteína encontrada no leite. Em comparação à composição da proteína de concentrados proteicos de origem vegetal, a proteína microbiana contém maior proporção de metionina e lisina e, não existem fontes que atendam melhor aos requerimentos aminoácidos do animal que a proteína microbiana (VERBIC, 2002).

A proteína microbiana é fonte de alta qualidade de aminoácidos disponíveis para a absorção, possui digestibilidade aparente intestinal de aproximadamente 85% e um perfil de aminoácidos essenciais semelhantes àqueles do leite e dos tecidos (NRC, 2000; NRC, 2001), fornece a maior parte de proteína requerida pelo animal, sendo que sua quantidade depende da disponibilidade de nutrientes e da eficiência de utilização destes nutrientes pelas bactérias ruminais (RUSSELL et al., 2009).

Dessa forma, a proteína metabolizável no intestino de ruminantes é representada pelo total de aminoácidos provenientes da digestão intestinal da proteína microbiana produzida no rúmen, da proteína não degradável no rúmen de origem alimentar e da proteína endógena.

As bactérias ruminais utilizam dois mecanismos distintos para fixar amônia nos esqueletos carbônicos durante a síntese de aminoácidos: através da enzima glutamina sintetase e através da enzima glutamato desidrogenase (SANTOS, 2006). Quando a concentração de amônia ruminal é alta, predomina a ação da desidrogenase. Essa enzima não requer ATP para a fixação de amônia. Por outro lado, quando há concentração baixa de amônia no rúmen, a enzima que predomina é a glutamina sintetase. Com a enzima glutamina sintetase para cada mol de amônia fixada há utilização de 1 mol de ATP. Quando a concentração de amônia ruminal é baixa, a eficiência de síntese microbiana é reduzida, pois parte da energia que seria destinada para crescimento é utilizada no processo de fixação de amônia (TEIXEIRA, 1992; SANTOS, 2006).

O objetivo da nutrição de ruminantes é maximizar o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, aumentando assim a eficiência produtiva, todavia é necessário quantificar a contribuição da síntese ruminal de proteína microbiana para um melhor entendimento do processo de conversão dos componentes dietéticos em proteína microbiana e dos fatores que a afetam.

A sincronização da liberação de energia e nitrogênio dos alimentos pela degradação ruminal é necessária para potencializar a fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal (CLARK et al., 1992). A composição dos micro-organismos do rúmen varia conforme a fase do crescimento microbiano, a disponibilidade de nutrientes e o tipo de micro-organismo (OWENS & GOETSCH, 1988).

Os substratos que mais limitam a síntese de proteína microbiana no rúmen são carboidratos e proteína. Devido ao fato de a eficiência microbiana ser limitada pelo aporte energético da dieta, as formas de expressá-la normalmente estão relacionadas à quantidade de carboidratos e/ou matéria orgânica degradada no rúmen (NOCEK & RUSSEL, 1988), ou em relação ao consumo de nutrientes digestíveis totais (NRC, 1996).

1.1.3. Metano

O metano é um dos gases de efeito estufa mais abundantes na atmosfera, com um impacto significativo sobre o aquecimento global 28 vezes maior do que o dióxido de carbono (IPCC, 2014). A produção de metano pelos bovinos é influenciada por inúmeros fatores, incluindo dieta, raça, genética e distribuição geográfica (BASARAB et al., 2013; CARBERRY

et al., 2014; HENDERSON et al., 2015; ZHAO et al., 2015; ROEHE et al., 2016). As estimativas da produção de metano entérico e a eficiência alimentar em vacas e novilhas em lactação demonstraram diferença na produção de metano entre as categorias (GRANDL et al., 2016). Utilizando a técnica do traçador de hexafluoreto de enxofre, a produção de metano entérico em novilhas e vacas adultas foi medida, com média de $35,1 \pm 2,8$ g/kg de matéria seca ingerida para novilhas (10 meses) e, $27,2 \pm 0,9$ g/kg de matéria seca ingerida para vacas (3 a 4 anos; $p < 0,05$) (LIU et al., 2016).

O metano é produzido em condições anaeróbias por micro-organismos metanogênicos presentes no ambiente ruminal, sendo influenciado pela idade e nível produtivo do animal. A produção de metano é modulada pela presença de dióxido de carbono e de hidrogênio livres no ambiente ruminal, assim, a partir do hidrogênio livre, ocorre a redução do dióxido de carbono por micro-organismos metanogênicos, com conseqüente formação de metano.

A metanogênese é uma reação que proporciona um fluxo de prótons nas células e pode suportar um mecanismo quimiosmótico de produção de energia e ATP. A produção de metano pode ser encarada como um marcador taxonômico para a identificação de *Archaea* (OREMLAND, 1988; VAZOLLER, 1995).

O metano produzido não utilizado pelo animal representa uma perda de energia (2-15% da energia dietética) para a atmosfera, além de representar um impacto negativo ao meio ambiente (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

Devido a essa perda energética, várias estratégias de mitigação foram cientificamente avaliadas com o objetivo de reduzir as emissões de metano incluindo, por exemplo, o uso de diferentes rações e alimentos ricos em lipídios, ionóforos, compostos vegetais como taninos e enzimas (BEAUCHEMIN et al., 2009; HOOK et al., 2010; CIESLAK et al., 2013).

1.2. Micro-organismos

As bactérias, protozoários e fungos hidrolisam o amido dietético, proteína e polissacarídeos da parede celular vegetal produzindo açúcares, ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e hidrogênio. Os açúcares e proteínas são fermentados por micro-organismos secundário para ácidos graxos de cadeia curta, amônia, hidrogênio e de dióxido de carbono (TEIXEIRA et al. 1998).

1.2.1. Bactérias

As bactérias são os micro-organismos que estão presentes em maior abundância e diversidade no rúmen, aproximadamente 95% da microbiota total (FLINT et al., 2008). A

classificação destas bactérias é feita levando em consideração o tipo de substrato utilizado e os produtos oriundos de sua fermentação, sendo classificadas em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, fermentadoras de carboidratos não estruturais, lipolíticas, proteolíticas e as lácticas (ARCURI et al., 2006). No conteúdo ruminal, o tamanho das bactérias pode variar de 1 a 5 μm , aproximadamente 10^{10} células/grama (TEIXEIRA, 2001). O ecossistema ruminal possui cerca de 200 espécies distintas de bactérias (KOZLOSKI, 2011).

Alguns trabalhos identificaram como maior prevalência no rúmen bovino os filos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes (KHAFIPOUR et al., 2009; CHEN et al., 2011; LI et al., 2013), sendo também observados outros diversos filos em menores proporções.

As bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, que se associam às fibras dos alimentos e degradam celulose e hemicelulose, são *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, estas produzem como produto da fermentação, propionato, butirato, succinato, formato, dióxido de carbono, água e, principalmente, acetato (DEHORITY, 2003).

Como as rotas metabólicas de fermentação podem ser alteradas de acordo com os substratos presentes, quando há grande disponibilidade de amido e carboidratos solúveis, as bactérias produzem acetato como produto da fermentação, porém quando a disponibilidade destes substratos decresce, o produto da fermentação muda para a produção de formato e etanol, ou acetato e propionato. Estas últimas vias metabólicas aumentam a produção de energia em um ambiente anaeróbico (RUSSEL, 1990).

As bactérias lipolíticas hidrolisam os triglicerídeos e utiliza glicerol e lactato como fonte de energia e carbono, esses substratos são fermentados a acetato, propionato e dióxido de carbono, enquanto o glicerol é fermentado a propionato e succinato, gerando em todos os substratos a produção de hidrogênio (STEWART et al., 1997).

A proteína é degradada pela maioria das espécies de bactérias presentes no rúmen. Todavia, algumas espécies que utilizam aminoácidos como substrato e tem uma atividade proteolítica bem mais intensa que as demais, como as bactérias das espécies *Clostridium* sp. As bactérias lácticas produzem o ácido láctico como substrato energético, sendo a espécie láctica predominante *Megasphaera elsdenii* (KOZLOSKI, 2011).

1.2.2. Archaea

A bioquímica da formação de metano é encontrada apenas nas *Archaea* metanogênicas. As *Archaea* metanogênicas formam um grupo de micro-organismos que possui cofatores (coenzima M, F420, F430) e lipídeos (ésteres de isopranoil glicerol) únicos (McALLISTER et al.,

1996). Possuem parede celular composta por pseudomureína, proteína, glicoproteína ou heteropolissacarídeos (ISHINO et al., 1998).

As metanogênicas removem hidrogênio e reduzem dióxido de carbono para formar metano. Com a produção de metano a concentração de hidrogênio baixa no rúmen, o que permite o crescimento de outras espécies bacterianas e a fermentação mais eficiente (TEIXEIRA et al. 1998). As metanogênicas, principalmente o gênero *Methanobacterium*, utilizam o hidrogênio para reduzir o dióxido de carbono e sintetizar o metano, contribuem desta forma, para a reciclagem do NAD oxidado e auxiliam na continuidade dos processos fermentativos (KOZLOSKI, 2011).

Em vacas, *Methanobrevibacter* parece ser o gênero predominante das *archaeas* (LEAHY et al., 2013; HENDERSON et al., 2015). Alguns gêneros de *Methanobrevibacter* foram correlacionados com indivíduos cuja produção de metano foi elevada (KING et al., 2011). *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosarcina* sp., foram encontradas em populações maiores que $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (McALLISTER et al., 1996).

As *Archaea* são encontradas associadas a protozoários ciliados e em justaposição com bactérias, não sendo essa uma localização obrigatória (FINLAY et al., 1994). Os protozoários ciliados possuem potencial de produção de hidrogênio no rúmen (USHIDA & JOUANY, 1996), a associação das metanogênicas aos protozoários indica uma relação de simbiose, ou seja, as metanogênicas utilizam o hidrogênio produzido pelos ciliados, favorecendo a manutenção do ambiente ruminal (VAN SOEST, 1994).

1.3. Grãos de oleaginosas

Os grãos de oleaginosas são as fontes mais comuns de lipídeo em dietas de ruminantes no Brasil, destacando a soja e o milho, apresentando os ácidos graxos linoleico e linolênico, com a soja tendo ainda um dos valores mais elevados de ácido linolênico (BAUMGARD et al., 2001).

A utilização de grãos de oleaginosas na alimentação animal vem sendo bastante estudada e isto se deve a alta qualidade de óleo (GUPTA & DAS, 2000), por isso, o uso desses grãos na alimentação de ruminantes se justifica, uma vez que os produtos alimentícios oriundos de animais que ingeriram os mesmos podem apresentar um diferencial nutricional em razão do aumento na concentração de ômega 6 e ácido linoleico conjugado componentes estes extremamente benéficos a saúde humana.

O ácido linolênico (18:3n-3) e linoleico (18:2n-6) são considerados ácidos graxos essenciais e precursores dos demais ácidos da família ômega 3 e ômega 6, respectivamente. O

ácido linoleico pode ser encontrado em abundância nos óleos de milho, girassol, soja, dentre outros. Enquanto, o ácido linolênico encontrado em concentrações elevadas nos grãos de linhaça, o qual apresenta 32 a 38% de óleo e teores percentuais de linolênico que variam de 44,6 a 51,5% do total dos ácidos graxos (SALLES et al., 2003).

O fornecimento de gorduras insaturadas influencia no decréscimo da produção de metano no rúmen exercendo ação deletéria sobre as metanogênicas e protozoários, além de consumir hidrogênio pelo processo de biohidrogenação (MACHMÜLLER et al., 1998; WADA et al., 2008), a intensidade com que ocorre a inibição da produção de metano é determinada pelo grau de saturação da gordura utilizada e a quantidade suplementada (FIEVEZ et al., 2003).

A produção de metano é reduzida com o incremento de gorduras e óleos na dieta, sendo considerada pelas agências internacionais como uma das estratégias nutricionais de mitigação de gases de efeito estufa mais viáveis (BODAS et al., 2012; HRISTOV et al., 2013). Todavia, o uso da fonte lipídica deve ser cauteloso uma vez que a natureza tóxica da dupla ligação aos micro-organismos ruminais pode diferir entre os ácidos graxos (HUWS et al., 2015).

1.4. Abordagem metagenômica

A metagenômica estuda o DNA total microbiano extraído diretamente do ambiente (HANDELSMAN, 2004). A tecnologia de sequenciamento de DNA reflete com precisão a estrutura do microbioma intestinal (BHATT et al., 2013), além disso, permite estudar a microbiota intestinal de diferentes espécies animais e humanos (QIN et al., 2010; ZHAO et al., 2013).

A caracterização da comunidade de micro-organismos procariotos é realizada através do sequenciamento do gene 16S rDNA, através deste é possível estimar a diversidade e classificação filogenética, a fim de identificar e quantificar organismos não cultivados (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; KANG et al., 2009).

Para determinar as relações filogenéticas é realizado o estudo das sequências do gene 16S rDNA, isso porque consegue agrupar um conjunto de características necessárias a um marcador molecular, distribuição universal, estrutura e função conservada entre os táxons, ausência de transferência lateral e tamanho grande o suficiente (aproximadamente 1.500 nucleotídeos) para estudos de filogenia (AMANN; LUDWING; SCHLEIFER, 2000). O gene 16S rDNA em bactérias é constituído por sequências conservadas intercaladas com sequências variáveis que incluem nove regiões hipervariáveis (V1-V9), sendo as regiões V3-V4 avaliadas no trabalho. O comprimento destas regiões hipervariáveis variam de cerca de 50 bases a 100 bases (PETROSINO et al., 2009).

Baseado em todas as informações expostas, foram desenvolvidos dois projetos intitulados “*Uso de ácidos graxos poli-insaturados provenientes de sementes de oleaginosas na nutrição de bovinos*” e “*Metanogênese e eficiência microbiana ruminal em bovinos de corte alimentados com diferentes fontes de ácidos-graxos poli-insaturados*”, processos 654/2015 e 633/2014, respectivamente, com oferecimento de recursos para o desenvolvimento dos projetos. Os resultados são apresentados a seguir, na forma de artigos científicos, intitulados “*Diversidade bacteriana ruminal de novilhos de corte alimentados com diferentes grãos de oleaginosas*”, “*Bactérias ruminais de novilhos de corte alimentados com diferentes grãos de oleaginosas*” e “*Archaeas metanogênicas de novilhos de corte alimentados com diferentes grãos de oleaginosas*” redigidos de acordo com as normas do periódico PloS One.

Referências

- AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiological Reviews**, v.24, p. 555-565, 2000.
- ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. 2011. **Microbiologia do rúmen**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 111-151.
- BAUMGARD, L.H.; JODI, K.S.; BAUMAN, D.E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Journal of Nutrition**, v. 131, p.1764-1769, 2001.
- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; BENCHAAAR, C.; HOLTSHAUSEN, L. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.5, p.2118-2127, 2009.
- BEIRANVAND, H.; GHORBANI, G.R.; KHORVASH, M.; NABIPOUR, A.; DEHGHAN-BANADAKY, M.H.; HOMAYOUNI, A.; KARGAR S. Interactions of alfalfa hay and sodium propionate on dairy calf performance and rumen development. **J Dairy Sci.**, v.97, n.4, p.2270-80, 2014.
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v.70, n.2, p.567-590, 1990.
- BHATT, V.D.; DANDE, S.S.; PATIL, N.V.; JOSHI, C.G. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Molecular Biology Reports**, v.40, p.3363–3371, 2013. doi: 10.1007/s11033-012-2411-4 PMID: 23277394
- BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCIA-GONZALEZ, R.; ANDRES, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.176, p.78–93, 2012. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010
- BOENKER, D. Importancia de la fermentación ruminal y su influencia sobre el comportamiento reproductivo del rumiante. **Carta Ganadera**; v.24, n.2, p.33, 1987.
- CARBERRY, C.A.; WATERS, S.M.; KENNY, D.A.; CREEVEY, C.J. Rumen methanogenic genotypes differ in abundance according to host residual feed intake phenotype and diet type. **Appl. Environ. Microb.**, v.80, p.586–594, 2014. doi: 10.1128/AEM.03131-13

- CARVALHO, P.C.F.; ANGHINONI, I.; MORAES, A.; SOUZA, E.D.; SULC, M.R.; LANG, C.R.; FLORES, J.P.C.; LOPES, M.L.T.; SILVA, J.L.S.; CONTE, O.; WESP, C.L.; LEVIEN, R.; FONTANELI, R.S.; BAYER, C. Managing grazing animals to achieve nutrient cycling and soil improvement in no-till integrated systems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.88, p.259-27, 2010.
- CHEN, Y.; PENNER, G.B.; LI, M.; OBA, M.; GUAN, L.L. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.5770-5781, 2011.
- CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, v.7, n.2, p.253-265, 2013.
- CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.E.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.8, p.2304-2323, 1992.
- COTTLE, D.J.; NOLAN, J.V.; WIEDEMANN, S.G. Ruminant enteric methane mitigation: a review. **Animal Production Science**, Melbourne, v.51, p.491-514, 2011.
- DEHORITY, B. A. Microbial interactions in the rumen. **Revista de La Facultad de Agronomía Luz**, v.15, p.69-86. 1998.
- FIEVEZ, V.; DOHME, F.; DANNEELS, M.; RAES, K.; DEMEYER, D. Fish oils as potente rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Animal Feed Science and Technology**, v.104, p.41-58, 2003.
- FINLAY, A.Y.; KHAN, G.K. Dermatology Life Quality Index (DLQI)—a simple practical measure for routine clinical use. **Clinical and experimental dermatology**, v.19, n.3, p.210-216, 1994.
- FLINT, H.J.; BAYER, E.A.; RINCON, M.T.; LAMED, R.; WHITE, B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v 6, p.121-31, 2008.
- GRANDL, F.; AMELCHANKA, S.L.; FURGER, M.; CLAUSS, M.; ZEITZ, J.O.; KREUZER, M. et al. Biological implications of longevity in dairy cows: 2. Changes in methane emissions and efficiency with age. **J. Dairy Sci.**, v.99, p.3472-3485, 2016. doi: 10.3168/jds.2015-1026
- GUPTA, R.K.; DAS, S.K. Fracture resistance of sunflower seed and kernel to compressive loading. **Journal of Food Engineering**, v.46, p.1-8, 2000.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Ver**, v.68, p.669-685, 2004.
- HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; Global Rumen Census Collaborators; JANSSEN, P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Sci. Rep.**, v.5, p.14567, 2015. doi: 10.1038/srep19175
- HOOVER, S.E.; WRIGHT, A.G.; MCBRIDE, B.W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, v.2010, 2010.
- HOOVER, W.H.; STOKES, S.R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3630-3644, 1991.
- HRISTOV, A.N.; OH, J.; LEE, C.; MEINEN, R.; MONTES, F.; OTT, T.; FIRKINS, J.; ROTZ, A.; DELL, C.; ADESOGAN, A.; YANG, W.; TRICARICO, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; DIJKSTRA, J.; OOSTING, S. 2013. **Mitigation of Greenhouse Gas Emissions in Livestock Production – A Review of Technical Options for Non-CO2 Emissions (FAO Animal Production and Health Paper No. 177)**. Rome: FAO.
- HUWS, S.A.; KIM, E.J.; CAMERON, S.J.S.; GIRDWOOD, S.E.; DAVIES, L.; TWEED, J. et al. Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented

- with flax and echium oil. **Microb. Biotechnol.**, v.8, p.331–341, 2015. doi: 10.1111/1751-7915.12164
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate change 2007**: synthesis report. Geneva, 2007. 104 p. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. **Climate change 2014**: synthesis Report. Geneva, 2014. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- ISHINO, Y.; KOMORI, K.; CANN, I.K.O.; KOGA, Y. A novel DNA polymerase family found in Archaea. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.2232-2236, 1998.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.73, p.2483-2492, 1995.
- JOHNSON, K.A.; WARD, G.M. Estimates of animal methane emissions. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v.42, p.133-141, 1996.
- KANG, S.; DENMAN, S. E.; McSWEENEY, C. S. The use of molecular tools for the study of rumen ecology. In: Simpósio internacional avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes, 2. Pirassununga. **Anais...** p.179-194, 2009.
- KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7115-7124, 2009.
- KING, E.E.; SMITH, R.P.; ST-PIERRE, B.; WRIGHT, A-D.G. Differences in the rumen methanogen populations of lactating jersey and holstein dairy cows under the same diet regimen. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.77, p.5682–5687, 2011. doi: 10.1128/AEM.05130-11
- KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 139p.
- KOZLOSKI, G.B. 2011. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011. 216 p.
- LANA, R.P., RUSSELL, J.B. 1997. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. **J. Anim. Sci.**, 75:224-229.
- LEAHY, S.C.; KELLY, W.J.; ALTERMANN, E.; RONIMUS, R.S.; YEOMAN, C.J.; PACHECO, D.M. et al. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. **PLoS ONE**, v.5, n.1, p.e8926, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0008926
- LI, Y.; MA, S.; ZHANG, X.; HUANG, S.; YANG, H.; ZHAO, F.; YI, W.; YANG, X.; XIN, S.; YI, X.; YANG, B.; TU, B.; TIAN, Y.; LU, X. Evaluation of bacterial and archaeal diversity in the rumen of Xiangxi yellow cattle (*Bos taurus*) fed *Miscanthus sinensis* or common mixed feedstuff. **Annals of Microbiology**, p. 1-10, 2013.
- LIU, C.; LI, X.H.; CHEN, Y.X.; CHENG, Z.H.; DUAN, Q.H.; MENG, Q.H. et al. Age-related response of rumen microbiota to mineral salt and effects of their interactions on enteric methane emissions in cattle. **Microb. Ecol.**, v.73, p.590–601, 2016. doi: 10.1007/s00248-016-0888-4
- MACHMÜLLER, A., OSSOWSKI, D.A., WANNER, M., KREUZER, M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.71, p.117-130, 1998.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.
- McALLISTER, A.T., OKINE, E.K., MATHISON, G.W.; CHENG, K.J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.76, p. 231-243, 1996.

- MEHREZ, A.Z.; ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. Rate of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **Br. J. Nutr.**, v.38, p.437-443, 1977.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996. 242p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**, 7th rev. edn. Natl. Acad. Press, Washington, DC, USA, 2000.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**, 7th rev. edn. Natl. Acad. Press, Washington, DC, 2001.
- NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.8, p.2070-2107, 1988.
- OREMLAND, R.S. 1988. **Biogeochemistry of methanogenic bacteria**. In: **Biology of anaerobic microorganisms**. Zehnder, A.J.B. (eds). Cap. 13. New York: John Wiley & Sons. 1988, p. 641-705.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Fermentación ruminal. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, 1988. p.159-190.
- PETROSINO, J.F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R.A.; GIBBS, R.A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v.55, p.856-866, 2009.
- PRESTON, T.R. 1986. Propuestas de metodología de producción adecuadas a países tropicales. In: Seminario Universidad Nacional de Colombia, 1, Palmira, 1986. **Resumos...** Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira: Facultad de Ciencias Agropecuarias; 56-70.
- QIN J.; LI, R.; RAES J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v.464, p.59-65, 2010. doi: 10.1038/nature08821
- ROEHE, R.; DEWHURST, R.J.; DUTHIE, C.A.; ROOKE, J.A.; MCKAIN, N.; ROSS, D.W. et al. Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. **PLoS Genet.**, v.12, n.2, p.e1005846, 2016. doi: 10.1371/journal.pgen.1005846
- RUSSEL, J. B. Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3304, 1990.
- RUSSELL, J.B.; MUCK, R.E.; WEIMER, P.J. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 67: 183-197, 2009.
- SALLES, M.S.V.; LEME, P.R.; ZANETTI, M.A.; AFERRI, G. Efeitos do caroço de caroço de algodão e dos sais de cálcio de ácidos graxos nos parâmetros ruminiais de bovinos alimentados com dietas com alto nível de concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...**Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2003] (CD ROM).
- SANTOS, F.A.P. Metabolismo de Proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Fundep, 2006. p.255-286.
- SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, J.D., VAN SOEST, P.J. et al. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **J. Anim. Sci.**, 70:3562-3577.
- STEWART, C.S.; FLINT, H.J.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C.S. (Eds.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Blackie Academic, v.2, p.10-72, 1997.
- TEIXEIRA J.C.; TEIXEIRA L.F.A.C. 1998. **Do alimento ao leite: Entendendo a função ruminal**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1998, 74p.

- TEIXEIRA, J. C. **Nutrição de ruminantes**. Lavras, MG: Edições FAEPE, 1992. 239 p.
- TEIXEIRA, J.C. 2001. **Nutrição de ruminantes**. Lavras: UFLA/ FAEPE, Curso de Pós-Graduação Lato Sensu (Especialização) à distância: Produção de Ruminantes, 2001, 182 p.
- ULLYAT, M.J.; LASSEY, K.R.; SHELTON, I.D.; WALKER, C.F. Methane emission from sheep grazing four pastures in late summer in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.48, p.385-390, 2005.
- USHIDA, K.; JOUANY, J.P. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v.23, p.129-132, 1996
- VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D.I. Manipulation of rumen fermentation. In: HOBSON, H.D. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. New York: Elsevier Science, 1988. p.387-443.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca, NY: Comstock, 1994. 476p.
- VARGA, A. G.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal Nutrition**, v.127, n.esp., p.819-823, 1997.
- VAZOLLER, R.F.; RECH, C.M.; FIGUEIREDO, M.G.; GIAJ-LEVRA, L.A. 1988. Bacterial identification of granular sludge from domestic sewage UASB-reactor. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Anaerobic Digestion, Bologna, Itália. **Proceedings...** p. 61-64.
- VERBIC, J. Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. **Viehwirtschaftliche Fachtagung**, 24 - 25. April 2002.
- WADA, F.Y.; PRADO, IN.; SILVA, R.R.; MOLETTA, J.L.; VISENTAINER, J.V; ZEOULA, L.M. Grãos de linhaça e canola sobre o desempenho, digestibilidade aparente e característica de carcaça de novilhas nelore terminada em confinamento. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.883-895, 2008.
- WANG, Y.Y.; HU, C.S.; MING, H.; ZHANG, Y.M.; LI, X.X.; DONG, W.X.; OENEMA, O. Concentration profiles of CH₄, CO₂ and N₂O in soils of a wheat–maize rotation ecosystem in North China Plain, measured weekly over a whole year. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.164, p.260-272, 2013.
- ZHAO, L.; WANG, G.; SIEGEL P.; HE, C.; WANG, H. et al. Quantitative genetic background of the host influences gut microbiomes in chickens. **Scientific Reports**, v.3, p.1163, 2013. doi: 10.1038/srep01163
- ZHAO, Y.G.; AUBRY, A.; O'CONNELL, N.E.; ANNETT, R.; YAN, T. Effects of breed, sex, and concentrate supplementation on digestibility, enteric methane emissions, and nitrogen utilization efficiency in growing lambs offered fresh grass. **J. Anim. Sci.**, v.93, p.5764–5773, 2015. doi: 10.2527/jas.2015-9515

ARTIGO I: DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL DE NOVILHOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS DE OLEAGINOSAS

Resumo

O objetivo foi avaliar a diversidade bacteriana na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada do gene 16S rDNA, em resposta a dietas contendo grãos de oleaginosas (canola, caroço de algodão, girassol, soja) fornecidas aos bovinos. Foram utilizados seis novilhos cruzados, machos castrados, fistulados no rúmen, com peso médio de $416,33 \pm 93,30$ kg distribuídos em Quadrado Latino 6x6 (seis dietas e seis períodos), com períodos de 14 dias, sendo 13 dias de adaptação e 1 dia de coleta de amostras, totalizando 84 dias de ensaio, além do período pré-experimental de 30 dias em pastagem. Foram geradas 2.536.247 sequencias de DNA combinadas obtidas para o domínio Bacteria. A flora foi considerada bastante rica e diversa. A diversidade bacteriana foi composta por 24 filos bacterianos, sendo os mais abundantes Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria. Outros filos com menor diversidade também foram identificados incluindo Eurychaeta, Tenericutes, SR1 Absconditibacteria, Synergistetes, Actinobacteria, Saccharibacteria, Elusimicrobia, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Lentisphaerae. Há similaridade de 50% na comunidade bacteriana independente da dieta utilizada. A alimentação com grãos de oleaginosas apresentou grande diversidade de bactérias dos filos Bacteroidetes e Proteobacteria. A alimentação com volumosos (silagem e pastagem) apresentou grande diversidade de bactérias do filo Firmicutes, a dieta pastagem apresentou uma maior riqueza na diversidade filogénica.

Palavras-chave: ácido graxo poli-insaturado, canola, caroço de algodão, comunidade bacteriana ruminal, girassol, soja grão, 16S rDNA

***RUMINAL BACTERIAL DIVERSITY OF BEEF CATTLE FEED WITH DIFFERENT
OILSEEDS GRAINS***

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the bacterial diversity in the solid fraction of the ruminal content, through the gene sequences of the conserved 16S rDNA region, in response to diets content oilseed grains (canola, cottonseed, sunflower, soybean) fed to the beef cattle. Were used six crossbred steers, castrated male, rumen fistulated, with a mean weight of 416.33 ± 93.30 kg were distributed in 6x6 Latin Square (six diets and six periods), with a period of 14 days, of which 13 days of adaptation and 1 day of sample collection, totaling 84 days of testing, in addition to the pre-experimental period in a 30-day pasture. A total of 2,536,247 DNA sequences were generated for the Bacteria domain. The flora was considered quite rich and diverse. The bacterial diversity was composed of 24 bacterial phyla, with the most abundant Firmicutes, Bacteroidetes and Proteobacteria. Other phyla with less diversity have also been identified including Eurychaeta, Tenericutes, SR1 Absconditibacteria, Synergistetes, Actinobacteria, Saccharibacteria, Elusimicrobia, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Lentisphaerae. There is 50% similarity in the bacterial community independent of the diet used. Feeding with oilseeds showed a great diversity of bacteria from the phyla Bacteroidetes and Proteobacteria. Feeding with forrage (silage and pasture) showed great diversity of bacteria from the Firmicutes filo, the pasture diet presented a greater richness in phylogenetic diversity.

Keywords: polyunsaturated fatty acid, canola, cottonseed, rumen bacterial community, sunflower, soybean grain, 16S rDNA

Introdução

Os ruminantes são dependentes da simbiose com os micro-organismos, que têm a capacidade mecânica e enzimática para o aproveitamento de carboidratos estruturais (SILVA et al., 2018). As bactérias estão presentes em maior abundância e diversidade, correspondente a aproximadamente 95% da microbiota total (FLINT et al., 2008). A classificação destas bactérias é feita levando em consideração o tipo de substrato utilizado e os produtos oriundos de sua fermentação (ARCURI et al., 2006).

O rúmen é uma câmara fermentadora que possibilita a manutenção de padrões de fermentação benéficos ao hospedeiro, mantendo condições que promovem o crescimento de bactérias, fungos e protozoários, favorecendo assim a fermentação. (FURLAN et al., 2011). A fermentação converte os componentes dietéticos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteína microbiana e vitaminas do complexo B e vitamina K, metano, dióxido de carbono, amônia, nitrato (VALADARES FILHO & PINA, 2006).

Quando ocorre uma elevada produção de hidrogênio no rúmen, as metanogênicas, principalmente o gênero *Methanobacterium*, utilizam este composto para reduzir o dióxido de carbono e sintetizar o metano, contribuem desta forma, para a reciclagem do NAD oxidado e auxiliam na continuidade nos processos fermentativos (KOZLOSKI, 2011). Com o incremento de gorduras, óleos e grãos de oleaginosas na dieta é possível reduzir a produção de metano entérico, auxiliando na mitigação de gases de efeito estufa (BODAS et al., 2012; HRISTOV et al., 2013) e interferir na diversidade da população bacteriana.

O uso de fontes grãos de oleaginosas na nutrição animal é uma alternativa para melhorar a eficiência alimentar, reduzindo as perdas energéticas com a produção de metano através do consumo de hidrogênio pelo processo de biohidrogenação.

O estudo da abordagem metagenômica é uma ferramenta que permite avaliar a diversidade bacteriana, estudando o DNA total microbiano extraído diretamente do ambiente (HANDELSMAN, 2004). Utilizando a tecnologia de sequenciamento de DNA, a microbiota ruminal pode ser imediatamente investigado (BHATT et al., 2013). A caracterização da população de micro-organismos procariotos é realizada através do sequenciamento do gene 16S rDNA, sendo possível estimar a diversidade e classificação filogenética, afim de identificar e quantificar organismos não cultivados (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; KANG et al., 2009).

Nesse sentido, objetivou-se utilizar a abordagem metagenômica para avaliar a diversidade bacteriana na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada 16S rDNA, em resposta a dietas formuladas com diferentes grãos de oleaginosas (canola, caroço de algodão, girassol, soja) fontes de ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3 e ômega-6).

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS (Protocolo nº654/2015).

O experimento foi realizado na Universidade Católica Dom Bosco e na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Animais, delineamento experimental

Foram utilizados seis novilhos cruzados, machos castrados, fistulados no rúmen, com peso médio de $416,33 \pm 93,30$ kg ao início do experimento os quais foram distribuídos em quadrado latino 6x6 (seis dietas e seis períodos). Os animais foram vacinados, vermifugados e

alocados em baias individuais (18 m²) com cobertura, tendo livre acesso a água e alimento. O experimento foi dividido em 6 períodos experimentais de 14 dias, sendo 13 dias de adaptação e 1 dia de coleta de amostras, totalizando 84 dias de ensaio. Foi adotado um período pré experimental de 30 dias em pastagem.

Caracterização da forragem

A forragem era composta pela gramínea *Brachiaria brizantha* cv. Marandu syn. *Urochloa brizantha* cv. Marandu. Para determinar a composição bromatológica da forragem, foram coletadas amostras, obtidas através do corte do material existente que ocupava a área de um quadrado (0,25 m²), arremessado, aleatoriamente, dentro da área, foram coletadas oito sub amostras, que posteriormente foram homogeneizadas formando uma amostra única. Em seguida retiraram-se as amostras para determinação da massa verde e seca, sendo essa, realizada após a secagem das amostras em estufa de circulação de ar forçada, com temperatura a 65°C por 72 horas. Após a secagem, o material foi moído em moinho tipo Wiley equipado com peneira de malha com abertura de 1 mm para serem amostrados 2 g de massa seca e levado à estufa a 105° C, por 12 horas para se quantificar a segunda massa seca.

As amostras foram submetidas a análises laboratoriais para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB) segundo os métodos 930.15, 942.05 e 976.05 AOAC (2000), determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN) teor de fibra em detergente ácido (FDA) pelo método de Robertson & Van Soest (1985). Foram considerados os nutrientes (MS, MO, PB, FDN e FDA) com base na matéria seca (Tabela 1).

Tabela 1. Composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu syn. *Urochloa brizantha* cv. Marandu

	Folha verde	Colmo verde	Material morto	Planta inteira
MS (g/kg de MN)	397	344	349	366
MM (g/kg de MS)	9	9	8	9
PB (g/kg de MS)	100	75	48	79
FDN (g/kg de MS)	610	711	733	664

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro.

Caracterização das dietas

Foram avaliadas seis dietas (Tabela 2), sendo quatro contendo diferentes grãos de oleaginosas (caroço de algodão, canola, girassol e soja) visando obter 80g/kg de extrato etéreo na dieta, uma contendo ingredientes comumente utilizados no concentrado de bovinos com 30 g/kg de extrato etéreo, e outra apenas com volumoso (silagem de planta inteira de milho).

As amostras foram submetidas a análises laboratoriais para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo os métodos 930.15, 942.05, 976.05 e 920.39 AOAC (2000), determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN) de acordo com Mertens (2002) usando α -amylase (Termamyl 120 L®), teor de fibra em detergente ácido (FDA) pelo método de Robertson & Van Soest (1985). Foram considerados os componentes dietéticos (MS, MO, PB, EE, FDN e FDA) fornecidos e contidos nas sobras (Consumo = g de nutriente fornecido – g de nutriente nas sobras) com base na matéria seca.

As dietas foram formuladas utilizando como silagem de milho de planta inteira como volumoso, na proporção volumoso:concentrado de 40:60 com base na matéria seca, segundo NRC (2000) para obtenção de ganhos médios de 1,25 kg/dia para novilhos de corte cruzados com aproximadamente 400 kg de peso corporal. O fornecimento da dieta foi realizado uma vez ao dia, as 8.00 horas, de forma a manter as sobras em torno de 50 g/kg do fornecido, sendo realizado o ajuste de consumo diariamente, os grãos eram fornecidos inteiros. As dietas avaliadas foram: caroço de algodão (A), canola (C), girassol (G), padrão (PD), pastagem (P),

soja (SO) e silagem (S).

Tabela 2. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais

	Dietas (g/kg de MS)					
	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Silagem de milho	950	400	400	400	400	400
Caroço de algodão	-	-	350	-	-	-
Canola	-	-	-	187	-	-
Girassol	-	-	-	-	132	-
Soja	-	-	-	-	-	245
Milho	-	383	170	288	290	305
Farelo de Soja	-	167	30	75	128	-
Amireia	-	20	20	20	20	20
Núcleo mineral	50	30	30	30	30	30
Composição bromatológica das dietas						
MS (g/kg de MN)	252	492	488	496	495	493
MO (g/kg de MS)	936	956	920	931	930	944
PB (g/kg de MS)	72	191	175	180	180	200
FDN (g/kg de MS)	630	389	497	422	434	375
FDA (g/kg de MS)	426	209	317	238	226	211
EE (g/kg de MS)	23	35	74	73	72	68

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo.

Coleta de material ruminal

No período pré-experimental de 30 dias a pasto foi realizada a coleta de conteúdo ruminal considerado como período 0. A coleta de amostras do conteúdo ruminal foi realizada no 14º dia experimental de cada período, antes do arraçamento dos animais, as 7:00 h, manualmente, através da cânula. Foram pesadas dez gramas da fração sólida e adicionados 10 ml de TBE (pH 7,4), agitou-se vigorosamente por 3 minutos (vórtex) e posteriormente o conteúdo foi filtrado em tecido com malha de 100 micras. O filtrado foi submetido à centrifugação de 13.000 RCF por 13 minutos a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento restante foi ressuspensão em 0,8 ml de TE tampão Tris-EDTA (10X, pH 8,0). O conteúdo ressuspensão foi centrifugado à 15.000 RCF por 11 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi armazenado sob refrigeração (-20°C).

Extração do DNA genômico

A obtenção do DNA genômico foi realizada no precipitado ressuspenso obtido da fração sólida do conteúdo ruminal. Foram analisadas 42 amostras com o kit de extração QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (cat. no. 51604, Qiagen, Hilden, Germany). O total de DNA extraído do conteúdo ruminal foi quantificado em Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific®), e a qualidade do material genético foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Deteção do DNA metagenômico

As amostras de DNA metagenômico foram analisadas em eletroforese de cuba horizontal. Uma alíquota de 8 µl de cada amostra juntamente com 2 µl de tampão de carregamento [0,025% de azul de bromofenol p/v e 50% de glicerol v/v], foi disposta em gel de agarose a 0,8% (p/v), previamente imerso em tampão TBE 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 80 volts.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 10 minutos, e logo após descorado por 15 minutos em água destilada. A visualização das bandas com perfil de DNA metagenômico e do produto de PCR foi feita sob luz UV e a imagem documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad - Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA).

As dimensões do DNA metagenômico e dos fragmentos amplificados foram comparados a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 1 kb e 1kb plus DNA Ladder, dispostos no gel juntamente com as amostras analisadas.

PCR do gene 16S rDNA

As amostras de DNA metagenômico extraídos foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pela empresa GenOne Soluções em Biotecnologia, através da região conservada do gene 16S rDNA. As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 20 µl. A cada reação de amplificação foram incluídos um controle positivo, previamente testado, e um controle negativo (água ultrapura autoclavada).

Sequenciamento do gene 16S rDNA

As amostras foram sequenciadas em larga escala de DNA para empresa GenOne Soluções em Biotecnologia. A amplificação, assim como o sequenciamento das regiões V3-V4 (466 pb) do 16S rDNA foi realizada pela plataforma Illumina HiSeq (<http://www.genone.com.br/genomica/>), obtendo uma biblioteca genômica, processamento de dados, composição e abundância das espécies, complexidade e diferença de complexidade para cada amostra e *clustering* da composição de espécies para cada amostra e entre as amostras.

Análise dos dados do gene 16S rDNA

A análise dos dados subsequentes foi processada usando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). O QIIME é um programa livre baseado em *scripts Python* que permitem a classificação das sequências de 16S rDNA em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e, usando-as como base para construir árvores filogenéticas, plotar gráficos taxonômicos, construir redes de interação, calcular medidas de alfa e beta diversidade, entre outros (CAPORASO et al., 2010).

Dessa maneira, as OTU foram definidas por agrupamento a 97%, utilizando como referência o banco de dados de OTU mais recente do Greengenes com o método Uclust (EDGAR, 2010).

A estrutura geral da comunidade bacteriana de filo e gênero foram analisados utilizando gráfico de abundância relativa. Por sua vez, a alfa diversidade foi analisada por meio de curva de rarefação e observação de OTU. A análise de beta diversidade foi mensurada pela matriz de distância não ponderadas UniFrac (PCoA), sendo esta utilizada para demonstrar similaridade ou dissimilaridade entre as amostras analisadas (FUKUYAMA et al., 2015).

Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do software STAMP utilizando o Teste Exato de Fisher com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,01$) (cobertura nominal de 95%) (PARKS et al., 2010).

Resultados

Análise do DNA

A quantificação do DNA total extraído (mensurado em nanogramas por microlitros) obtiveram diferentes concentrações de DNA (Tabela 3), este processo pode ocorrer pela coloração e intensidade de luz UV no agrupamento de DNA, visto que bandas intensas apresentam maior concentração de DNA e bandas suaves com concentração menor de DNA. A disparidade nas concentrações de DNA entre as amostras variou de 8,0 a 562,0 ng/ μ l. A média das dietas foram: pastagem 81,07 ng/ μ l; silagem 110,97 ng/ μ l; padrão 124,90 ng/ μ l; caroço de algodão 111,65 ng/ μ l; canola 53,67 ng/ μ l; girassol 140,60 ng/ μ l; soja 191,17 ng/ μ l.

A leitura do gene 16S rDNA foi gerada utilizando sequenciamento de alto desempenho de DNA, no qual ao total, 2.901.804 sequências de DNA lidas, sendo 2.536.247 sequências de DNA combinadas obtidas após o controle de qualidade para o domínio Bactéria (Tabela 3). Essa análise foi baseada nas sequências de DNA obtidas pelo *pool* de amostras de cada dieta.

Tabela 3. Quantificação média de DNA total extraído no conteúdo ruminal

	Dieta						
	Pastagem	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
DNA (ng/ μ l) ¹	81,07	110,97	124,90	111,65	53,67	140,60	191,17
Total de sequências do 16S rDNA	382.685	363.727	395.226	310.197	343.165	384.537	383.737
Tamanho Médio (pb ²)	416	418	418	418	418	420	418
OTUs ³	9601	6614	7030	5787	6826	5917	6542

¹Quantificação realizada em Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) a partir de 1,0 μ l de extração total de DNA fecal de cada amostra.

²pb – pares de base. ** Médias referentes ao tamanho mínimo, máximo e médio do DNA amplificado.

³OTUs: unidades taxonômicas operacionais

As unidades taxonômicas operacionais tiveram maior variabilidade na dieta pastagem (9601 OTU observadas), seguindo das dietas padrão (7030 OTU observadas), canola (6826 OTU observadas), silagem (6614 OTU observadas), soja (6542 OTU observadas), girassol (5917 OTU observadas) e caroço de algodão (5787 OTU observadas).

Análise da composição da comunidade bacteriana

A análise dos filos bacterianos demonstrou que Firmicutes e Bacteroidetes apresentaram maior abundância relativa independente das dietas (Tabela 4), seguido pelo filo Proteobacteria. Foram identificados 24 filos no conteúdo ruminal de bovinos.

Tabela 4. Análise de abundância relativa de filos bacterianos

	Pastagem	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Firmicutes	51,94%	42,61%	35,60%	42,72%	35,79%	29,08%	27,23%
Bacteroidetes	40,67%	50,04%	57,57%	47,13%	55,03%	52,57%	59,33%
Spirochaetes	3,42%	1,75%	3,11%	1,77%	1,34%	0,74%	1,68%
Proteobacteria	1,98%	2,28%	2,20%	5,65%	5,91%	14,31%	7,66%
SR1 Absconditabacteria	0,53%	0,14%	0,00%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%
Synergistetes	0,43%	0,19%	0,31%	1,27%	0,31%	1,15%	0,55%
Tenericutes	0,28%	0,32%	0,10%	0,06%	0,05%	0,02%	0,06%
Euryarchaeota	0,22%	0,26%	0,39%	0,56%	0,62%	0,69%	0,19%
Actinobacteria	0,19%	0,31%	0,35%	0,55%	0,15%	0,86%	0,22%
Fibrobacteres	0,15%	1,69%	0,14%	0,08%	0,44%	0,02%	0,07%

Dentre os filos mais abundantes encontrados no conteúdo ruminal de bovinos se destacou os Firmicutes, apresentando sequências analisadas de 51,93% na dieta pastagem, 42,72% na dieta de caroço de algodão, 42,60% na dieta silagem, 35,79% na dieta canola, 35,60% na dieta padrão, 29,07% na dieta girassol e 27,23% na dieta soja.

O segundo filo mais abundante identificado foi o Bacteroidetes apresentando sequências analisadas de 59,32% na dieta soja, 57,56% na dieta padrão, 55,03% na dieta canola, 52,57% na dieta girassol, 50,03% na dieta silagem, 47,13% na dieta caroço de algodão e 40,66% na dieta pastagem.

O filo Proteobacteria, terceiro maior filo identificado apresentando sequências analisadas de 14,30% na dieta girassol, 7,66% na dieta soja, 5,91% na dieta canola, 5,64% na dieta caroço de algodão, 2,27% na dieta silagem, 2,19% na dieta padrão e 1,97% na dieta pastagem.

O filo Eurychaeota filo identificado apresentando sequências analisadas de 0,69% na dieta girassol, 0,62% na dieta canola, 0,56% na dieta caroço de algodão, 0,39% na dieta padrão, 0,26% na dieta silagem, 0,22% na dieta pastagem e 0,19% na dieta soja.

O filo Spirochaetes foi identificado apresentando sequências analisadas de 3,42% na dieta pastagem, 3,11% na dieta padrão, 1,76% na dieta caroço de algodão, 1,74% na dieta silagem, 1,67% na dieta soja, 1,34% na dieta canola e 0,74% na dieta girassol.

Outro filo identificado com menor expressão numérica, mas com papel funcional muito importante foi o Fibrobacteres, apresentando sequências analisadas de 1,69% na dieta silagem, 0,44% na dieta canola, 0,15% na dieta pastagem, 0,14% na dieta padrão, 0,08% na dieta caroço de algodão, 0,07% na dieta soja e 0,02% na dieta girassol.

Apareceram outros filos com menor expressão numérica, Tenericutes (média de 0,13% na identificação de filos), SR1 Absconditalbacteria (média de 0,1% na identificação de filos), Synergistetes (média de 0,6% na identificação de filos), Actinobacteria (média de 0,4% na identificação de filos), Saccharibacteria (média de 0,08% na identificação de filos),

Elusimicrobia (média de 0,06% na identificação de filos), Cyanobacteria (média de 0,05% na identificação de filos), Verrucomicrobia (com média de 0,035% na identificação de filos), Fusobacteria (com média de 0,004% na identificação de filos), Lentisphaerae (com média de 0,002% na identificação de filos).

Apareceram filos com menor expressão numérica em algumas dietas: Armatimonadetes (pastagem, canola, silagem, soja e girassol, com média de 0,004% na identificação de filos); Acidobacteria (canola, silagem, soja e girassol, com média de 0,004% na identificação de filos); Chloroflexi (caroço de algodão, canola, silagem, padrão, soja e girassol, com média de 0,004% na identificação de filos); CPR2 (girassol com média de 0,003%); Deinococcus-thermus (canola e girassol, com média de 0,002% na identificação de filos); Gemmatimonadetes (caroço de algodão, canola, silagem, soja e girassol, com média de 0,001% na identificação de filos); CPR2 (girassol com média de 0,003% na identificação de filos); Chlamydiae (girassol com média de 0,001% na identificação de filos); Thermomicrobia (soja com média de 0,001% na identificação de filos).

A análise das classes bacterianas demonstrou que Clostridia (46,61% na dieta pastagem, 35,08% na dieta silagem, 32,54% na dieta padrão, 37,84% na dieta caroço de algodão, 33,18% na dieta canola, 23,11% na dieta girassol, 24,58% na dieta soja) e Bacteroidia (40,53% na dieta pastagem, 49,95% na dieta silagem, 57,52% na dieta padrão, 46,99% na dieta caroço de algodão, 54,92% na canola, 52,50% na dieta girassol, 59,27% na dieta soja) apresentaram maior abundância relativa em todas as dietas analisadas (Tabela 5), seguido pela classe Negativicutes (4,89% na dieta pastagem, 7,09% na dieta silagem, 2,71% na dieta padrão, 4,17% na dieta caroço de algodão, 2,16% na dieta canola, 5,10% na dieta girassol, 2,09% na dieta soja), Spirochaetes (3,42% na dieta pastagem, 1,75% na dieta silagem, 3,11% na dieta padrão, 1,77% na dieta caroço de algodão, 1,34% na dieta canola, 0,74% no girassol, 1,68% na dieta soja) e Gammaproteobacteria (1,36% na dieta pastagem, 1,68% na dieta silagem, 1,79% na dieta

padrão, 5,03% na dieta caroço de algodão, 5,04% na dieta canola, 13,30% na dieta girassol, 7,25% na dieta soja). Observa-se que a classe Methanobacteria está presente no conteúdo ruminal independente da dieta (0,22% na dieta pastagem, 0,25% na dieta silagem, 0,34% na dieta padrão, 0,55% na dieta caroço de algodão, 0,58% na dieta canola, 0,66% na dieta girassol, 0,18% na dieta soja).

Tabela 5. Análise de abundância relativa de classes bacterianas

	Pastagem	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Clostridia	46,61%	35,08%	32,54%	37,84%	33,18%	23,11%	24,58%
Bacteroidia	40,53%	49,95%	57,52%	46,99%	54,92%	52,50%	59,27%
Negativicutes	4,89%	7,09%	2,71%	4,17%	2,16%	5,10%	2,09%
Spirochaetes	3,42%	1,75%	3,11%	1,77%	1,34%	0,74%	1,68%
Gammaproteobacteria	1,36%	1,68%	1,79%	5,03%	5,04%	13,30%	7,25%
Deltaproteobacteria	0,46%	0,19%	0,16%	0,19%	0,20%	0,10%	0,11%
Synergistia	0,43%	0,19%	0,31%	1,27%	0,31%	1,15%	0,55%
Erysipelotrichia	0,39%	0,29%	0,31%	0,62%	0,33%	0,45%	0,39%
Mollicutes	0,28%	0,32%	0,10%	0,06%	0,05%	0,02%	0,06%
Methanobacteria	0,22%	0,25%	0,34%	0,55%	0,58%	0,66%	0,18%

A análise da ordem bacteriana demonstrou que Clostridiales (46,60% na dieta pastagem, 35,06% na dieta silagem, 32,50% na dieta padrão, 37,81% na dieta caroço de algodão, 33,04% na dieta canola, 23,10% na dieta girassol, 24,55% na dieta soja) e Bacteroidales (40,53% na dieta pastagem, 49,95% na dieta silagem, 57,52% na dieta padrão, 46,99% na dieta caroço de algodão, 54,92% na dieta canola, 52,50% na dieta girassol, 59,27% na dieta soja) apresentaram maior abundância relativa em todas as dietas analisadas (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de abundância relativa de ordens bacterianas

	Pastagem	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Clostridiales	46,60%	35,06%	32,50%	37,81%	33,04%	23,10%	24,55%
Bacteroidales	40,53%	49,95%	57,52%	46,99%	54,92%	52,50%	59,27%
Selenomonadales	4,89%	7,09%	2,71%	4,17%	2,16%	5,10%	2,09%
Spirochaetales	3,42%	1,75%	3,11%	1,77%	1,34%	0,74%	1,68%
Aeromonadales	1,34%	1,50%	1,76%	4,85%	4,96%	12,91%	7,12%
Synergistales	0,43%	0,19%	0,31%	1,27%	0,31%	1,15%	0,55%
Erysipelotrichales	0,39%	0,29%	0,31%	0,62%	0,33%	0,45%	0,39%
Desulfovibrionales	0,33%	0,12%	0,15%	0,16%	0,16%	0,08%	0,09%
Mollicutes_RF9	0,25%	0,26%	0,07%	0,04%	0,04%	0,01%	0,05%
Methanobacteriales	0,22%	0,25%	0,34%	0,55%	0,58%	0,66%	0,18%

Foram identificadas outras ordens com menor expressão, dentre elas, Selenomonadales (4,89% na dieta pastagem, 7,09% na dieta silagem, 2,71% na dieta padrão, 4,17% na dieta caroço de algodão, 2,16% na dieta canola, 5,10% na dieta girassol, 2,09% na dieta soja), Spirochaetales (3,42% na dieta pastagem, 1,75% na dieta silagem, 3,11% na dieta padrão, 1,77% na dieta caroço de algodão, 1,34% na dieta canola, 0,74% na dieta girassol, 1,68% na dieta soja), Aeromonadales (1,34% na dieta pastagem, 1,50% na dieta silagem, 1,76% na dieta padrão, 4,85% na dieta caroço de algodão, 4,96% na dieta canola, 12,91% na dieta girassol, 7,12% na dieta soja), Synergistales (0,43% na dieta pastagem, 0,19% na dieta silagem, 0,31% no padrão, 1,27% na dieta caroço de algodão, 0,31% na dieta canola, 1,15% na dieta girassol, 0,55% na dieta soja). Observa-se que a ordem Methanobacteriales está presente em todas as dietas (0,22% na dieta pastagem, 0,25% na dieta silagem, 0,34% na dieta padrão, 0,55% na dieta caroço de algodão, 0,58% na dieta canola, 0,66% na dieta girassol, 0,18% na soja).

A análise das famílias bacterianas demonstrou que Lachnospiraceae (29,06% na dieta pastagem, 15,45% na dieta silagem, 14,37% na dieta padrão, 27,60% na dieta caroço de algodão, 20,83% na dieta canola, 15,37% na dieta girassol, 13,65% na dieta soja), Rikenellaceae (19,76% na dieta pastagem, 10,46% na dieta silagem, 5,68% na dieta padrão, 6,22% na dieta caroço de algodão, 6,43% na dieta canola, 2,98% na dieta girassol, 4,70% na dieta soja), Ruminococcaceae (14,72% na dieta pastagem, 14,77% na dieta silagem, 11,14% na dieta

padrão, 8,72% na dieta caroço de algodão, 10,30% na dieta canola, 6,46% na dieta girassol, 9,22% na dieta soja), Prevotellaceae (13,85% na dieta pastagem, 27,09% na dieta silagem, 32,69% na dieta padrão, 30,18% na dieta caroço de algodão, 30,74% na dieta canola, 39,85% na dieta girassol, 34,85% na dieta soja), Bacteroidales S24-7 (3,62% na dieta pastagem, 8,04% na dieta silagem, 8,96% na dieta padrão, 7,69% na dieta caroço de algodão, 11,76% na dieta canola, 7,39% na dieta girassol, 15,47% na dieta soja) apresentaram maior abundância relativa em todas as dietas analisados (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de abundância relativa de famílias bacterianas

	Pastagem	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Lachnospiraceae	29,06%	15,45%	14,37%	27,60%	20,83%	15,37%	13,65%
Rikenellaceae	19,76%	10,46%	5,68%	6,22%	6,43%	2,98%	4,70%
Ruminococcaceae	14,72%	14,77%	11,14%	8,72%	10,30%	6,46%	9,22%
Prevotellaceae	13,85%	27,09%	32,69%	30,18%	30,74%	39,85%	34,85%
Bacteroidales S24-7	3,62%	8,04%	8,96%	7,69%	11,76%	7,39%	15,47%
Spirochaetaceae	3,41%	1,74%	3,11%	1,76%	1,34%	0,74%	1,67%
Acidaminococcaceae	3,40%	6,72%	2,19%	2,51%	1,63%	4,15%	1,30%
Bacteroidales BS11	2,38%	3,30%	8,41%	0,70%	2,44%	0,51%	2,58%
Veillonellaceae	1,49%	0,37%	0,52%	1,65%	0,53%	0,95%	0,79%
Christensenellaceae	1,37%	3,62%	5,64%	0,56%	0,97%	0,57%	0,86%
Succinivibrionaceae	1,34%	1,50%	1,76%	4,85%	4,96%	12,90%	7,12%
Family XIII	1,28%	1,03%	1,00%	0,83%	0,81%	0,59%	0,69%
Synergistaceae	0,43%	0,19%	0,31%	1,27%	0,31%	1,15%	0,55%
Erysipelotrichaceae	0,39%	0,29%	0,31%	0,62%	0,33%	0,45%	0,39%
Bacteroidales	0,36%	0,64%	1,12%	1,72%	3,13%	1,25%	1,22%
Desulfovibrionaceae	0,33%	0,12%	0,15%	0,16%	0,16%	0,08%	0,09%
Bacteroidales UCG-001	0,24%	0,11%	0,10%	0,10%	0,06%	0,05%	0,04%
Methanobacteriaceae	0,22%	0,25%	0,34%	0,55%	0,58%	0,66%	0,18%

Foram identificadas outras famílias com menor expressão, dentre elas, Spirochaetaceae (3,41% na pastagem, 1,74% na silagem, 3,11% no padrão, 1,76% no caroço de algodão, 1,34% na canola, 0,74% no girassol, 1,67% na soja), Acidaminococcaceae (3,40% na pastagem, 6,72% na silagem, 2,19% no padrão, 2,51% no caroço de algodão, 1,63% na canola, 4,15% no girassol, 1,30% na soja) e Bacteroidales BS11 (2,38% na pastagem, 3,30% na silagem, 8,41% no padrão,

0,70% no caroço de algodão, 2,44% na canola, 0,51% no girassol, 2,58% na soja). Algumas famílias foram identificadas em quantidade expressiva em algumas dietas, dentre elas, Christensenellaceae (3,62% na silagem, 5,64% no padrão), Succinivibrionaceae (4,85% no caroço de algodão, 4,96% na canola, 12,90% no girassol, 7,12% na soja), Bacteroidales (3,13% na canola). Observa-se que a família Methanobacteriaceae está presente em todas as dietas (0,22% na pastagem, 0,25% na silagem, 0,34% no padrão, 0,55% no caroço de algodão, 0,58% na canola, 0,66% no girassol, 0,18% na soja).

Por meio das análises das sequências de DNA, foi possível observar e comparar a composição geral e diferenças relativas na diversidade, tal como análise de alfa e beta diversidade da comunidade bacteriana.

A alfa diversidade, também conhecida como diversidade local, tem como objetivo analisar as amostras individualmente, podendo ser analisada por diferentes métricas de diversidade. Neste contexto, a alfa diversidade foi analisada pela observação de OTU, por meio da curva de rarefação (Figura 1), no qual demonstrou que houve mudança na mensuração das OTU entre as dietas no decorrer do sequenciamento do gene 16S rDNA. No conteúdo ruminal dos animais alimentados com a dieta pastagem, houve maior riqueza de OTU, a dieta girassol apresentou menor riqueza de OTU, as dietas padrão, caroço de algodão, canola e soja apresentaram similaridade na riqueza de OTU. Através desta análise é possível identificar que nas dietas compostas por concentrado apresentaram menos riqueza de OTU em comparação com a dieta pastagem (os animais consumiram *ad libitum* e não houve manipulação ambiental).

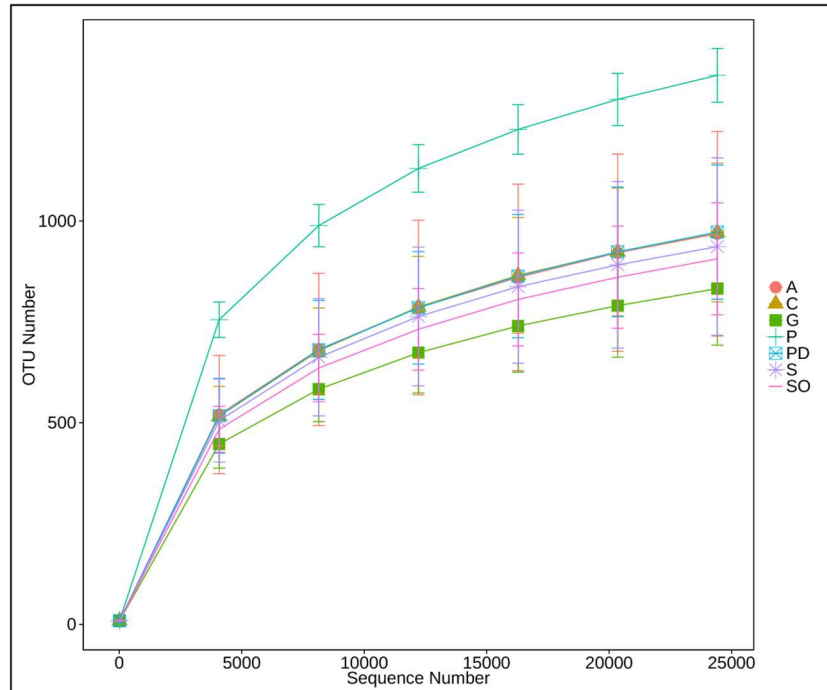


Figura 1. Curva de rarefação, estimado pela descrição de OTU observadas.
P: pastagem; S: silagem; PD: padrão; A: caroço de algodão; C: canola; G: girassol; SO: soja.

A análise de rarefação é um importante parâmetro para estimar a riqueza de espécies alcançadas na análise e adicionalmente indica o quanto a abrangência observada foi suficiente para revelar a diversidade total da comunidade amostrada, nas dietas foram apresentadas 1000 OTU para 25 mil sequências (Figura 1).

Através da análise de beta diversidade é possível comparar a diversidade bacteriana entre as amostras analisadas. A beta diversidade foi analisada por meio da distância não ponderada, demonstrado em gráfico PCoA (Figura 2). Por meio da análise foi possível observar que independente da dieta utilizada houve similaridade entre suas comunidades bacterianas.

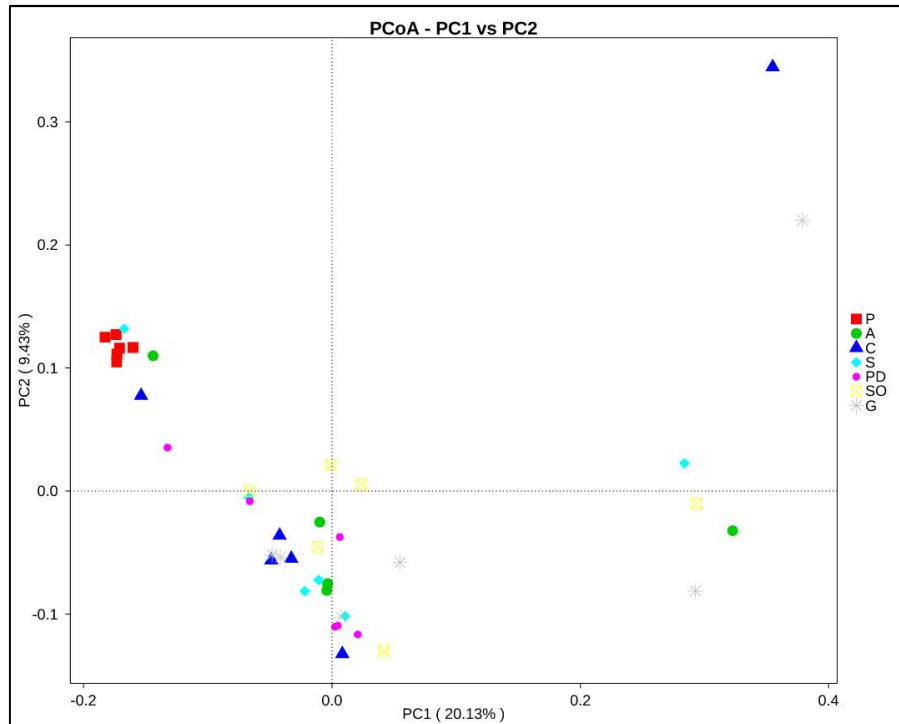


Figura 2. Análise de Coordenadas Principais (PCoA).

Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Unweight UniFrac não ponderada para a comunidade bacteriana.

Diferentes formas geométricas representam as amostras únicas de cada dieta analisada.

P: pastagem; S: silagem; PD: padrão; A: caroço de algodão; C: canola; G: girassol; SO: soja.

Na análise do dendograma observa-se que independente da dieta utilizada há similaridade nas comunidades bacterianas. Compartilham de similaridade: caroço de algodão e canola; pastagem e silagem; as dietas tem similaridade de aproximadamente 50% da comunidade bacteriana entre eles (Figura 3).

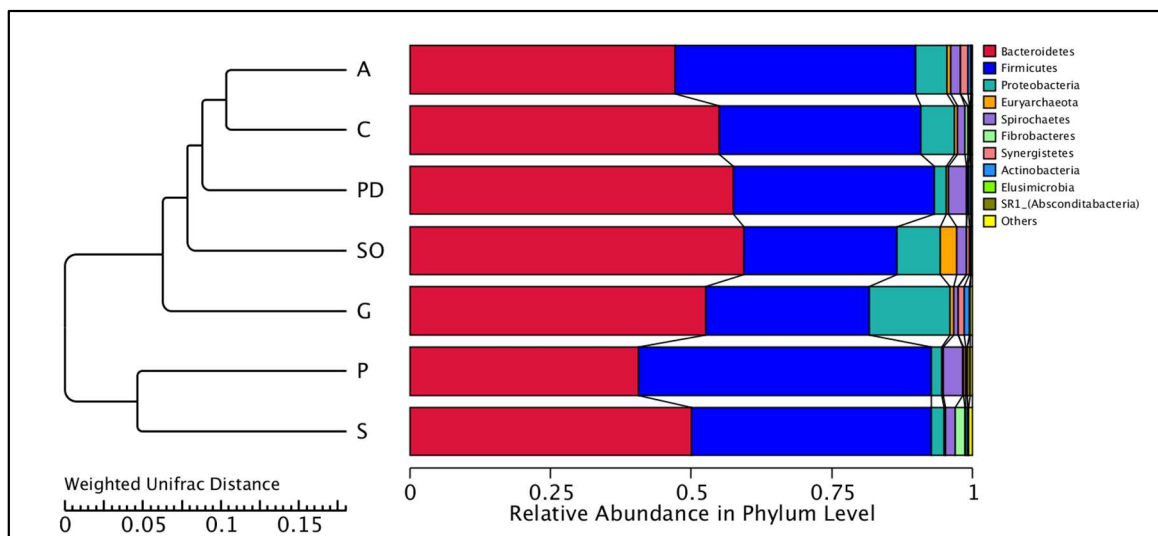


Figura 3. Dendrograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de bactérias.

P: pastagem; S: silagem; PD: padrão; A: caroço de algodão; C: canola; G: girassol; SO: soja.

Discussão

Os estimadores de riqueza e índices de diversidade demonstraram que a microbiota bacteriana ruminal se apresentou bastante rica e diversa, sendo a descrição da comunidade adequada, a partir do número de sequências obtidas. Isto demonstra efetivamente o poder da técnica genômica associada ao sequenciamento do gene 16S rDNA para descrever a comunidade bacteriana, a qual não seria revelada pelas técnicas tradicionais de cultivo bacteriano na microbiologia.

Através do sequenciamento do gene 16S rDNA foi possível identificar no conteúdo ruminal bovino 24 filos distintos, número maior do que o verificado por Kim, Morrison & Yu (2011), Li et al. (2012) e Wu et al. (2012) que encontraram 21, 19 e 8 filos respectivamente, aplicando outra técnica de sequenciamento (16S rRNA).

Apesar das diferenças nas quantidades de filos encontradas por diversos autores os dois filos identificados em maior proporção em grande parte dos trabalhos se alternam entre Firmicutes e Bacteroidetes (Tabela 4), filos com grande atividade proteolítica e celulolítica (OZUTSUMI et al., 2005; KIM, MORRISON & YU, 2011; WU et al., 2012).

Dentre os filos mais abundantes encontrados no rúmen bovino do presente estudo se destacou os Firmicutes, os gêneros com maior expressão neste filo encontra-se o *Ruminococcus*, este gênero apresenta como espécie as bactérias *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*, uma das principais degradadoras de carboidratos estruturais, com capacidade de se aderir rapidamente à superfície dos vegetais ingeridos pelo hospedeiro para digerir a celulose (KOIKE et al., 2003). O gênero *Clostridium* presente no filo Firmicutes possui duas espécies principais, o *Clostridium proteoclasticum* que desempenha principalmente atividade proteolítica (ATTWOOD et al., 1996) e o *Clostridium lundense* que está relacionado com a atividade lipolítica (CIRNE et al., 2006). Outro importante gênero pertencente ao filo Firmicutes o *Butyrivibrio*, tendo como espécie o *Butyrivibrio fibrisolvens*. Estes gêneros estão geralmente associados à fermentação de carboidratos solúveis e desempenham um papel muito importante na degradação do grão de amido (McALLISTER, 1990). Vale ressaltar a importância do gênero *Megasphaera*, tendo como espécie *Megasphaera elsdenii*, principal bactéria ruminal fermentadora de lactato no rúmen, com capacidade de produzir acetato, propionato, butirato e valerato quanto glicose produzindo butirato, acetato e caproato (WEIMER & MOEN, 2007), tal função é benéfica para o rúmen prevenindo a acidose, provavelmente a presença dessa bactéria auxiliou na prevenção de acidose nas dietas padrão e caroço de algodão, as quais apresentaram uma proporção maior dessa bactéria. Ao avaliar as tabelas de composição bromatológica das dietas e da pastagem (Tabela 1 e 2), observou-se que os valores de FDN corroboram com os dados observados acima, apresentando uma diversidade maior na população de bactérias degradadoras de carboidratos estruturais.

O segundo filo mais abundante identificado foi o Bacteroidetes, os gêneros com maior expressão dentro deste filo são os Bacteroides e Prevotella. Os Bacteroides possuem duas principais espécies encontradas no rúmen bovino são os *Bacteroides rumenicola* e os *Bacteroides amylophilus*. O gênero *Prevotella* é um dos representantes mais numerosos das

bactérias ruminais, sendo que este grupo representa cerca de 60% dos isolados de acordo com van Gylswyk (1990). Dentre as espécies com maior predominância estão as *Prevotella bryantii*, *Prevotella ruminicola* e *Prevotella brevis*, cujas principais funções no rúmen são degradação e utilização do amido, degradação de polissacarídeos como xilanas e pectinas da parede celular de plantas, porém, não degradam celulose (COTTA, 1992). Ao avaliar a diversidade de bactérias apresentada em cada dieta, percebe-se maior diversidade nas dietas com maior teor de carboidratos não fibrosos, que foram representados pelos açúcares solúveis em água (mono e dissacarídeos), amido e pectina, que são rápida e completamente digeríveis no trato gastrointestinal (MERTENS, 1987; MERTENS, 1996).

No filo Proteobacteria, ao avaliar a diversidade de bactérias apresentada por cada dieta, apresentou uma diversidade maior nas dietas com maior teor de carboidratos não-fibrosos. A bactéria amilolítica *Ruminobacter amylophilus* é predominante no rúmen de bovinos alimentados com dieta rica em amido (HUNGATE, 1966), sendo a gama de substratos utilizados por esta bactéria limitado a amido, maltose e maltodextrinas (HAMLIN & HUNGATE, 1956).

O filo Eurychaeta representa todas as metanogênicas, seis grupos fazem parte dessa ordem. Os grupos básicos são Methanopyrales, Methanococcales e Methanobacteriales (classe I); Methanomicrobiales (classe II) (BAPTESTE, BROCHIER & BOUCHER, 2005) e Methanosarcinales (classe III) (ANDERSON et al., 2009), e recém-conhecido grupo Methanocellales (SAKAI et al., 2008).

Dentro do filo Spirochaetes o maior grupo observado em nível de gênero foi o *Treponema*, no rúmen as espécies mais importantes deste gênero são as *Treponema bryantii* e *Treponema saccharophilum* que atuam principalmente na fermentação de carboidratos não-estruturais (STANTON & CANALE-PAROLA, 1980), dessa forma, sugere-se que ocorreu

interação entre micro-organismos para a produção e utilização de malto-oligossacarídeos, permitindo o crescimento de *Treponema bryantii* (COTTA, 1992).

Outro filo identificado com menor expressão numérica, mas com papel funcional muito importante foi o Fibrobacteres que é composto por bactérias celulolíticas, sendo identificado até gênero no sequenciamento.

No filo Tenericutes foi identificada a bactéria *Anaeroplasma varium* conhecida por produzir hidrogênio e propionato durante a fermentação ruminal (ROBINSON, ALLISON & HARTMAN, 1975).

No filo Synergistetes foi identificada a bactéria *Synergistetes jonesii* e foi descrita pela primeira vez em 1992 (ALLISON et al., 1992), as bactérias deste filo estão amplamente distribuídas em todos os ambientes anaeróbicos, especialmente aqueles associados ao sistema digestivo dos animais (GODON et al., 2005; DAVES et al., 2012). A degradação de aminoácidos parece ser o nicho nutricional primário e os produtos finais da fermentação formados são acetato, propionato, isovalerato e ornitina (McSWEENEY et al., 1993). Através do aumento do metabolismo de aminoácidos se reduzem os equivalentes de hidrogênio na presença de receptores de elétrons terminais (por exemplo, tiosulfato) ou com um metanogênico (FAUDON et al., 1995; SURKOV et al., 2001), também metabolizam a arginina em ornitina (McSWEENEY et al., 1993; PLUGGE & STAMS, 2001), provavelmente pela presença da bactéria *Synergistetes jonesii* que foram observadas poucas bactérias metanogênicas neste trabalho.

O filo Verrucomicrobia contribui de forma significativa para a degradação de polissacarídeos e contém um amplo repertório de enzimas hidrolisadas de glicosídeos (MARTINEZ-GARCIA et al., 2012). A verrucomicrobia também é ativa na oxidação de metano pela conversão do metano em metanol, uma reação catalisada pela enzima metano

mono-oxigenase (DURSO et al., 2010), que apareceu em maior proporção nas dietas silagem, caroço de algodão e canola.

O filo Actinobacteria pertence a um grupo de bactérias gram-positivas presentes no rúmen (PANDYA et al., 2010), existe uma considerável falta de informação sobre ecologia e biologia das actinobactérias no rúmen. O crescimento ocorre em meios contendo líquido ruminal, peptona e um aceptor de elétrons adequado (ANDERSON et al., 2000), estudos recentes mostraram que esses micro-organismos atuaram na biodegradação da lignocelulose (WANG et al., 2016). A proporção e composição das Actinobacteria no rúmen diferem com a idade dos animais, eles são mais prevalentes e largamente povoados com membros da ordem Actinomycetales em bezerros recém-nascidos, mas sua população diminui significativamente na vaca que se torna povoada com membros da ordem Coriobacteriales (JAMI et al., 2013).

Não é conhecido o motivo em que filios bacterianos menores (e não ruminais) aparecem no rúmen, todavia com o surgimento de novos estudos, possivelmente serão descobertos novos desafios e a partir disso será determinada a especificidade.

Conclusão

A alimentação com grãos de oleaginosas apresentou grande diversidade de bactérias dos filios Bacteroidetes e Proteobacteria. A alimentação com volumosos (silagem e pastagem) apresentou grande diversidade de bactérias do filo Firmicutes, a dieta pastagem apresentou uma maior riqueza na diversidade filogénica.

Agradecimentos

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e

Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (**Fundect**) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Referências

- ALLISON, M.J.; MAYBERRY, W.R.; MCSWEENEY, C.S.; STAHL, D.A. *Synergistes jonesii*, gen. nov., sp. nov.: a rumen bacterium that degrades toxic pyridinediols. **Syst Appl Microbiol.**, v.15, p.522–529, 1992.
- ANDERSON I. et al. Genomic characterization of Methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. **PLoS One**, v.4, p.e5797, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0005797.
- ANDERSON, R.; RASMUSSEN, M.; JENSEN, N.; MILTON, J.; ALLISON, R. *Denitrobacterium detoxificans* gen.nov., sp.nov., a ruminal bacterium that respire on nitrocompounds. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.50, p.633–638, 2000.
- ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. 2011. **Microbiologia do rúmen**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 111-151.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC., 2000. **Official methods of analysis**. 13.ed. Washington: AOAC.
- ATTWOOD, G.T.; REILLY, K.; PATEL, B.K.C. *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.46, p.753-758, 1996.
- BAPTESTE E.; BROCHIER C.; BOUCHER Y. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. **Archaea**, v.1, p.353–363, 2005.
- BHATT, V.D.; DANDE, S.S.; PATIL, N.V.; JOSHI, C.G. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Molecular Biology Reports**, v.40, p.3363–3371, 2013. doi: 10.1007/s11033-012-2411-4 PMID: 23277394
- BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCIA-GONZALEZ, R.; ANDRES, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.176, p.78–93, 2012. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010
- BORREL, G.; O'TOOLE, P.W.; HARRIS, H.M.B.; PEYRET, P.; BRUGÈRE, J.F.; GRIBALDO, S. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. **Genome Biol. Evol.**, v.5, p.1769–1780, 2013.
- CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PENA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v.7, n.5, p.335-336, 2010.
- CIRNE, D.G.; DELGADO, O.D.; MARICHAMY, S.; MATTIASSON, B. *Clostridium lundense* sp. nov., a novel anaerobic lipolytic bacterium isolated from bovine rumen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.625-628, 2006.

- COTTA, M.A. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.48-54, 1992.
- DAVIS, C.K.; WEBB, R.I.; SLY, L.I.; DENMAN, S.E.; MCSWEENEY, C.S. Isolation and survey of novel fluoroacetate-degrading bacteria belonging to the phylum Synergistetes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.80, n.3, p. 671–684, 2012.
- DURSO, L.M.; HARHAY, G.P.; SMITH, T.P.; BONO, J.L.; DESANTIS, T.Z.; HARHAY, D.M.; ANDERSEN, G.L.; KEEN, J.E.; LAEGREID, W.W.; CLAWSON, M.L. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.76, p.4858-4862, 2010.
- EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v.26, n.19, p.2460-2461, 2010.
- FAUDON, C.; FARDEAU, M.L.; HEIM, J.; PATEL, B.; MAGOT, M.; OLLIVIER, B. Peptide and amino-acid oxidation in the presence of thiosulfate by members of the genus *Thermoanaerobacter*. **Curr Microbiol.**, v.3, p.152–157, 1995.
- FLINT, H.J.; BAYER, E.A.; RINCON, M.T.; LAMED, R.; WHITE, B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v 6, p.121-31, 2008.
- FUKUYAMA, J.; MCMURDIE, P.J.; DETHLEFSEN, L.; RELMAN, D.A.; HOLMES, S. Comparisons of distance methods for combining covariates and abundances in microbiomes studies. **Pac Symp Biocomput**, v.2012, p.213-24, 2015.
- FURLAN, F.H.; MENDES, E.R.S.; DUCATTI, K.R. MARCON, G.C.; DOMBROSKY, T.; AMORIM, T.M.; RIET-CORREA, F. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, 2011.
- GODON, J.J.; MORINIERE, J.; MOLETTA, M.; GAILLAC, M.; BRU, V.; DELGENES, J.P. Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the ‘Synergistes’ example. **Environ Microbiol.**, v.7, p. 213–224, 2005.
- HAMLIN, L.J.; HUNGATE, R.E. Culture and physiology of a starch-digesting bacterium (*Bacteroides amylophilus* n. sp.) from the bovine rumen. **Journal of bacteriology**, v.72, n.4, p.548, 1956.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Ver**, v.68, p.669–685, 2004.
- HRISTOV, A.N.; OH, J.; LEE, C.; MEINEN, R.; MONTES, F.; OTT, T. et al. 2013. **Mitigation of Greenhouse Gas Emissions in Livestock Production – A Review of Technical Options for Non-CO2 Emissions (FAO Animal Production and Health Paper No. 177)**. Rome: FAO.
- HUNGATE, R.E. 1966. **The rumen and its microbes**. Academic Press, New York. 533p.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2014). **Climate Change 2014**. Synthesis report 2014.
- JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A.; MIZRAHI, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **ISME J.**, v.7, p.1069-1079, 2013.
- KANG, S.; DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. The use of molecular tools for the study of rumen ecology. In: Simpósio internacional avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes, 2. Pirassununga. **Anais...** p.179-194, 2009.
- KIM, M.; MORRISON, M.; YU, Z. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.76, p.49-63, 2011.
- KOIKE S.; PAN J.; KOBAYASHI Y.; TANAKA K. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1429-1435, 2003.

- KOZLOSKI, G.B. 2011. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011. 216 p.
- LEAHY, S.C.; KELLY, W.J.; ALTERMANN, E.; RONIMUS, R.S.; YEOMAN, C.J.; PACHECO, D.M. et al. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. **PLoS ONE**, v.5, p.e8926, 2010.
- LI, R.W.; WU, S.; VI, R.L.B.; LI, W.; LI, C. Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate. **PloS One**, v.7, p.e29392, 2012.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.
- MARTINEZ-GARCIA, M.; BRAZEL, D.M.; SWAN, B.K.; ARNOSTI, C.; CHAIN, P.S.; REITENGA, K.G.; XIE, G.; POULTON, N.J.; LLUESMA GOMEZ, M.; MASLAND, D.E.; THOMPSON, B.; BELLOWES, W.K.; ZIERVOGEL, K.; LO, C.C.; AHMED, S.; GLEASNER, C.D.; DETTER, C.J.; STEPANAUSKAS, R. Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of Verrucomicrobia. **PLoS One.**, v.7, p.e35314, 2012.
- McALLISTER, T.A.; CHENG, K.J.; RODE, L.M.; FORSBERG, C.W. Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3146-3153, 1990.
- McSWEENEY, C.S.; ALLISON, M.J.; MACKIE, R.I. Amino-acid utilization by the ruminal bacterium *Synergistes jonesii* strain 78-1. **Arch Microbiol.**, v.159, p.131–135, 1993.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MERTENS, D.R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **J. Anim. Sci.**, v.64(5), p.1548-1558, 1987.
- MERTENS, D.R. Using fiber and carbohydrate analyses to formulate dairy rations. In: INFORMATIONAL CONFERENCE WITH DAIRY AND FORAGES INDUSTRIES, 1996, Wisconsin, USA. **Proceedings...** Wisconsin, 1996. p.81-92.
- NRC. (2000). **Nutrient Requirements of Beef Cattle**, 7th rev. edn. Natl. Acad. Press, Washington, DC, USA.
- OZUTSUMI, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA.; ITABASHI, H. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.69, p.499-506, 2005.
- PANDYA, P.R.; SINGH. K.M.; PARNERKAR, S.; TRIPATHI, A.K.; MEHTA, H.H. et al. Bacterial diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (*Bubalus bubalis*), assessed by 16S rDNA analysis. **J Appl Genetics**, v.51, p.395–402, 2010.
- PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v.26, n.6, p.715-721, 2010.
- PLUGGE, C.M.; STAMS, A.J.M. Arginine catabolism by *Thermanaerovibrio acidaminovorans*. **FEMS Microbiol Lett**, v.195, p.259–262, 2001.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P. J. 1985. **Analysis of forages and fibrous foods - a laboratory manual for animal science**. Ithaca.
- ROBINSON, I.M.; ALLISON, M.J.; HARTMAN, P.A. *Anaeroplasma abactoclasticum* gen. nov., sp. nov., obligately anaerobic mycoplasma from rumen. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.25, p.173–181, 1975.
- SAKAI S. et al. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage ‘Rice Cluster I’, and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.58, p.929 –936, 2008.

- SILVA, T.D.; VIEIRA, R.I.M.; FERREIRA, J.C.; BARBOSA, I.T.; SILVA, T.D.; DIJKSTRA, D.; PESSOA, M.S.; ABRÃO, F.O. Influência do processamento de grãos sobre o desempenho de ruminantes e a população microbiana do rúmen. **Cad. Ciênc. Agrá.**, v.10, n.2, p.53–60, 2018.
- STANTON, T.B.; CANALE-PAROLA, E. *Treponema bryantii* sp. nov., a rumen spirochete that interacts with cellulolytic bacteria. **Archives of Microbiology**, v.127, p.145-156, 1980.
- SURKOV, A.V.; DUBININA, G.A.; LYSENKO, A.M.; GLOCKNER, F.O.; KUEVER, J. *Dethiosulfovibrio russensis* sp. nov., *Dethiosulfovibrio marinus* sp. nov. and *Dethiosulfovibrio acidaminovorans* sp. nov., novel anaerobic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacteria isolated from 'Thiodendron' sulfur mats in different saline environments. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.51, p.327–337, 2001.
- THAUER, R.K.; KASTER, A.K.; SEEDORF, H.; BUCKEL, W.; HEDDERICH, R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.6, p.579–591, 2008.
- VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S.; Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. cap. 6, p. 151-182.
- van GYLSWYK, N.O. 1990. Enumeração e identificação presuntiva de alguns grupos funcionais de bactérias no rúmen de vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de silagem de capim. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.73, p.243–261, 1990.
- WANG, C.; DONG, D.; WANG, H.; MÜLLER, K.; QIN, Y.; WANG, H.; WU, W. Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: new insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. **Biotechnology for biofuels**, v.9, n.1, p.22, 2016.
- WEIMER, P.J; MOEN, G.N. Quantitative analysis of growth and volatile fatty acid production by the anaerobic ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* T81. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, p.4075–4081, 2007.
- WRIGHT, A-DG. et al. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, p.1263– 1270, 2004.
- WU, S.; RANSOM, L.; BALDWIN, R.L.; LI, W.; LI, C.; CONNOR, E.E.; LI, R. W. The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. **Metagenomics**, v.1, p.1-11, 2012.

ARTIGO II: ESPÉCIES BACTERIANAS RUMINAIS DE NOVILHOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS DE OLEAGINOSAS

Resumo

O objetivo foi avaliar a diversidade das espécies bacterianas na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada do gene 16S rDNA, em resposta a dietas contendo grãos de oleaginosas (canola, caroço de algodão, girassol, soja) fornecidas aos bovinos. Foram utilizados seis novilhos cruzados, machos castrados, fistulados no rúmen, com peso médio de $416,33 \pm 93,30$ kg distribuídos em Quadrado Latino 6x6 (seis dietas e seis períodos), com períodos de 14 dias, sendo 13 dias de adaptação e 1 dia de coleta de amostras, totalizando 84 dias de ensaio, além do período pré-experimental de 30 dias em pastagem. As bactérias celulolíticas foram identificadas com predominância em todas as dietas, corresponderam a 47,75% na dieta caroço de algodão e 51,51% na dieta pastagem. As bactérias amilolíticas foram identificadas em todas as dietas, corresponderam a 62,51% na dieta girassol. As bactérias proteolíticas foram identificadas em todas as dietas, corresponderam a 65,96% na dieta girassol. As bactérias lácticas foram identificadas em todas as dietas, corresponderam a 0,92% na dieta silagem. A bactéria *Megasphaera elsdenii* foi identificada nas dietas, a maior diversidade dessa bactéria nas dietas padrão e pastagem reduziu a disponibilidade de hidrogênio no rúmen devido a produção de propionato e utilização do lactato. A alimentação com grãos de oleaginosas apresentou similaridade nas bactérias das dietas, indicando que a flora se altera em 47,51% com a mudança de alimentação.

Palavras-chave: bactéria, microbiota ruminal, sequenciamento 16S rDNA

***RUMINAL BACTERIAL SPECIES OF BEEF CATTLE FEED WITH DIFFERENT
OILSEEDS GRAINS***

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the bacterial species diversity in the solid fraction of the ruminal content, through the gene sequences of the conserved 16S rDNA region, in response to diets content oilseed grains (canola, cottonseed, sunflower, soybean) fed to the beef cattle. Were used six crossbred steers, castrated male, rumen fistulated, with a mean weight of 416.33 ± 93.30 kg were distributed in 6x6 Latin Square (six diets and six periods), with a period of 14 days, of which 13 days of adaptation and 1 day of sample collection, totaling 84 days of testing, in addition to the pre-experimental period in a 30-day pasture. Cellulolytic bacteria were identified with predominance in all diets, corresponding to 47.75% in the cottonseed diet and 51.51% in the pasture diet. The amylolytic bacteria were identified in all diets, corresponding to 62.51% in the sunflower diet. Proteolytic bacteria were identified in all diets, corresponding to 65.96% in the sunflower diet. Lactic bacteria were identified in all diets, *Megasphaera elsdenii* bacterium was identified in the diets, the greater diversity of this bacterium in the standard diets and pasture reduced the availability of hydrogen in the rumen due to propionate production and lactate utilization. Feeding with oilseeds showed similarity in the bacteria of the diets, indicating that the flora changes in 47.51% with the feeding change.

Keywords: bacterium, ruminal microbiota, sequencing 16S rDNA

Introdução

O ambiente ruminal é colonizado por milhares de micro-organismos que pertencem aos três domínios (WOESE et al., 1990): Bactérias (bactérias), *Archaea* (*archaea*) e Eucarya

(fungos e protozoários). As bactérias são altamente diversificadas e abundantes nos domínios do rúmen e representam aproximadamente 95% da microbiota total (FLINT et al., 2008).

As principais espécies de bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, que se associam às fibras dos alimentos e degradam particularmente celulose e hemicelulose, são *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, estas produzem como produto da fermentação, propionato, butirato, succinato, formato, dióxido de carbono, água e, principalmente, acetato (DEHORITY, 2003). As *Ruminococcus* são produtoras de hidrogênio (via acetato), o seu crescimento e conseqüentemente a degradação das fibras pode ser inibida pelo acúmulo de hidrogênio (JANSSEN, 2010; WOLIN, MILLER & STEWART, 1997).

As bactérias amilolíticas *Treponema bryantii* e *Treponema saccharophilum* atuam principalmente na fermentação de carboidratos não-estruturais (STANTON & CANALE-PAROLA, 1980), com a utilização de malto-oligossacarídeos (COTTA, 1992). *Ruminobacter amylophilus* é predominante no rúmen de bovinos alimentados com dieta rica em amido (HUNGATE, 1966), sendo a gama de substratos utilizados por esta bactéria limitado a amido, maltose e maltodextrinas (HAMLIN & HUNGATE, 1956), com atividade proteolítica.

As bactérias proteolíticas *Prevotella bryantii* e *Prevotella brevis* tem funções no rúmen de degradação e utilização do amido, degradação de polissacarídeos como xilanas e pectinas da parede celular de plantas, porém, não degradam celulose (COTTA, 1992; McALLISTER, 1990) e tem atividade proteolítica.

As espécies lácticas são compostas pela maioria dos *Lactobacillus* que são bactérias homofermentativas, podendo destacar *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus* que desempenham papel reconhecido como iniciadores na fermentação de vegetais (POT, 2008; POT & TSAKALIDOU, 2009). *Eubacterium pyruvativorans* é uma bactéria que tem crescimento rápido no piruvato (ATTWOOD et al., 1998), mesmo o piruvato

não tendo altas concentrações no fluido ruminal (WALLACE, 1978). *Megasphaera elsdenii* é a principal bactéria ruminal envolvida na via do acrilato convertendo o lactato em propionato e, na ausência de lactato, produzindo acetato e butirato, mas não propionato da glicose (HINO et al., 1994; RUSSELL & WALLACE, 1997).

A maior abundância das populações de bactérias envolvidas no metabolismo do propionato está associada à redução das emissões de metano em comparação com o metabolismo do acetato porque mais hidrogênio é utilizado para produção de ácidos graxo de cadeia curta, reduzindo assim a disponibilidade para a produção de metano (JANSSEN, 2010; WANAPAT et al., 2015).

Dessa forma, o uso de fontes de grãos de oleaginosas na nutrição animal é uma alternativa para melhorar a eficiência alimentar, reduzindo as perdas energéticas com a produção de metano através do consumo de hidrogênio pelo processo de biohidrogenação.

O estudo da abordagem metagenômica é uma ferramenta que permite avaliar a diversidade bacteriana, estudando o DNA total microbiano extraído diretamente do ambiente (HANDELSMAN, 2004). Utilizando a tecnologia de sequenciamento de DNA, a microbiota ruminal pode ser imediatamente investigado (BHATT et al., 2013). A caracterização da população de micro-organismos procaríotos é realizada através do sequenciamento do gene 16S rDNA, sendo possível estimar a diversidade e classificação filogenética, afim de identificar e quantificar organismos não cultivados (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; KANG et al., 2009).

Nesse sentido, objetivou-se utilizar a abordagem metagenômica para avaliar a diversidade das espécies bacterianas na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada 16S rDNA, em resposta a dietas formuladas com diferentes grãos de oleaginosas (canola, caroço de algodão, girassol, soja) fontes de ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3 e ômega-6).

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS (Protocolo nº654/2015).

O experimento foi realizado na Universidade Católica Dom Bosco e na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Animais, delineamento experimental

Foram utilizados seis novilhos cruzados, machos castrados, fistulados no rúmen, com peso médio de $416,33 \pm 93,30$ kg ao início do experimento os quais foram distribuídos em quadrado latino 6x6 (seis dietas e seis períodos). Os animais foram vacinados, vermifugados e alocados em baias individuais (18 m^2) com cobertura, tendo livre acesso a água e alimento. O experimento foi dividido em 6 períodos experimentais de 14 dias, sendo 13 dias de adaptação e 1 dia de coleta de amostras, totalizando 84 dias de ensaio. Foi adotado um período pré experimental de 30 dias em pastagem.

Caracterização da forragem

A forragem era composta pela gramínea *Brachiaria brizantha* cv. Marandu syn. *Urochloa brizantha* cv. Marandu. Para determinar a composição bromatológica da forragem, foram coletadas amostras, obtidas através do corte do material existente que ocupava a área de um quadrado ($0,25 \text{ m}^2$), arremessado, aleatoriamente, dentro da área, foram coletadas oito sub amostras, que posteriormente foram homogeneizadas formando uma amostra única. Em seguida retiraram-se as amostras para determinação da massa verde e seca, sendo essa, realizada após a secagem das amostras em estufa de circulação de ar forçada, com temperatura a 65°C

por 72 horas. Após a secagem, o material foi moído em moinho tipo Wiley equipado com peneira de malha com abertura de 1 mm para serem amostrados 2 g de massa seca e levado à estufa a 105° C, por 12 horas para se quantificar a segunda massa seca.

As amostras foram submetidas a análises laboratoriais para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB) segundo os métodos 930.15, 942.05 e 976.05 AOAC (2000), determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN) teor de fibra em detergente ácido (FDA) pelo método de Robertson & Van Soest (1985). Foram considerados os nutrientes (MS, MO, PB, FDN e FDA) com base na matéria seca (Tabela 1).

Tabela 8. Composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu syn. *Urochloa brizantha* cv. Marandu

	Folha verde	Colmo verde	Material morto	Planta inteira
MS (g/kg de MN)	397	344	349	366
MM (g/kg de MS)	9	9	8	9
PB (g/kg de MS)	100	75	48	79
FDN (g/kg de MS)	610	711	733	664

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro.

Caracterização das dietas

Foram avaliadas seis dietas (Tabela 2), sendo quatro contendo diferentes grãos de oleaginosas (caroço de algodão, canola, girassol e soja) visando obter 80g/kg de extrato etéreo na dieta, uma contendo ingredientes comumente utilizados no concentrado de bovinos com 30 g/kg de extrato etéreo, e outra apenas com volumoso (silagem de planta inteira de milho).

As amostras foram submetidas a análises laboratoriais para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo os métodos 930.15, 942.05, 976.05 e 920.39 AOAC (2000), determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN) de acordo com Mertens (2002) usando α -amylase (Termamyl 120 L®), teor de fibra em detergente ácido (FDA) pelo método de Robertson &

Van Soest (1985). Foram considerados os componentes dietéticos (MS, MO, PB, EE, FDN e FDA) fornecidos e contidos nas sobras (Consumo = g de nutriente fornecido – g de nutriente nas sobras) com base na matéria seca.

As dietas foram formuladas utilizando silagem de milho de planta inteira como volumoso, na proporção volumoso:concentrado de 40:60 com base na matéria seca, segundo NRC (2000) para obtenção de ganhos médios de 1,25 kg/dia para novilhos de corte cruzados com aproximadamente 400 kg de peso corporal. O fornecimento da dieta foi realizado uma vez ao dia, as 8.00 horas, de forma a manter as sobras em torno de 50 g/kg do fornecido, sendo realizado o ajuste de consumo diariamente, os grãos eram fornecidos inteiros. As dietas avaliadas foram: caroço de algodão (A), canola (C), girassol (G), padrão (PD), pastagem (P), soja (SO) e silagem (S).

Tabela 9. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais

	Dietas (g/kg de MS)					
	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Silagem de milho	950	400	400	400	400	400
Caroço de algodão	-	-	350	-	-	-
Canola	-	-	-	187	-	-
Girassol	-	-	-	-	132	-
Soja	-	-	-	-	-	245
Milho	-	383	170	288	290	305
Farelo de Soja	-	167	30	75	128	-
Amireia	-	20	20	20	20	20
Núcleo mineral	50	30	30	30	30	30
Composição bromatológica das dietas						
MS (g/kg de MN)	252	492	488	496	495	493
MO (g/kg de MS)	936	956	920	931	930	944
PB (g/kg de MS)	72	191	175	180	180	200
FDN (g/kg de MS)	630	389	497	422	434	375
FDA (g/kg de MS)	426	209	317	238	226	211
EE (g/kg de MS)	23	35	74	73	72	68

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo.

Coleta de material ruminal

No período pré-experimental de 30 dias a pasto foi realizada a coleta de conteúdo ruminal considerado como período 0. A coleta de amostras do conteúdo ruminal foi realizada no 14º dia experimental de cada período, antes do arraçamento dos animais, as 7:00 h, manualmente, através da cânula. Foram pesadas dez gramas da fração sólida e adicionados 10 ml de TBE (pH 7,4), agitou-se vigorosamente por 3 minutos (vórtex) e posteriormente o conteúdo foi filtrado em tecido com malha de 100 micras. O filtrado foi submetido à centrifugação de 13.000 RCF por 13 minutos a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento restante foi ressuspense em 0,8 ml de TE tampão Tris-EDTA (10X, pH 8,0). O conteúdo ressuspense foi centrifugado à 15.000 RCF por 11 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi armazenado sob refrigeração (-20°C).

Extração do DNA metagenômico

A obtenção do DNA metagenômico foi realizada no precipitado ressuspense obtido da fração sólida do conteúdo ruminal. Foram analisadas 42 amostras com o kit de extração QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (cat. no. 51604, Qiagen, Hilden, Germany). O total de DNA extraído do conteúdo ruminal foi quantificado em Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific®), e a qualidade do material genético foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Detecção do DNA metagenômico

As amostras de DNA metagenômico foram analisadas em eletroforese de cuba horizontal. Uma alíquota de 8 µl de cada amostra juntamente com 2 µl de tampão de carregamento [0,025% de azul de bromofenol p/v e 50% de glicerol v/v], foi disposta em gel

de agarose a 0,8% (p/v), previamente imerso em tampão TBE 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 80 volts.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 10 minutos, e logo após descorado por 15 minutos em água destilada. A visualização das bandas com perfil de DNA metagenômico e do produto de PCR foi feita sob luz UV e a imagem documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad - Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA).

As dimensões do DNA metagenômico e dos fragmentos amplificados foram comparados a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 1 kb e 1kb plus DNA Ladder, dispostos no gel juntamente com as amostras analisadas.

PCR do gene 16S rDNA

As amostras de DNA metagenômico extraídos foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pela empresa GenOne Soluções em Biotecnologia, através da região conservada do gene 16S rDNA. As ampliações por PCR foram realizadas em um volume final de 20 µl. A cada reação de amplificação foram incluídos um controle positivo, previamente testado, e um controle negativo (água ultrapura autoclavada).

Sequenciamento do gene 16S rDNA

As amostras foram sequenciadas em larga escala de DNA para empresa GenOne Soluções em Biotecnologia. A amplificação, assim como o sequenciamento das regiões V3-V4 (466 pb) do 16S rDNA foi realizada pela plataforma Illumina HiSeq (<http://www.genone.com.br/genomica/>), obtendo uma biblioteca genômica, processamento de dados, composição e abundância das espécies, complexidade e diferença de complexidade para cada amostra e *clustering* da composição de espécies para cada amostra e entre as amostras.

Análise dos dados do gene 16S rDNA

A análise dos dados subsequentes foi processada usando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). O QIIME é um programa livre baseado em *scripts Python* que permitem a classificação das sequências de 16S rDNA em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e, usando-as como base para construir árvores filogenéticas, plotar gráficos taxonômicos, construir redes de interação, calcular medidas de alfa e beta diversidade, entre outros (CAPORASO et al., 2010).

Dessa maneira, as OTU foram definidas por agrupamento a 97%, utilizando como referência o banco de dados de OTU mais recente do Greengenes com o método Uclust (EDGAR, 2010).

A estrutura geral da comunidade bacteriana de filo e gênero foram analisados utilizando gráfico de abundância relativa (FUKUYAMA et al., 2015).

Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do software STAMP utilizando o Teste Exato de Fisher com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,01$) (cobertura nominal de 95%) (PARKS et al., 2010).

Resultados

No diagrama de Venn (Figura 1), foram identificadas 2495 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU). Deste total foram identificados 1188 OTU compartilhadas entre todas as dietas, o que corresponde a uma taxa fixa de similaridade de 47,61%. Nas dietas padrão e canola houve 86 OTU compartilhadas; entre as dietas padrão e girassol foram 42 OTU compartilhadas; nas dietas padrão e caroço de algodão foram 69 OTU compartilhadas; nas dietas canola e caroço de algodão foram 74 OTU compartilhadas; entre as dietas canola e girassol foram 62 OTU compartilhadas; e entre as dietas girassol e caroço de algodão foram 41 OTU compartilhadas.

A comunidade bacteriana pouco se alterou com a mudança de dieta ou mesmo com a inclusão dos diferentes grãos de oleaginosas (Figura 1).

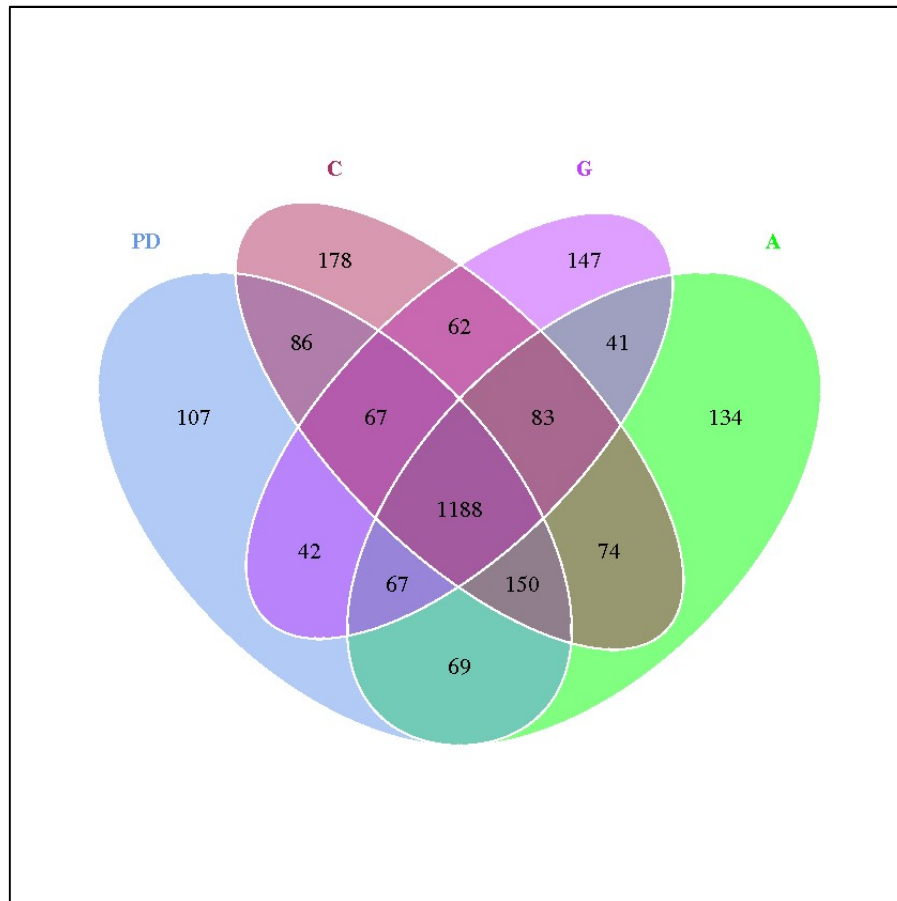


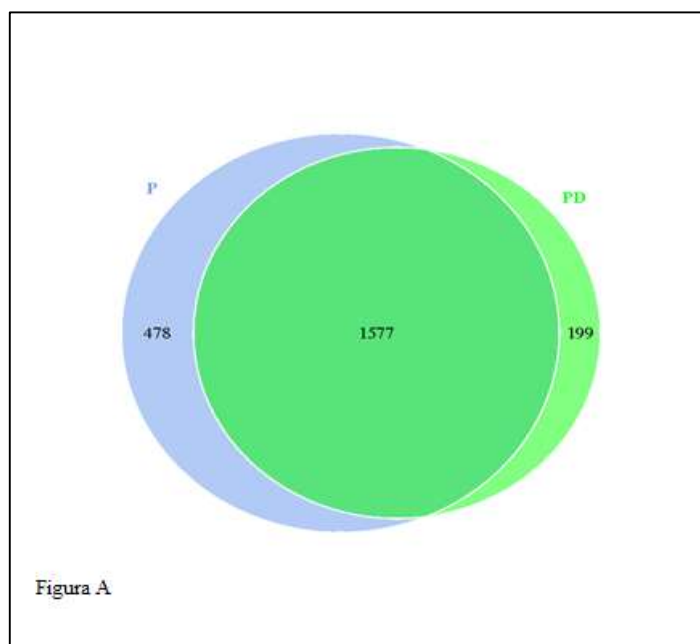
Figura 4. Diagrama de Venn representando o número de OTU de bactérias. Os valores representam o número de OTU compartilhados e não compartilhados entre as dietas analisadas referente ao conteúdo ruminal. PD: padrão; A: caroço de algodão; C: canola; G: girassol.

As dietas padrão e canola compartilharam exclusivamente 3,45% das espécies de bactérias; as dietas padrão e girassol compartilharam exclusivamente 1,68% das espécies de bactérias; as dietas padrão e caroço de algodão compartilharam exclusivamente 2,76% das espécies de bactérias; as dietas canola e caroço de algodão compartilharam exclusivamente 2,96% das espécies de bactérias; as dietas canola e girassol compartilharam exclusivamente 2,48% das espécies de bactérias; as dietas girassol e caroço de algodão compartilharam exclusivamente 1,64% das espécies de bactérias, dessa forma, sugere-se que espécies de

bactérias pouco se alteraram em razão da mudança das dietas, devido à similaridade entre a composição bromatológica das mesmas.

No diagrama de Venn (Figura 2), há uma sobreposição de bactérias entre as dietas analisados. Nas dietas pastagem e padrão há 1577 OTU compartilhadas; nas dietas silagem e padrão há 1481 OTU compartilhadas; nas dietas silagem, pastagem e padrão há 1379 OTU compartilhadas, sugerindo que a comunidade bacteriana presente nessa sobreposição provavelmente não se altere com a mudança de dieta.

As dietas pastagem e padrão compartilham de 69,96% das bactérias; as dietas silagem e padrão compartilham 66,71% das bactérias; as dietas pastagem, silagem e padrão compartilham 56,24% das bactérias. Essa análise ressalta que independente da dieta adotada, as bactérias presentes alteram na média de 35,69% considerando todas as dietas.



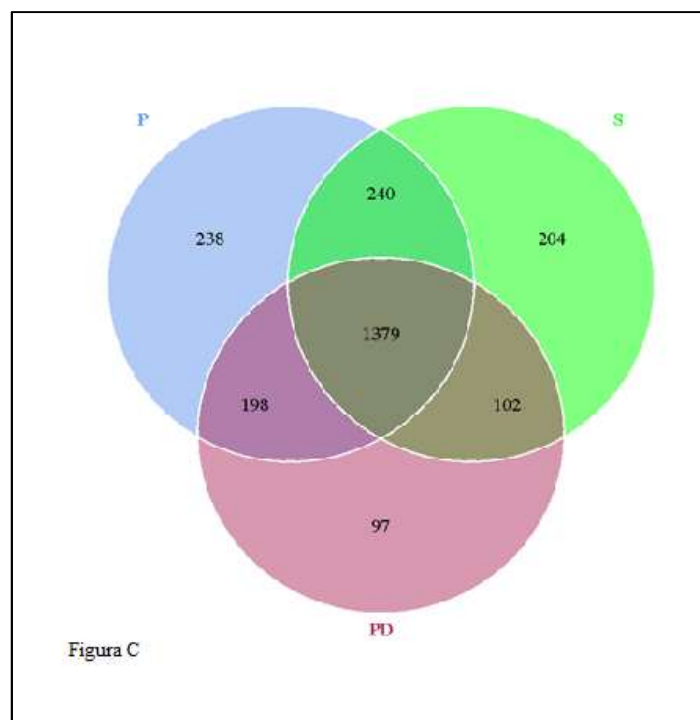
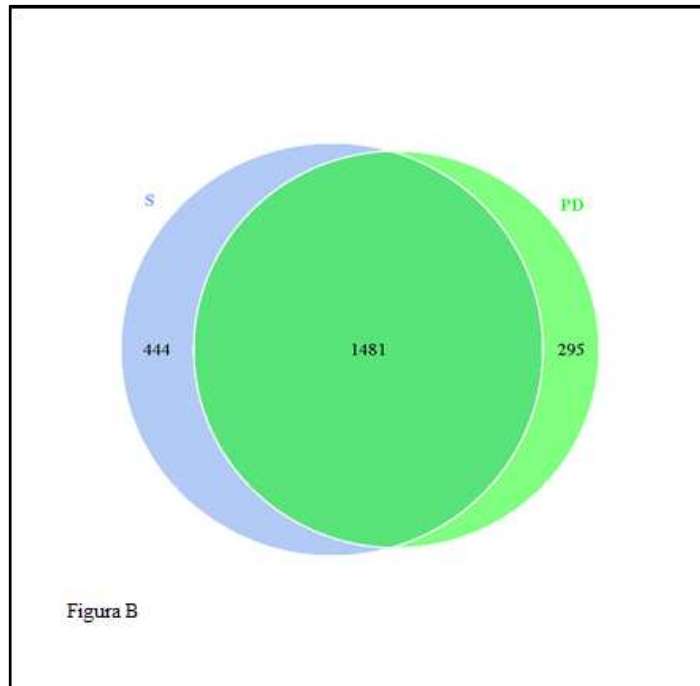


Figura 5. Diagrama de Venn representando o número de OTU de bactérias. Os valores representam o número de OTU compartilhados e não compartilhados entre as dietas analisadas referentes ao conteúdo ruminal.

Figura A: OTU compartilhadas entre as dietas pastagem e padrão.

Figura B: OTU compartilhadas entre as dietas silagem e padrão.

Figura C: OTU compartilhadas entre as dietas pastagem, padrão e silagem.

P: pastagem; S: silagem; PD: padrão.

Quando faz a comparação entre as dietas pastagem e padrão, observa-se um total de 2254 OTU, dessas, 21,20% presentes na dieta pastagem e, 8,82% presentes na dieta padrão. A maior diversidade encontrada na dieta pastagem é esclarecido pela presença de bactérias celulolíticas. Na comparação das dietas silagem e padrão, observa-se um total de 2220 OTU, dessas, 20% presentes na dieta silagem e, 13,28% presentes na dieta padrão. Na comparação das três dietas observa-se um total de 2466 OTU, dessas, 9,65% presentes na dieta pastagem, 8,27% presentes na dieta silagem, 3,93% presentes na dieta padrão, considerando as interações, 4,13% nas dietas padrão + silagem, 9,73% nas dietas pastagem + silagem, 8,02% nas dietas pastagem + padrão.

Foram identificadas cento e cinquenta estirpes de bactérias, que corresponderam a 10,84%, outras bactérias não foram identificadas pelo banco de dados, que correspondeu a 89,16%. Dentre as bactérias identificadas, classificamos conforme a especificidade de cada, celulolíticas, amilolíticas, proteolíticas e lácticas (Tabela 3).

Foram identificadas as seguintes bactérias celulolíticas: *Prevotella ruminicola* (gênero *Prevotella*), *Ruminococcus albus* (gênero *Ruminococcus*), *Ruminococcus flavefaciens* (gênero *Ruminococcus*), *Butyrivibrio fibrisolvens* (gênero *Butyrivirio*), *Butyrivibrio fibrisolvens* (gênero *Pseudo Butyrivirio*), *Rumen bacterium NK4B29* (gênero *Ruminococcus*), *Clostridium papyrosolvens* (gênero *Lachnospiraceae*), *Eubacterium uniforme* (gênero *Lachnospiraceae*) e *Eubacterium* sp. F1 (gênero *Rikenellaceae*). As bactérias celulolíticas foram identificadas nas dietas nas seguintes proporções: 51,51% na dieta pastagem; 35,95% na dieta silagem; 31,93% na dieta padrão; 47,75% na dieta caroço de algodão; 34,34% na dieta canola; 24,03% na dieta girassol e 24,02% na dieta soja.

Foram identificadas as seguintes bactérias amilolíticas: *Treponema bryantii*, *Treponema saccharophilum*, do gênero *Treponema*, *Ruminobacter amylophilus* (gênero *Ruminobacter*) e *Prevotella ruminicola* (gênero *Prevotella*). As bactérias amilolíticas foram identificadas nas

seguintes proporções: 20,07% na dieta pastagem; 30,27% na dieta silagem; 34,40% na dieta padrão; 27,24% na dieta caroço de algodão; 34,72% na dieta canola; 62,51% na dieta girassol e 20,45% na dieta soja.

Tabela 10. Espécies bacterianas identificadas pelo sequenciamento

	Pastagem	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja	
Celulolíticas	<i>Prevotella ruminicola</i>	4,16%	5,44%	14,37%	13,57%	12,62%	14,17%	9,46%
	<i>Ruminococcus albus</i>	2,71%	3,88%	2,70%	11,16%	4,24%	3,27%	4,22%
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	17,10%	15,83%	6,45%	11,25%	7,15%	3,80%	5,13%
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	3,33%	0,20%	0,19%	0,66%	0,27%	0,08%	0,14%
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	23,59%	8,57%	7,54%	10,87%	9,55%	2,52%	4,67%
	<i>Rumen bacterium NK4B29</i>	0,12%	0,04%	0,01%	0,03%	0,04%		0,01%
	<i>Clostridium papyrosolvans</i>	0,03%	0,23%		0,01%	0,01%	0,01%	
	<i>Eubacterium uniforme</i>	0,35%	0,71%	0,33%	0,16%	0,27%	0,14%	0,18%
	<i>Eubacterium sp. FI</i>	0,11%	1,04%	0,36%	0,03%	0,20%	0,03%	0,21%
Amilolíticas	<i>Treponema bryantii</i>	14,68%	15,36%	17,18%	9,76%	8,88%	0,90%	3,93%
	<i>Prevotella ruminicola</i>	4,16%	5,44%	14,37%	13,57%	12,62%	14,17%	9,46%
	<i>Treponema saccharophilum</i>	0,05%		0,10%	0,03%	0,15%	0,10%	0,79%
	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	1,18%	9,47%	2,75%	3,88%	13,07%	47,34%	6,27%
Proteolíticas	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	23,59%	8,57%	7,54%	10,87%	9,55%	2,52%	4,67%
	<i>Prevotella ruminicola</i>	4,16%	5,44%	14,37%	13,57%	12,62%	14,17%	9,46%
	<i>Ruminobacter amylophilus</i>	1,18%	9,47%	2,75%	3,88%	13,07%	47,34%	6,27%
	<i>Prevotella bryantii</i>	0,12%	0,52%	0,54%	0,76%	0,38%	1,23%	2,59%
	<i>Prevotella albensis</i>	0,55%	0,16%	0,38%	1,20%	0,30%	0,68%	0,91%
	<i>Prevotella brevis</i>			0,05%	0,02%	0,05%	0,02%	0,01%
	<i>Prevotella nigrescens</i>		0,24%					
Láticas	<i>Lactobacillus agilis</i>	0,01%						
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	0,05%	0,27%	0,13%	0,02%	0,02%	0,01%	0,04%
	<i>Lactobacillus fermentum</i>						0,01%	0,02%
	<i>Lactobacillus aviarius</i>		0,14%					
	<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,07%	0,43%	0,10%	0,09%	0,07%	0,03%	0,05%
	<i>Lactobacillus murinus</i>	0,01%			0,02%			
	<i>Lactobacillus salivarius</i>		0,06%			0,01%	0,00%	0,01%
	<i>Lactobacillus pentosus</i>							0,31%
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	0,05%	0,01%	0,06%	0,10%	0,03%	0,02%	0,03%
	<i>Eubacterium pyruvativorans</i>			0,01%				0,02%
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>			0,01%		0,02%		

Foram identificadas as seguintes bactérias proteolíticas: *Butyrivibrio fibrisolvens* (gênero *Pseudo Butyrivibrio*), *Ruminobacter amylophilus* (gênero *Ruminobacter*), *Prevotella*

albensis, *Prevotella brevis*, *Prevotella bryantii*, *Prevotella nigrescens* e *Prevotella ruminicola*, do gênero *Prevotella*. As bactérias proteolíticas foram identificadas nas seguintes proporções: 29,6% na dieta pastagem; 24,40% na dieta silagem; 25,63% na dieta padrão; 30,30% na dieta caroço de algodão; 35,97% na dieta canola; 65,96% na dieta girassol e 23,91% na dieta soja.

Foram identificadas as seguintes bactérias lácticas: *Lactobacillus agilis*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus aviarius*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus salivarius*, do gênero *Lactobacillus*, *Megasphaera elsdenii* (gênero *Megasphaera*), *Eubacterium pyruvativorans* (gênero *Eubacterium*) e *Pediococcus pentosaceus* (gênero *Pediococcus*). As bactérias lácticas foram identificadas nas seguintes proporções: 0,20% na dieta pastagem; 0,92% na dieta silagem; 0,29% na dieta padrão; 0,22% na dieta caroço de algodão; 0,14% na dieta canola; 0,08% na dieta girassol e 0,50% na dieta soja.

Foram identificadas outras bactérias com especificidades não descritas acima: *Synergites jonesii* (gênero *Synergistes*, redução de piridinodiol); *Acetobacter pasteurianus* (gênero *Acetobacter*, produção de ácido acético); *Selenomonas bovis* (gênero *Selenomonas*, produção de succinato); *Clostridium amilophilum* (gênero *Lachnoclostridium*, produção de amônia); *Brevundimonas diminuta* (gênero *Brevundimonas*, transforma etanol em ácido); *Sporomusa malonica* (gênero *Sporomusa*, homoacetogênica); *Succiniclasicum ruminis* (gênero *Succiniclasicum*, produção de succinato, utilização de açúcares e ureolítica); *Craurococcus roseus* (gênero *Craurococcus*, redução de nitrato) e *Kandleria vitulina* (gênero *Kandleria*, produção de açúcares). As bactérias foram identificadas nas seguintes proporções: 9,98% na dieta pastagem; 17,12% na dieta silagem; 13,01% na dieta padrão; 23,63% na dieta caroço de algodão; 9,09% na dieta canola; 11,06% na dieta girassol e 8,79% na dieta soja.

Algumas bactérias identificadas realizam mais de uma função, o que irá determinar a especificidade é a condição microbiana ruminal e a dieta fornecida aos animais. Foram essas

bactérias: *Prevotella ruminicola* (gênero *Prevotella*, celulolítica, amilolítica e proteolítica), *Ruminobacter amylophilus* (gênero *Ruminobacter*, proteolítica e amilolítica), *Butyrivibrio fibrisolvens* (gênero *Pseudo Butyrivibrio*, celulolítica e proteolítica), *Treponema saccharophilum* (gênero *Treponema*, amilolítica e pectinolítica), *Treponema bryantii* (gênero *Treponema*, amilolítica, sacarolítica e interage com celulolíticas), *Megasphaera elsdenii* (gênero *Megasphaera*, produção de acrilato, acetato, buritato e succinato, láctica, utilização de açúcares e ureolítica), *Lactobacillus fermentum* (gênero *Lactobacillus*, utilização de açúcares) e *Eubacterium pyruvativorans* (gênero *Eubacterium*, produção de piruvato e láctica).

Além dessas bactérias citadas, foram encontradas outras com funções desconhecidas até o momento na literatura; foram encontradas também outras bactérias não pertencentes ao ambiente ruminal e a causa de identificação nesse ambiente ainda não é conhecida, dentre elas: bactérias patogênicas (*Propionibacterium granulosum*, *Ralstonia pickettii* e *Serratia marcescens*); bactérias que causam doenças em humanos (*Rhodococcus hoagii*, *Aeromonas caviae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Gallibacterium salpingitidis* e *Pseudomonas monteilli*); bactérias encontradas na água (*Paladibaculum fermentans*, *Pseudoclavibacter caeni*, *Bacterium enrichment culture clone R4-41B*, *Methylobacterium aquaticum*); bactérias encontradas em plantas (*Pseudoxanthomonas suwonensis* e *Sphingomonas melonis*); bactérias que causam doenças em ruminantes (*Dietzia maris*, *Micrococcus luteus*, *Prevotella heparinolytica* e *Bibersteinia trehalosi*).

Discussão

Os índices de diversidade demonstraram que a microbiota bacteriana ruminal é bastante rica e diversa, com descrição das comunidades a partir do número das sequências obtidas. Isto demonstra efetivamente o poder da técnica metagenômica associada ao sequenciamento do

gene 16S rDNA para descrever a comunidade bacteriana, a qual não seria revelada pelas técnicas tradicionais de cultivo bacteriano na microbiologia.

Através da análise de diversidade, foi possível identificar que as bactérias sofreram alteração média de 47,61% nas dietas avaliadas e a dieta pastagem apresentou maior diversidade em relação as demais dietas, essa diversidade é referente as bactérias celulolíticas. A dieta é provavelmente o fator mais importante que influencia o número e a proporção relativa das diferentes espécies de micro-organismos ruminais (VALADARES FILHO & PINA, 2006). A mudança na população é resultante da mudança na dieta do ruminante (TEIXEIRA, 1992) sendo que a mudança na dieta impõe ao animal um período de transição na população microbiana do rúmen, com alterações nas proporções entre as distintas espécies para dar um novo equilíbrio e promover uma melhor adaptação à nova dieta (WILLIAMS, 1986), o período de adaptação utilizado no experimento foi de treze dias sendo recomendado pela literatura (LLOYD et al., 1956).

A variação da diversidade dos micro-organismos do rúmen também varia conforme a fase do crescimento microbiano e a disponibilidade de nutrientes (OWENS & GOETSCH, 1988), essa variação também ocorre de acordo com o horário em que a amostragem é realizada (CECAVA et al., 1990). As variações na composição das bactérias ruminais podem ainda ser atribuídas às diferenças entre técnicas de isolamento e de determinação da composição das bactérias, podem ocorrer diferenças significativas na composição das bactérias isoladas em animais alimentados com diferentes dietas (CLARK et al., 1992).

As bactérias celulolíticas foram identificadas em 47,75% na dieta caroço de algodão e 51,51% na dieta pastagem, isso ocorreu devido ao teor de FDN analisado (Tabela 1). As bactérias amilolíticas foram identificadas em 62,51% na dieta girassol, isso ocorreu provavelmente devido ao teor de amido na dieta. A bactéria *Ruminobacter amylophilus* foi identificada com 47,34%, essa bactéria realiza as funções de proteolítica e amilolítica. As

bactérias proteolíticas foram identificadas em 65,96% na dieta girassol, isso ocorreu provavelmente devido ao teor de amido na dieta. A bactéria *Ruminobacter amylophilus* foi identificada com 47,34% na dieta girassol, essa bactéria realiza as funções de proteolítica e amilolítica. observou-se 29,60% na dieta pastagem, isso ocorreu devido presença da bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*, essa bactéria realiza as funções de celulolítica e proteolítica.

As bactérias lácticas foram identificadas em 0,92% na dieta silagem, essa quantidade foi três vezes maior que nas demais dietas, isso provavelmente ocorreu devido aos teores de lactato presentes na dieta. O processo de ensilagem produz ácidos orgânicos, destacam-se, para avaliação da qualidade do processo fermentativo, o ácido láctico, acético, butírico e propiônico (TOMICICH et al., 2003). Foi identificada a bactéria *Megasphaera elsdenii* (dieta pastagem 5%; dieta silagem 0,1%; dieta padrão 0,06%; dieta caroço de algodão 0,10%; dieta canola 0,30%; dieta girassol 0,02% e dieta soja 0,03%), sugere-se que a maior diversidade dessa bactéria nas dietas padrão e pastagem reduziu a disponibilidade de hidrogênio no rúmen devido a produção de propionato e utilização do lactato.

Conclusão

A alimentação com grãos de oleaginosas apresentou similaridade nas bactérias das dietas, indicando que a flora se altera em 47,51% com a mudança de alimentação. As bactérias celulolíticas foram identificadas em grande quantidade nas dietas pastagem e caroço de algodão. As bactérias amilolíticas e proteolíticas foram identificadas em grande quantidade na dieta girassol. As bactérias lácticas foram identificadas em grande quantidade na dieta silagem.

Agradecimentos

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e

Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (**Fundect**) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Referências

- Association of Official Analytical Chemists - AOAC., 2000. **Official methods of analysis**. 13.ed. Washington: AOAC.
- ATTWOOD, G.T.; KLIEVE, A.V.; OUWERKERK, D.; PATEL, B.K.C. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. **Appl Environ Microbiol.**, v.64, p.1796–1804, 1998.
- BHATT, V.D.; DANDE, S.S.; PATIL, N.V.; JOSHI, C.G. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Molecular Biology Reports**, v.40, p.3363–3371, 2013. doi: 10.1007/s11033-012-2411-4 PMID: 23277394
- CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PENA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MC DONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v.7, n.5, p.335-336, 2010.
- CECAVA, M.J.; MERCHEN, N.R.; GAY, L.C. et al. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.9, p.2480-2488, 1990.
- CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.E.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.8, p.2304-2323, 1992.
- COTTA, M.A. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.48-54, 1992.
- DEHORITY, B. A. Microbial interactions in the rumen. **Revista de La Facultad de Agronomía Luz**, v.15, p.69-86. 1998.
- EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v.26, n.19, p.2460-2461, 2010.
- FLINT, H.J.; BAYER, E.A.; RINCON, M.T.; LAMED, R.; WHITE, B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.2, p.121-131, 2008.
- HAMLIN, L.J.; HUNGATE, R.E. Culture and physiology of a starch-digesting bacterium (*Bacteroides amylophilus* n. sp.) from the bovine rumen. **Journal of bacteriology**, v.72, n.4, p.548, 1956.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Ver**, v.68, p.669–685, 2004.
- HINO, T.; SHIMADA, K.; MARUYAMA, T. Substrate preference in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, p.1827–1831, 1994.
- HUNGATE, R.E. 1966. **The rumen and its microbes**. Academic Press, New York. 533p.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2014). **Climate Change 2014**. Synthesis report 2014.

- JANSSEN, P.H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Anim Feed Sci Technol.**, v.160, p.1–22, 2010.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.73, p.2483-2492, 1995.
- KANG, S.; DENMAN, S. E.; McSWEENEY, C. S. The use of molecular tools for the study of rumen ecology. In: Simpósio internacional avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes, 2. Pirassununga. **Anais...** p.179-194, 2009.
- LLOYD, L.E.; ECKHAM, H.E.P.; CRAMPTON, E.W. The effect of change of the ration on the required length of preliminary feeding período in digestion trials with sheep. **Journal of Animal Science**, v.15, n.3, p.846-853, 1956.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.
- McALLISTER, T.A.; CHENG, K.J.; RODE, L.M.; FORSBERG, C.W. Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3146-3153, 1990.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- NRC. (2000). **Nutrient Requirements of Beef Cattle**, 7th rev. edn. Natl. Acad. Press, Washington, DC, USA.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. **Ruminal fermentation**. In: CHURCH, D.C. (Ed) *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. Waveland Press, 1988. p.145-171.
- PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v.26, n.6, p.715-721, 2010.
- POT, B. 2008. **The taxonomy of lactic acid bacteria**. In: Corrieu, G., Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques e de la gé'ne'tique aux ferments*. Lavoisier, Paris.
- POT, B.; TSAKALIDOU, E. 2009. **Taxonomy and metabolism of Lactobacillus**. In: Ljungh, A., Wadstro"m, T. (Eds.), *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 3e58.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. 1985. **Analysis of forages and fibrous foods - a laboratory manual for animal science**. Ithaca.
- RUSSELL, J.B.; WALLACE, R.J. (1997). **Energy-yielding and energy-consuming reactions**, in *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd Edn, eds P. J. Hobson and C. S. Stewart (London: Blackie Acad. Profess), 246–282.
- STANTON, T.B.; CANALE-PAROLA, E. *Treponema bryantii* sp. nov., a rumen spirochete that interacts with cellulolytic bacteria. **Archives of Microbiology**, v.127, p.145-156, 1980.
- TEIXEIRA, J. C. *Nutrição de ruminantes*. Lavras: FAEPE, 1992. 239p.
- TOMICH, T.R. et al. **Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 20 p. (Série Documentos da EMBRAPA).
- VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S.; *Fermentação ruminal*. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: FUNEP, 2006. cap. 6, p. 151-182.
- WALLACE, R.J. Control of lactate production by *Selenomonas ruminantium*: homotropic activation of lactate dehydrogenase by pyruvate. **J Gen Microbiol.**, v.107, p.45–52, 1978.
- WILLIAMS, A. G. Rumen holotricha ciliate protozoa. **Microbiological Reviews**, v.50, n.1, p.25-49, 1986.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.87(12), p.4576-4579, 1990.

WOLIN, M.J.; MILLER, T.L.; STEWART, C.S. 1997. **Microbe–microbe interactions**. In *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 467–491 [PN Hobson and CS Stewart, editors]. London: Chapman and Hall.

ARTIGO III: ARCHAÉAS METANOGÊNICAS DE NOVILHOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES GRÃOS DE OLEAGINOSAS

Resumo

O objetivo foi avaliar a diversidade de *archaeas* metanogênicas na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada do gene 16S rDNA, em resposta a dietas contendo grãos de oleaginosas (canola, caroço de algodão, girassol, soja) fornecidas aos bovinos. Foram utilizados seis novilhos cruzados, machos castrados, fistulados no rúmen, com peso médio de $416,33 \pm 93,30$ kg distribuídos em Quadrado Latino 6x6 (seis dietas e seis períodos), com períodos de 14 dias, sendo 13 dias de adaptação e 1 dia de coleta de amostras, totalizando 84 dias de ensaio, além do período pré-experimental de 30 dias em pastagem. A análise da diversidade da ordem e da família identificou Methanobacteriales e Thermoplasmatales em todas as dietas. A análise da diversidade do gênero identificou *Methanobrevibacter* e *Candidatus methanomethylophilus* em todas as dietas. A análise de diversidade das espécies identificou *Methanobrevibacter ruminantium* em todas as dietas (pastagem com 0,02%, silagem com 0,06%, padrão com 0,18%, caroço de algodão com 0,36%, canola com 0,48%, girassol com 0,31% e soja com 0,23%). Na dieta soja foram identificadas poucas *archaeas* metanogênicas, diferindo das demais dietas, sendo uma alternativa para a alimentação de bovinos em função de seu baixo potencial de perdas energéticas com a produção de metano. Na dieta pastagem foram identificadas poucas *archaeas* metanogênicas confirmando que em áreas de pastagem onde o manejo é realizado de acordo com a recomendação forrageira, o potencial poluente é reduzido.

Palavras-chave: ácido graxo poli-insaturado, canola, caroço de algodão, girassol, oleaginosas, soja grão, metanogênese

***METHANOGENIC ARCHAEAS OF BEEF CATTLE FEED WITH DIFFERENT
OILSEEDS GRAINS***

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the diversity of methanogenic *archaeas* in the solid fraction of the ruminal content, through the gene sequences of the conserved 16S rDNA region, in response to diets content oilseed grains (canola, cottonseed, sunflower, soybean) fed to the beef cattle. Were used six crossbred steers, castrated male, rumen fistulated, with a mean weight of 416.33 ± 93.30 kg were distributed in 6x6 Latin Square (six diets and six periods), with a period of 14 days, of which 13 days of adaptation and 1 day of sample collection, totaling 84 days of testing, in addition to the pre-experimental period in a 30-day pasture. Analysis of order and family diversity identified Methanobacteriales and Thermoplasmatales in all diets. Analysis of the diversity of the genus identified *Methanobrevibacter* and *Candidatus methanomethylophilus* in all diets. The diversity analysis of the species identified *Methanobrevibacter ruminantium* in all diets (0.02% pasture, 0.06% silage, 0.18% standard, 0.36% cotton seed, 0.48% , sunflower with 0.31% and soybean with 0.23%). In the soybean diet, few methanogenic *archaeas* were identified, differing from the other diets, being an alternative for the feeding of cattle due to their low potential of energy losses with the production of methane. In the pasture diet, few methanogenic *archaeas* have been identified confirming that in pasture areas where management is carried out according to the forage recommendation, the pollutant potential is reduced.

Keywords: polyunsaturated fatty acid, canola, cottonseed, sunflower, oilseeds, soybean grain, methanogenesis

Introdução

Nos ruminantes, a produção de metano entérico é o resultado da redução de dióxido de carbono pela *archaea* metanogênica que utiliza o hidrogênio resultante da fermentação microbiana anaeróbica (LETTAT, HASSANAT & BENCHAAAR, 2013).

O metano tem um grande impacto no aquecimento global, sendo 28 vezes mais potente como um gás do efeito estufa do que o dióxido de carbono (IPCC, 2014). Um número limitado de *archaeas* metanogênicas dentro do filo Euryarchaeota são produtores de metano e os genes envolvidos nesse processo são bem caracterizados (THAUER et al., 2008; LEAHY et al., 2010; BORREL et al., 2013). A via que catalisa a conversão de dióxido de carbono em metano é dominante no rúmen (HOOK et al., 2010; DANIELSSON et al., 2017).

Dessa forma, os grãos de oleaginosas são utilizados em dietas para ruminantes pelas altas concentrações de lipídeos, bem como pela composição de ácidos graxos, ricos em ácidos insaturados (ômega 3 e ômega 6), e por apresentarem lenta liberação do óleo, decorrente da ruminação, proporcionando a chegada de pequenas frações ao ambiente ruminal (COPPOCK & WILKS, 1991). O incremento de gorduras, óleos e grãos de oleaginosas na dieta é possível reduzir a produção de metano entérico, auxiliando na mitigação de gases de efeito estufa (BODAS et al., 2012; HRISTOV et al., 2013) e interferir na diversidade da população bacteriana com o consumo de hidrogênio pelo processo de biohidrogenação.

O processo de biohidrogenação é responsável pelo aumento na produção de ácidos graxos saturados que chega ao duodeno dos ruminantes e também pela síntese ruminal de ácido linoleico conjugado e de ácido vacênico. Na literatura existem diversos trabalhos que relatam o uso de energia como estratégia eficaz na redução de metano (O'HARA et al., 2003; LOVETT et al., 2005).

A abordagem metagenômica é uma ferramenta que permite avaliar a diversidade bacteriana, estudando o DNA total microbiano extraído diretamente do ambiente

(HANDELSMAN, 2004). Utilizando a tecnologia de sequenciamento de DNA, a microbiota ruminal pode ser imediatamente investigada (BHATT et al., 2013). A caracterização da população de micro-organismos procariotos é realizada através do sequenciamento do gene 16S rDNA, sendo possível estimar a diversidade e classificação filogenética, afim de identificar e quantificar organismos não cultivados (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; KANG et al., 2009) e os possíveis efeitos de ambiente na população, tais como efeitos de dietas.

Nesse sentido, objetivou-se utilizar a abordagem metagenômica para avaliar a diversidade de *archaeas* metanogênicas na fração sólida do conteúdo ruminal, através das sequências gênicas da região conservada 16S rDNA, em resposta a dietas formuladas com diferentes grãos de oleaginosas (canola, caroço de algodão, girassol, soja) fontes de ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3 e ômega-6).

Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS (Protocolo nº654/2015).

O experimento foi realizado na Universidade Católica Dom Bosco e na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Animais, delineamento experimental

Foram utilizados seis novilhos cruzados, machos castrados, fistulados no rúmen, com peso médio de $416,33 \pm 93,30$ kg ao início do experimento os quais foram distribuídos em quadrado latino 6x6 (seis dietas e seis períodos). Os animais foram vacinados, vermifugados e alocados em baias individuais (18 m^2) com cobertura, tendo livre acesso a água e alimento. O

experimento foi dividido em 6 períodos experimentais de 14 dias, sendo 13 dias de adaptação e 1 dia de coleta de amostras, totalizando 84 dias de ensaio. Foi adotado um período pré experimental de 30 dias em pastagem.

Caracterização da forragem

A forragem era composta pela gramínea *Brachiaria brizantha* cv. Marandu syn. *Urochloa brizantha* cv. Marandu. Para determinar a composição bromatológica da forragem, foram coletadas amostras, obtidas através do corte do material existente que ocupava a área de um quadrado (0,25 m²), arremessado, aleatoriamente, dentro da área, foram coletadas oito sub amostras, que posteriormente foram homogeneizadas formando uma amostra única. Em seguida retiraram-se as amostras para determinação da massa verde e seca, sendo essa, realizada após a secagem das amostras em estufa de circulação de ar forçada, com temperatura a 65°C por 72 horas. Após a secagem, o material foi moído em moinho tipo Wiley equipado com peneira de malha com abertura de 1 mm para serem amostrados 2 g de massa seca e levado à estufa a 105° C, por 12 horas para se quantificar a segunda massa seca.

As amostras foram submetidas a análises laboratoriais para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB) segundo os métodos 930.15, 942.05 e 976.05 AOAC (2000), determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN) teor de fibra em detergente ácido (FDA) pelo método de Robertson & Van Soest (1985). Foram considerados os nutrientes (MS, MO, PB, FDN e FDA) com base na matéria seca (Tabela 1).

Tabela 11. Composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu syn. *Urochloa brizantha* cv. Marandu

	Folha verde	Colmo verde	Material morto	Planta inteira
MS (g/kg de MN)	397	344	349	366
MM (g/kg de MS)	9	9	8	9
PB (g/kg de MS)	100	75	48	79
FDN (g/kg de MS)	610	711	733	664

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro.

Caracterização das dietas

Foram avaliadas seis dietas (Tabela 2), sendo quatro contendo diferentes grãos de oleaginosas (caroço de algodão, canola, girassol e soja) visando obter 80g/kg de extrato etéreo na dieta, uma contendo ingredientes comumente utilizados no concentrado de bovinos com 30 g/kg de extrato etéreo, e outra apenas com volumoso (silagem de planta inteira de milho).

As amostras foram submetidas a análises laboratoriais para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo os métodos 930.15, 942.05, 976.05 e 920.39 AOAC (2000), determinação do teor de fibra em detergente neutro (FDN) de acordo com Mertens (2002) usando α -amylase (Termamyl 120 L®), teor de fibra em detergente ácido (FDA) pelo método de Robertson & Van Soest (1985). Foram considerados os componentes dietéticos (MS, MO, PB, EE, FDN e FDA) fornecidos e contidos nas sobras (Consumo = g de nutriente fornecido – g de nutriente nas sobras) com base na matéria seca.

As dietas foram formuladas utilizando silagem de milho de planta inteira como volumoso, na proporção volumoso:concentrado de 40:60 com base na matéria seca, segundo NRC (2000) para obtenção de ganhos médios de 1,25 kg/dia para novilhos de corte cruzados com aproximadamente 400 kg de peso corporal. O fornecimento da dieta foi realizado uma vez ao dia, as 8.00 horas, de forma a manter as sobras em torno de 50 g/kg do fornecido, sendo realizado o ajuste de consumo diariamente, os grãos eram fornecidos inteiros. As dietas avaliadas foram: caroço de algodão (A), canola (C), girassol (G), padrão (PD), pastagem (P),

soja (SO) e silagem (S).

Tabela 12. Ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais

	Dietas (g/kg de MS)					
	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Silagem de milho	950	400	400	400	400	400
Caroço de algodão	-	-	350	-	-	-
Canola	-	-	-	187	-	-
Girassol	-	-	-	-	132	-
Soja	-	-	-	-	-	245
Milho	-	383	170	288	290	305
Farelo de Soja	-	167	30	75	128	-
Amireia	-	20	20	20	20	20
Núcleo mineral	50	30	30	30	30	30
Composição bromatológica das dietas						
MS (g/kg de MN)	252	492	488	496	495	493
MO (g/kg de MS)	936	956	920	931	930	944
PB (g/kg de MS)	72	191	175	180	180	200
FDN (g/kg de MS)	630	389	497	422	434	375
FDA (g/kg de MS)	426	209	317	238	226	211
EE (g/kg de MS)	23	35	74	73	72	68

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo.

Coleta de material ruminal

No período pré-experimental de 30 dias a pasto foi realizada a coleta de conteúdo ruminal considerado como período 0. A coleta de amostras do conteúdo ruminal foi realizada no 14º dia experimental de cada período, antes do arraçamento dos animais, as 7:00 h, manualmente, através da cânula. Foram pesadas dez gramas da fração sólida e adicionados 10 ml de TBE (pH 7,4), agitou-se vigorosamente por 3 minutos (vórtex) e posteriormente o conteúdo foi filtrado em tecido com malha de 100 micras. O filtrado foi submetido à centrifugação de 13.000 RCF por 13 minutos a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento restante foi ressuspensão em 0,8 ml de TE tampão Tris-EDTA (10X, pH 8,0). O conteúdo ressuspensão foi centrifugado à 15.000 RCF por 11 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi armazenado sob refrigeração (-20°C).

Extração do DNA metagenômico

A obtenção do DNA metagenômico foi realizada no precipitado ressuspenso obtido da fração sólida do conteúdo ruminal. Foram analisadas 42 amostras com o kit de extração QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (cat. no. 51604, Qiagen, Hilden, Germany). O total de DNA extraído do conteúdo ruminal foi quantificado em Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific®), e a qualidade do material genético foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Deteção do DNA metagenômico

As amostras de DNA metagenômico foram analisadas em eletroforese de cuba horizontal. Uma alíquota de 8 µl de cada amostra juntamente com 2 µl de tampão de carregamento [0,025% de azul de bromofenol p/v e 50% de glicerol v/v], foi disposta em gel de agarose a 0,8% (p/v), previamente imerso em tampão TBE 1X [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3], a 80 volts.

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) por 10 minutos, e logo após descorado por 15 minutos em água destilada. A visualização das bandas com perfil de DNA metagenômico e do produto de PCR foi feita sob luz UV e a imagem documentada em um aparelho fotodocumentador (Bio Rad - Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio Rad™, Hercules, CA, USA).

As dimensões do DNA metagenômico e dos fragmentos amplificados foram comparados a um padrão de peso molecular com fragmentos múltiplos de 1 kb e 1kb plus DNA Ladder, dispostos no gel juntamente com as amostras analisadas.

PCR do gene 16S rDNA

As amostras de DNA metagenômico extraídos foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pela empresa GenOne Soluções em Biotecnologia, através da região conservada do gene 16S rDNA. As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 20 µl. A cada reação de amplificação foram incluídos um controle positivo, previamente testado, e um controle negativo (água ultrapura autoclavada).

Sequenciamento do gene 16S rDNA

As amostras foram sequenciadas em larga escala de DNA para empresa GenOne Soluções em Biotecnologia. A amplificação, assim como o sequenciamento das regiões V3-V4 (466 pb) do 16S rDNA foi realizada pela plataforma Illumina HiSeq (<http://www.genone.com.br/genomica/>), obtendo uma biblioteca genômica, processamento de dados, composição e abundância das espécies, complexidade e diferença de complexidade para cada amostra e *clustering* da composição de espécies para cada amostra e entre as amostras.

Análise dos dados do gene 16S rDNA

A análise dos dados subsequentes foi processada usando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). O QIIME é um programa livre baseado em *scripts Python* que permitem a classificação das sequências de 16S rDNA em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) e, usando-as como base para construir árvores filogenéticas, plotar gráficos taxonômicos, construir redes de interação, calcular medidas de alfa e beta diversidade, entre outros (CAPORASO et al., 2010).

Dessa maneira, as OTU foram definidas por agrupamento a 97%, utilizando como referência o banco de dados de OTU mais recente do Greengenes com o método Uclust (EDGAR, 2010).

A estrutura geral da comunidade bacteriana de filo e gênero foram analisados utilizando gráfico de abundância relativa (FUKUYAMA et al., 2015).

Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do software STAMP utilizando o Teste Exato de Fisher com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,01$) (cobertura nominal de 95%) (PARKS et al., 2010).

Resultados

A análise da diversidade da ordem das *archaeas* metanogênicas identificou Methanobacteriales em todas as dietas (pastagem com 2,19%, silagem com 4,49%, padrão com 2,72%, caroço de algodão com 6,35%, canola com 6,27%, girassol com 3,71% e soja com 1,48%); Methanomicrobiales foi identificada nas dietas pastagem (0,01%), silagem (0,01%), canola (0,36%), girassol (0,05%) e soja (0,01%); Methanosarcinales foi identificadas nas dietas canola (0,02%) e girassol (0,05%); Thermoplasmatales foi identificada em todas as dietas (pastagem com 0,02%, silagem com 0,05%, padrão com 0,39%, caroço de algodão com 0,04%, canola com 0,10%, girassol com 0,09% e soja com 0,08%) (Tabela 3).

Tabela 13. *Archaeas* metanogênicas identificadas pelo sequenciamento

		Pastagem	Silagem	Padrão	Algodão	Canola	Girassol	Soja
Ordem	Methanobacteriales	2,19%	4,49%	2,72%	6,35%	6,27%	3,71%	1,48%
	Methanomicrobiales	0,01%	0,01%			0,36%	0,05%	0,01%
	Methanosarcinales					0,02%	0,05%	
	Thermoplasmatales	0,02%	0,05%	0,39%	0,04%	0,10%	0,09%	0,08%
Família	Methanobacteriaceae	2,19%	4,49%	2,72%	6,35%	6,27%	3,71%	1,48%
	Methanomicrobiaceae	0,01%	0,01%			0,36%	0,05%	0,01%
	Methanosarcinaceae					0,02%	0,05%	
	Thermoplasmatales	0,02%	0,05%	0,39%	0,04%	0,10%	0,09%	0,08%
Gênero	<i>Methanobrevibacter</i>	2,15%	4,49%	2,72%	6,31%	6,25%	3,70%	1,48%
	<i>Methanosphaera</i>	0,04%		0,01%	0,05%	0,02%	0,01%	
	<i>Methanomicrobium</i>	0,01%	0,01%			0,36%	0,05%	0,01%
	<i>Methanimicrococcus</i>					0,02%	0,05%	
	<i>Candidatus Methanomethylphilus</i>	0,02%	0,04%	0,38%	0,04%	0,09%	0,07%	0,07%
Espécie	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	0,02%	0,06%	0,18%	0,36%	0,48%	0,31%	0,23%

A análise da diversidade da família das *archaeas* metanogênicas identificou *Methanobacteriaceae* em todas as dietas (pastagem com 2,19%, silagem com 4,49%, padrão com 2,72%, caroço de algodão com 6,35%, canola com 6,27%, girassol com 3,71% e soja com 1,48%); *Methanomicrobiaceae* foi identificada nas dietas pastagem e silagem com 0,01%, canola com 0,36%, girassol com 0,05% e soja com 0,01%; *Methanosarcinaceae* foi identificada nas dietas canola (0,02%) e girassol (0,05%); *Thermoplasmatales* foi identificada em todas as dietas (pastagem com 0,02%, silagem com 0,05%, padrão com 0,39%, caroço de algodão com 0,04%, canola com 0,10%, girassol com 0,09% e soja com 0,08%) (Tabela 3).

A análise da diversidade do gênero das *archaeas* metanogênicas identificou *Methanobrevibacter* em todas as dietas (pastagem com 2,15%, silagem com 4,49%, padrão com 2,72%, caroço de algodão com 6,31%, canola com 6,25%, girassol com 3,70% e soja com 1,48%); *Methanosphaera* foi identificada nas dietas pastagem (0,04%), padrão (0,01%), caroço de algodão (0,05%), canola (0,02%) e girassol (0,01%); *Methanomicrobium* foi identificada nas dietas pastagem (0,01%), silagem (0,01%), canola (0,36%), girassol (0,05%) e soja (0,01%); *Methanimicrococcus* foi identificada nas dietas canola (0,02%) e girassol (0,05%); *Candidatus methanomethylophilus* foi identificada em todas as dietas (pastagem com 0,02%, silagem com 0,04%, padrão com 0,38%, caroço de algodão com 0,04%, canola com 0,09%, girassol com 0,07% e soja com 0,07%) (Tabela 3).

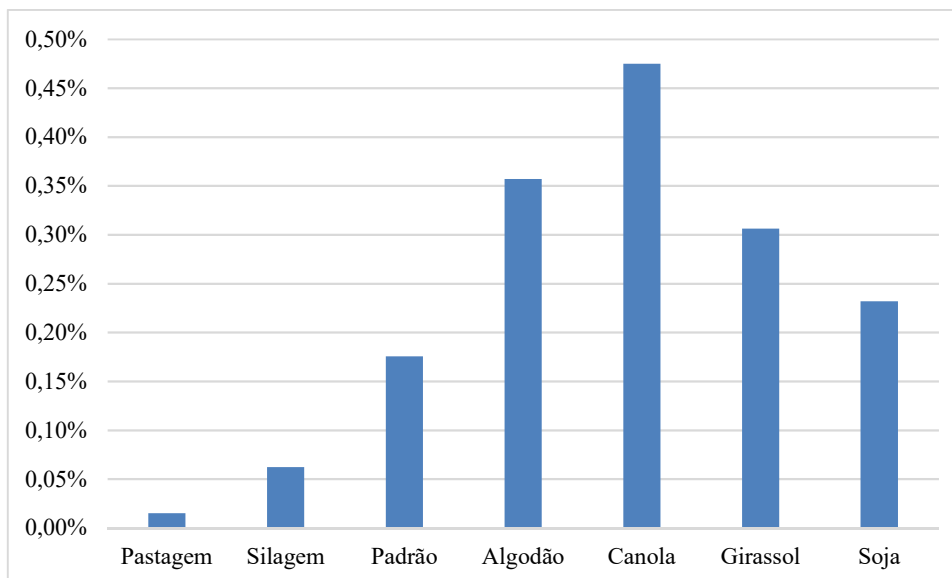


Figura 6. Espécie de *archaea* metanogênica identificada nas dietas

A análise de diversidade das espécies de *archaeas* metanogênicas identificou *Methanobrevibacter ruminantium* (gênero *Methanobrevibacter*) em todas as dietas (pastagem com 0,02%, silagem com 0,06%, padrão com 0,18%, caroço de algodão com 0,36%, canola com 0,48%, girassol com 0,31% e soja com 0,23%) (Figura 1).

Discussão

Na análise diversidade da ordem, família e gênero de *archaeas* metanogênicas apresentou diferença entre todas as dietas. Na dieta pastagem foi identificada 2,22% de *archaea* metanogênicas, essa informação tem relevância significativa pois confirma que em áreas de pastagem onde o manejo é realizado de acordo com a recomendação forrageira, o potencial poluente é reduzido. Na dieta silagem foi identificada 4,55% de *archaeas* metanogênicas, isso provavelmente ocorreu devido a maior quantidade de bactérias lácticas identificadas na dieta silagem, que foi quatro vezes maior que o encontrado nas demais dietas.

Na análise de diversidade de *archaeas* metanogênicas foi identificada a espécie *Methanobrevibacter ruminantium* em todas as dietas (Figura 1), na dieta pastagem foi identificada com 0,02% e, com 0,06% na dieta silagem, com base nesses resultados é possível

afirmar que o sistema extensivo de criação à pasto apresenta baixo potencial poluente na emissão de gases de efeito estufa. Dados semelhantes foram observados em cabras Moxotó (CUNHA et al., 2011), o gênero *Methanobrevibacter* compreende as metanogênicas mais comuns encontradas no rúmen de outros animais (JANSSEN & KIRS, 2008).

Nas dietas girassol, caroço de algodão e canola foi identificada a espécie *Methanobrevibacter ruminantium* nas proporções 0,31%, 0,36% e 0,48%, respectivamente, provavelmente pelos grãos terem sido fornecidos inteiros, pode-se afirmar que nessas dietas o processo da biohidrogenação não foi eficiente, não sendo capaz de reduzir os efeitos tóxicos dos ácidos graxos insaturados nas bactérias, sendo as gram-positivas, metanogênicas e protozoários as mais susceptíveis (PALMQUIST & MATTOS, 2006). Nas dietas padrão (0,18%) e soja (0,23%) ocorreu o inverso, pois a espécie *Methanobrevibacter ruminantium* foi identificada com menores proporções em relação as demais oleaginosas, nessas dietas o extrato etéreo foi de 35% na dieta padrão e 68% na dieta soja, e nas demais oleaginosas foi superior (Tabela 3).

Dentro do filo Eurychaeta constam todas as metanogênicas, seis grupos fazem parte dessa ordem. Os grupos básicos são Methanopyrales, Methanococcales e Methanobacteriales (classe I); Methanomicrobiales (classe II) (BAPTESTE, BROCHIER & BOUCHER, 2005) e Methanosarcinales (classe III) (ANDERSON et al., 2009), e recém-conhecido grupo Methanocellales (SAKAI et al., 2008). Há relatos de sequências de *archaea* relacionadas aos *Thermoplasmatales* em bovinos (TAJIMA et al., 2001; DENMAN, TOMKINS & MCSWEENEY, 2007; WRIGHT, AUCKLAND & LYNN, 2007; JANSSEN & KIRS, 2008). As *archaeas* encontradas foram identificadas como pertencentes a classe I (Methanobacteriales), classe II (Methanomicrobiales), classe III (Methanosarcinales) e Thermoplasmates.

As recentes análises metagenômicas têm mostrado a possibilidade de utilizar biomarcadores microbianos ruminais para estimar as emissões de metano e permitir a seleção dos animais a partir disso (AUFFRET et al., 2018). Essa abordagem pode superar as predições atuais que são baseadas no genoma do hospedeiro, especialmente para características que são difíceis de medir e amplamente influenciadas pelo microbioma ruminal (ROSS et al., 2013).

Conclusão

Na dieta soja foram identificadas poucas *archaeas* metanogênicas, diferindo das demais oleaginosas, dessa forma, torna-se uma alternativa para a alimentação de bovinos em função de seu baixo potencial de perdas energéticas com a produção de metano. Na dieta pastagem foram identificadas poucas *archaeas* metanogênicas confirmando que em áreas de pastagem onde o manejo é realizado de acordo com a recomendação forrageira, o potencial poluente é reduzido.

Agradecimentos

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (**Fundect**) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Referências

- ANDERSON I. et al. Genomic characterization of Methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. **PLoS One**, v.4, p.e5797, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0005797.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC., 2000. **Official methods of analysis**. 13.ed. Washington: AOAC.
- AUFFRET, M.D.; STEWART, R.; DEWHURST, R.J.; DUTHIE, C.; ROOKE, J.A.; WALLACE, R.J.; FREEMAN, T.C.; SNELLING, T.J.; WATSON, M.; ROEHE, R. Identification, Comparison, and Validation of Robust Rumen Microbial Biomarkers for Methane Emissions Using Diverse Bos Taurus Breeds and Basal Diets. **Frontiers in Microbiology**, v.8, article 2642, 2018.
- BAPTESTE E.; BROCHIER C.; BOUCHER Y. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. **Archaea**, v.1, p.353–363, 2005.

- BAUMAN, D.E.; BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A. et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, Ruminant Research, v.41, p.215-227, 2001.
- BHATT, V.D.; DANDE, S.S.; PATIL, N.V.; JOSHI, C.G. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Molecular Biology Reports**, v.40, p.3363–3371, 2013. doi: 10.1007/s11033-012-2411-4 PMID: 23277394
- BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCIA-GONZALEZ, R.; ANDRES, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.176, p.78–93, 2012. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010
- BORREL, G.; O'TOOLE, P.W.; HARRIS, H.M.B.; PEYRET, P.; BRUGÈRE, J.F.; GRIBALDO, S. Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. **Genome Biol. Evol.**, v.5, p.1769–1780, 2013.
- CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PENA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nat Methods**, v.7, n.5, p.335-336, 2010.
- COPPOCK, C. E.; WILKS, D. L. Supplemental fat in high energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. **Journal of Animal Science**, v.69, n.9, p.3826-3837, 1991.
- CUNHA, I.S.; BARRETO, C.C.; COSTA, O.Y.A.; BOMFIM, M.A.; CASTRO, A.P.; KRUGER, R.H.; QUIRINO, B.F. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. **Anaerobe**, v.17, n.3, p.118–124, 2011.
- DANIELSSON, R.; DICKSVED, J.; SUN, L.; GONDA, H.; MÜLLER, B.; SCHNÜRER, A. et al. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. **Front. Microbiol.**, v.8, article 226, 2017.
- DENMAN, S.E.; TOMKINS N.W.; MCSWEENEY C.S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.6, p.313–322, 2007.
- EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v.26, n.19, p.2460-2461, 2010.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol Mol Biol Ver**, v.68, p.669–685, 2004.
- HOOK, S.E.; WRIGHT, A.D.; McBRIDE, B.W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, v.2010, p.945785, 2010.
- HRISTOV, A.N.; OH, J.; LEE, C.; MEINEN, R.; MONTES, F.; OTT, T. et al. 2013. **Mitigation of Greenhouse Gas Emissions in Livestock Production – A Review of Technical Options for Non-CO2 Emissions (FAO Animal Production and Health Paper No. 177)**. Rome: FAO.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (2014). **Climate Change 2014**. Synthesis report 2014.
- JANSSEN, P.H.; KIRS M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.74, p.3619 –3625, 2008.

- JANSSEN, P.H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.3619-3625, 2008.
- KANG, S.; DENMAN, S. E.; McSWEENEY, C. S. The use of molecular tools for the study of rumen ecology. In: Simpósio internacional avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes, 2. Pirassununga. **Anais...** p.179-194, 2009.
- LEAHY, S.C.; KELLY, W.J.; ALTERMANN, E.; RONIMUS, R.S.; YEOMAN, C.J.; PACHECO, D.M. et al. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. **PLoS ONE**, v.5, p.e8926, 2010.
- LETTAT, A.; HASSANAT, F.; BENCHAAAR, C. Corn silage in dairy cow diets to reduce ruminal methanogenesis: Effects on the rumen metabolically active microbial communities. **J. Dairy Sci.**, v.96, p.5237–5248, 2013.
- LOVETT, D.K.; STACK, L. J.; LOVELL, S.; CALLAN, J.; FLYNN, B; HAWKINS, M.; O'MARA, F.P. Manipulating enteric methane emissions and animal performance of late-lactation dairy cows through concentrate supplementation at pasture. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.88, p.2836-2842, 2005.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- NRC. (2000). **Nutrient Requirements of Beef Cattle**, 7th rev. edn. Natl. Acad. Press, Washington, DC, USA.
- O'HARA, P.; FRENEY, J.; ULYATT, M. Abatement of agricultural non-carbon dioxide greenhouse gas emissions: a study of research requirements. Report prepared for the Ministry of Agriculture and Forestry on Behalf of the Convenor, Ministerial Group on Climate Change, the Minister of Agriculture and the Primary Industries Council. New Zealand: Crown Copyright - Ministry of Agriculture and Forestry, 2003. 170p. Disponível em: <www.mpi.govt.nz/news-and-resources/publications/>. On line. Acesso em: 25 set. 2018.
- PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: **Nutrição de Ruminantes**. 1. ed. Jaboticabal: Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires e Simone Gisele de Oliveira, 2006. cap. 10, p. 287-310.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P. J. 1985. **Analysis of forages and fibrous foods - a laboratory manual for animal science**. Ithaca.
- ROSS, E.M.; MOATE, P.J.; MARETT, L.; COCKS, B.G.; HAYES, B.J. Metagenomic predictions: from microbiome to complex health and environmental phenotypes in humans and cattle. **PLoS ONE**, v.8, p.e73056, 2013.
- SAKAI S. et al. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.58, p.929–936, 2008.
- TAJIMA, K.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; AMINOV, R.I. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.200, p.67, 2001.
- THAUER, R.K.; KASTER, A.K.; SEEDORF, H.; BUCKEL, W.; HEDDERICH, R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.6, p.579–591, 2008.

WRIGHT, A-DG.; AUCKLAND, C.H.; LYNN, D.H. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p.4206 –4210, 2007.