

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Dinâmica do microbioma ruminal de ovinos (*Ovis aries*) e sua relação com a
degradação de biomassa**

Emiliana Manesco Romagnoli

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

Emiliana Manesco Romagnoli
Licenciada em Ciências Biológicas

Dinâmica do microbioma ruminal de ovinos (*Ovis aries*) e sua relação com a degradação de biomassa

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RODRIGO MENDES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Romagnoli, Emiliania Manesco

Dinâmica do microbioma ruminal de ovinos (*Ovis aries*) e sua relação com a degradação de biomassa / Emiliania Manesco Romagnoli. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

149 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Rúmen 2. Metagenômica 3. Metatranscriptômica 4. 16S rRNA 5. Bagaço de cana-de-açúcar I. Título

CDD 636.3
R756d

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

A minha mãe Neide e irmã Daniana pelo amor e apoio.

Ao Weliton pelo incentivo e estar sempre ao meu lado.

Aos amigos pelas conversas e milhões de risadas.

Ofereço e dedico

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela saúde, força e pelas graças e bençãos derramadas em minha vida.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e a coordenação do PPG Microbiologia por me conceder a oportunidade para realizar o curso. Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e em especial ao laboratório de Nutrição ruminal (LANA) por me conceder o espaço necessário para o desenvolvimento do presente projeto.

Aos Prof. Dr. Rodrigo Mendes e Adibe Luiz Abdalla pela sua confiança, paciência e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Christopher Dunlap pela orientação e ensinamentos durante meu estágio no exterior.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA-Meio Ambiente, pela disposição e colaboração em tudo o que foi necessário no desenvolvimento acadêmico e de pesquisa do meu trabalho.

A CAPES e FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e FAPESP novamente pelo financiamento para o desenvolvimento do projeto.

Aos professores: Márcio Lambais, Simone Lira, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, Fernando Dini Andreote, Helder Louvadini e Tsai Siu Mui.

Aos meus colegas e técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa-Meio Ambiente: Stalin, Josiane, Maíke, Carol, Harold, Suikinai, Ana Paula, Danilo, Fábio, Clederson, Camila, Ana Gabriele, Vanessa, Leonardo, Marta, Laura, Rafael, Tatiana, João, Tiago, Rodrigo, Márcia, Elke, Rosely, Ana Maria, Rayza, Roseli, Joani, entre outros, pelo auxílio durante minha estada no laboratório e por cada momento inesquecível vivido com eles.

Aos colegas da ESALQ/USP: Ademir, Júlia, Silvia, Maryeimy, Adriano, Alice, Elisa, Rafael, Giselle, Fábio, Diogo, Pedro, Lucas e outros pelas conversas em Piracicaba (SP).

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Hipótese e Objetivos.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Subordem Ruminantia	23
2.2 O trato digestivo dos ruminantes	23
2.3 A fermentação microbiana no microbioma ruminal.....	24
2.4 O domínio Bactéria.....	25
2.5 O domínio Arquêia	26
2.6 Protozoários ruminais	26
2.7 Fungos anaeróbicos ruminais	27
2.8 Fatores que alteram o microbioma ruminal.....	28
2.8.1 Pectina e sua despolimerização	29
2.8.2 Amido e sua complexa composição	29
2.8.3 A digestão dos carboidratos estruturais no rúmen.....	30
2.9 Ácidos graxos voláteis.....	32
2.10 Emissão de metano	32
2.11 Estudos moleculares do microbioma de ruminantes	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Desenho experimental	35
3.2 Amostragem do líquido e da fibra ruminal.....	39
3.3 Contagem de protozoários	40
3.4 Análise do desempenho animal	41
3.4.1 Consumo de matéria seca	41
3.4.2 Digestibilidade <i>in vivo</i>	41
3.5 Sequenciamento de segunda geração	42
3.5.1 Isolamento do DNA total de fibra e líquido ruminal.....	42
3.5.2 Amplificação e sequenciamento da região V3	42
3.5.3 Amplificação e sequenciamento da região V6-V7	43
3.5.4 Amplificação e sequenciamento da região transcrita interna (ITS)	45

3.5.5 Controle de qualidade e anotação dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA e da região intergênia fúngica (ITS2)	46
3.5.6 Sequenciamento e controle de qualidade e anotação dos dados de sequenciamento do DNA total.....	47
3.5.7 Sequenciamento e controle de qualidade e anotação dos dados de sequenciamento do RNA total	47
3.5.8 Análise estatística.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1.1 Consumo dos animais ao longo de 60 dias	51
4.1.2 Variação do pH ruminal dos animais ao longo de 60 dias.....	52
4.1.3 Quantificação da emissão de metano no rúmen.....	54
4.1.4 Disponibilização de ácidos graxos de cadeia curta pela fermentação microbiana no rúmen	57
4.2 Análise da dinâmica do microbioma ruminal	59
4.2.1 Quantificação de protozoários no líquido ruminal.....	59
4.2.2 Composição taxonômica e dinâmica das comunidades bacterianas e fúngicas no rúmen	61
4.2.2.1 Análise de alfa diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas do rúmen	62
4.2.2.1.2 Determinação da composição da comunidade bacteriana do rúmen via sequenciamento da região V3 do gene 16S rRNA	65
4.2.2.1.3 Determinação da composição da comunidade bacteriana do rúmen via sequenciamento da região V6-7 do gene 16S rRNA	77
4.2.2 Determinação da composição da comunidade fúngica do rúmen via sequenciamento da região ITS2 (“internal transcribed spacer”) do rDNA	86
4.3 Correlação entre a estrutura da comunidade bacteriana e parâmetros físico-químicos	93
4.4 Potencial funcional do microbioma do rúmen de ovinos.....	98
4.4.1 Micro-organismos do rúmen envolvidos na desconstrução de biomassa acessados via sequenciamento de DNA total	98
4.5 Potencial metabólico e funcional do rúmen de <i>Ovis aries</i> revelado pela abordagem metatranscriptoma.....	108
4.6 Efeito da manipulação da dieta no microbioma do rúmen de carneiros	111
5 CONCLUSÕES GERAIS	115
REFERÊNCIAS.....	117
ANEXOS	141

RESUMO

Dinâmica do microbioma ruminal de ovinos (*Ovis aries*) e sua relação com a degradação de biomassa

Considerando a dieta como um fator modulador do microbioma ruminal, neste trabalho objetivou-se investigar o impacto do bagaço da cana-de-açúcar sobre a composição e funcionalidade das espécies microbianas residentes no rúmen de carneiros (*Ovis aries*). Foram utilizados seis animais machos fistulados de *O. aries*, dos quais três foram alimentados com uma dieta composta por 70% de volumoso e 30% de concentrado (tratamento controle) e outros três animais alimentados com uma dieta similar a anterior, mas com 14% do volumoso substituído por bagaço de cana-de-açúcar (tratamento bagaço). O conteúdo ruminal (líquido e fibra) foram amostrados quinzenalmente durante 60 dias. A partir dessas amostras foram acessadas a estrutura e a composição da comunidade microbiana pela extração de DNA total e amplificação das regiões V3 e V6-V7 do gene 16S rRNA bacteriano e a região intergênica fúngica (ITS2). Além disso, foram feitas análises metagenômicas e metatranscriptômicas de comunidade microbianas enriquecidas em fibra ruminal para identificar enzimas lignocelulolíticas expressas. As frações líquida e fibrosa do conteúdo ruminal de *O. aries* revelaram uma comunidade bacteriana dominada principalmente por Bacteroidetes e Firmicutes ao longo de todo período experimental. Dois gêneros, *Prevotella* e *Ruminococcus* representaram 20% e 4% da comunidade bacteriana ruminal, respectivamente. Para a comunidade fúngica o filo Neocallimastigomycota representou 91% das sequências e os principais gêneros deste filo foram *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces* aderidos a fibra ruminal. O gênero *Caecomyces*, foi significativamente mais abundante na fibra ruminal de animais que se alimentaram de bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, foi observado um aumento significativo na frequência de enzimas como, por exemplo, 1,4- α -glucano, α -galactosidase, endo 1,4- β -xilânase, β -xilosidase, xilose isomerase, celobiose fosforilase e α -N-arabinofuranosidase no tratamento com bagaço de cana-de-açúcar. Considerando que a recuperação de enzimas a partir de comunidades microbianas naturalmente selecionadas para a degradação de biomassa é uma estratégia promissora para superar a atual ineficiência da ação enzimática na produção industrial de biocombustíveis, os resultados deste trabalho representam a possibilidade de aumentar a capacidade de recuperação ou descoberta de enzimas a partir de ruminantes, ou ainda, a possibilidade de manipular a estrutura do microbioma do rúmen para usá-lo como fonte de inóculo enriquecido em processos industriais de degradação de biomassa.

Palavras-chave: Rúmen; Metagenômica; Metatranscriptômica; 16S rRNA; Bagaço de cana-de-açúcar

ABSTRACT

Dynamics of the sheep (*Ovis aries*) rumen microbiome and its relationship with the degradation of biomass

Considering the diet as a modulator of ruminal microbiome, this work aimed to investigate the impact of sugarcane bagasse on the composition and function of microbial species residents in the sheep (*Ovis aries*) rumen. Six cannulated male animals were used in the experiment, where three individuals were fed on a diet consisting of 70% forage and 30% concentrate (control treatment), and three were fed on a similar diet, but with sugarcane bagasse replacing 14% of the forage portion (bagasse treatment). The ruminal content (i.e., liquid and fiber) were sampled every two weeks during 60 days. From these samples, the structure and composition of the microbial community were assessed by total DNA extraction and amplification of V3 and V6-V7 regions of 16S rRNA gene from bacteria and the fungal intergenic region (ITS2). Furthermore, metagenomics and metatranscriptomics approaches were used to evaluate the enrichment of specific members of the microbial community in the ruminal fiber and genes related to lignocellulolytic enzymes. The liquid and fiber fractions of the *O. aries* rumen revealed a microbial community dominated mainly by Firmicutes and Bacteroidetes throughout the experimental period. The genera *Prevotella* and *Ruminococcus* accounted for 20% and 4% of the bacterial community of rumen, respectively. In the fungal community, the phylum Neocallimastigomycota accounted for 91% of sequences and its main genera adhered on the ruminal fiber were *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces*, and *Cyllamyces*. The genus *Caecomyces* was significantly more abundant in the ruminal fiber in animals fed on sugarcane bagasse. Furthermore, there was a significant increase in the frequency of enzymes, such as α -1,4-glucanase, α -galactosidase, endo-1,4- β -xylanase, β -xylosidase, xylose isomerase, cellobiose phosphorylase and α -N-arabinofuranosidase in the bagasse treatment. Considering that the recovery of enzymes from ecosystems naturally evolved for degradation of biomass is a promising strategy to overcome the current inefficient enzymatic action in industrial production of biofuels, the results of this study bring great possibilities to increase the discovery and or recovery of enzymes from ruminants, as well as the possibility of the ruminal microbiome structure manipulation to be used as source of an enriched inoculum for biomass degradation in industrial processes.

Keywords: Rumen; Metagenomic; Metatranscriptomic, 16S rRNA; Sugarcane bagasse

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sistema digestório dos ruminantes esquematizando os quatro compartimentos24
- Figura 2 - Local de permanência dos animais nos intervalos de coleta. A baía foi dividida ao meio para comportar os dois grupos de animais e foi provida de alimentação e água individuais para cada grupo39
- Figura 3 - Gaiolas metabólicas (A), coleta do líquido ruminal (B) e foto da fibra ruminal (C)40
- Figura 4 - Estrutura do gene 16s rRNA de *Escherichia coli*, utilizando o software CLC Genomics Workbench. (A) Seis regiões de fragmento R (R1: 1-250; R2: 251-500; R3: 501-750; R4: 751-1050; R5: 1051-1300; R6: 1301-1542). (B) Em verde estão representadas as nove regiões variáveis (V1: 69-99; V2: 133-242; V3: 433-497; V4: 576-682; V5: 822-879; V6: 986-1043; V7: 1117-1173; V8: 1243-1294; V9: 1435-1465) e as linhas pretas da sequência representam as regiões conservadas do gene 16s RNA (YARZA et al., 2014). (C) Posição e sequência dos *primers* no gene 16s rRNA. O fragmento R1, em vermelho, contém as regiões variáveis V1 e V2, o fragmento R2, em laranja, contém a região variável V3; o fragmento R3; em amarelo, contém a região V4; em verde o fragmento R4 contém as regiões V5 e V6; em azul, o fragmento R5 contém as regiões V7 e V8; e em roxo o fragmento R6 contém a região V944
- Figura 5 - “Boxplots” dos valores de pH no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A= dieta controle e B= dieta bagaço. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P<5\%$)53
- Figura 6 - “Boxplots” dos valores de pH no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P<5\%$). Verde= bagaço e vermelho= controle53
- Figura 7 - “Boxplots” da emissão de metano no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A= dieta controle e B= dieta bagaço. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P<5\%$).....55
- Figura 8 - “Boxplots” da emissão de metano no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P<5\%$).....55
- Figura 9 - Porcentagem de ácidos graxos voláteis (AGCC) presentes no líquido ruminal de *O. aries* submetidos a dieta controle (A) e dieta bagaço (B) ao longo de 60 dias57
- Figura 10 - “Boxplots” dos ácidos graxos voláteis no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A1= porcentagem de acetato no líquido ruminal na dieta controle; A2= porcentagem de acetato no

líquido ruminal na dieta bagaço; B1= a porcentagem de butirato no líquido ruminal na dieta controle; B2= porcentagem de butirato no líquido ruminal na dieta bagaço; C1= porcentagem de propionato no líquido ruminal na dieta controle e C2= porcentagem de propionato no líquido ruminal na dieta bagaço. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$) 58

Figura 11 - “Boxplots” dos ácidos graxos voláteis no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A= porcentagem de butirato no líquido ruminal; B= a porcentagem de propionato no líquido ruminal; C= porcentagem de acetato no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P < 5\%$)..... 59

Figura 12 - Contagem de protozoários em câmara de Neubauer (média \pm erro padrão) proveniente do líquido ruminal das duas dietas testadas e ao longo de 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$) .. 60

Figura 13 - Contagem de protozoários em câmara de Neubauer (média \pm erro padrão) proveniente do líquido ruminal comparando as duas dietas testadas e ao longo dos 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P < 5\%$) 60

Figura 14 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle..... 63

Figura 15 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V3 do gene 16S rRNA encontrados no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle..... 63

Figura 16 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle..... 64

Figura 17 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle..... 64

Figura 18 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região ITS2 fúngica encontrados na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três

- pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle..... 65
- Figura 19 - Composição da comunidade bacteriana a nível de filo na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= líquido ruminal (dieta controle); B= líquido ruminal (dieta bagaço); C= fibra ruminal (dieta controle) e D= fibra ruminal (dieta bagaço) 67
- Figura 20 - Dinâmica entre os filios Bacteroidetes e Firmicutes na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes na fibra ruminal, A2= Bacteroidetes no líquido ruminal, B1= Firmicutes na fibra ruminal e B2= Firmicutes no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito 68
- Figura 21 - Dinâmica entre os filios Bacteroidetes e Firmicutes na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta (* $P < 5\%$)..... 69
- Figura 22 - Abundância relativa (%) dos filios Bacteroidetes e Firmicutes na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta controle); A2= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta bagaço); A3= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta controle); A4= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta bagaço); B1= Firmicutes na fibra ruminal (dieta controle); B2= Firmicutes na fibra ruminal (dieta bagaço); B3= Firmicutes no líquido ruminal (dieta controle); B4= Firmicutes no líquido ruminal (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)..... 70
- Figura 23 - Abundância relativa (%) do filo Fibrobacter na região V3 do gene 16S rRNA encontrada na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. “Boxes” verdes denotam dieta bagaço e os vermelhos denotam dieta controle. A= Fibrobacter aderido à fibra ruminal, B= Fibrobacter no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito 71
- Figura 24 - Abundância relativa (%) do filo Fibrobacter na região V3 do gene 16S rRNA encontrada na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. “Boxes” verdes denotam dieta bagaço e os vermelhos denotam dieta controle. A1= Fibrobacter aderido à fibra ruminal (dieta controle), A2= Fibrobacter aderido à fibra ruminal (dieta bagaço); B1= Fibrobacter no líquido ruminal (dieta controle); B2= Fibrobacter no líquido ruminal (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$) 72

- Figura 25 - Análise de coordenadas principais (PCA) usando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis com as UTOs (3% de dissimilaridade) da região V3 do gene 16S rRNA. (A) UTOs ao longo de 60 dias, analisando a estrutura da comunidade bacteriana no líquido e fibra ruminal. Esta análise é suportada estatisticamente pelo teste de ANOSIM ($R= 0,4084$, $p= 0,0001$); (B) líquido ruminal no 1 dia; (C) fibra ruminal no 1 dia; (D) líquido ruminal aos 15 dias; (E) fibra ruminal aos 15 dias; (F) líquido ruminal aos 30 dias; (G) fibra ruminal aos 30 dias; (H) líquido ruminal aos 45 dias; (I) fibra ruminal aos 45 dias; (J) líquido ruminal aos 60 dias; (K) fibra ruminal aos 60 dias 76
- Figura 26 - Composição da comunidade bacteriana a nível de filo na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= líquido ruminal (dieta controle); B= líquido ruminal (dieta bagaço); C= fibra ruminal (dieta controle) e D= fibra ruminal (dieta bagaço)..... 78
- Figura 27 - Dinâmica entre os filotaxões Bacteroidetes e Firmicutes na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes aderido a fibra ruminal, A2= Bacteroidetes no líquido ruminal, B1= Firmicutes aderido a fibra ruminal e B2= Firmicutes no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P<5\%$) 80
- Figura 28 - Dinâmica entre os filotaxões Bacteroidetes e Firmicutes na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($P<5\%$) 81
- Figura 29 - Abundância relativa (%) dos filotaxões Bacteroidetes e Firmicutes na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta controle); A2= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta bagaço); A3= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta controle); A4= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta bagaço); B1= Firmicutes na fibra ruminal (dieta controle); B2= Firmicutes na fibra ruminal (dieta bagaço); B3= Firmicutes no líquido ruminal (dieta controle); B4= Firmicutes no líquido ruminal (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P<5\%$) 82
- Figura 30 - Análise de coordenadas principais (PCA) usando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis com as UTOs (97% de dissimilaridade) na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. (A) UTOs ao longo de 60 dias, analisando a estrutura da comunidade bacteriana no líquido e fibra ruminal. Esta análise é suportada estatisticamente pelo teste de ANOSIM ($R= 0,6655$, $p= 0,0001$); (B) líquido ruminal no primeiro dia; (C) fibra ruminal no primeiro dia; (D) líquido ruminal aos 15 dias; (E) fibra ruminal aos 15 dias; (F) líquido ruminal aos 30 dias; (G) fibra ruminal aos 30 dias; (H) líquido ruminal aos 45 dias; (I) fibra

- ruminal aos 45 dias; (J) líquido ruminal aos 60 dias; (K) fibra ruminal aos 60 dias 84
- Figura 31 - Composição da comunidade fúngica da região ITS2 a nível de filo encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= fibra ruminal (dieta controle) e B= fibra ruminal (dieta bagaço)..... 87
- Figura 32 - Composição da comunidade fúngica da região ITS2 a nível de gênero encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= fibra ruminal (dieta controle) e B= fibra ruminal (dieta bagaço)..... 87
- Figura 33 - Abundância relativa (%) a nível de gênero da região ITS2 fúngica encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= Anaeromyces; B= Caecomyces; C= Cyllamyces; D= Neocallimastix; E= Orpinomyces e F= Piromyces. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta (* $P < 5\%$)..... 88
- Figura 34 - Abundância relativa (%) a nível de gênero da região ITS2 fúngica encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Anaeromyces (dieta controle); A2= Anaeromyces (dieta bagaço); B1= Caecomyces (dieta controle); B2= Caecomyces (dieta bagaço); C1= Cyllamyces (dieta controle); C2= Cyllamyces (dieta bagaço); D1= Neocallimastix (dieta controle); D2= Neocallimastix (dieta bagaço); E1= Orpinomyces (dieta controle); E2= Orpinomyces (dieta bagaço); F1= Piromyces (dieta controle) e F2= Piromyces (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)..... 89
- Figura 35 - Análise de coordenadas principais (PCoA) usando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis com as UTOs (3% de dissimilaridade) da região ITS2. (A) UTOs ao longo de 60 dias, analisando a estrutura da comunidade fúngica na fibra ruminal. (B) fibra ruminal no primeiro dia; (C) fibra ruminal aos 15 dias; (D) fibra ruminal aos 30 dias; (E) fibra ruminal aos 45 dias; (F) fibra ruminal aos 60 dias..... 91
- Figura 36 - Análise de componentes principais (PCA) “Constrained” correlacionando os parâmetros de ácidos graxos volteis de cadeia curta (AGCC) com as famílias de Bactéria da região V6 do gene 16S rRNA provenientes da (A) fibra e do (B) líquido ruminal aos 60 dias. As amostras 1, 2 e 3= I5F, II5F e III5F (dieta controle); 4, 5 e 6= IV5F, V5F e VI5F (dieta bagaço)..... 94
- Figura 37 - Análise de componentes principais (PCA) “Constrained” correlacionando os parâmetros de digestibilidade com as famílias de Bactéria da região V6 do gene 16S rRNA provenientes da (A) fibra e (B) líquido ruminal aos 60 dias. As amostras 1, 2 e 3= I5F, II5F e III5F (dieta controle); 4, 5 e 6= IV5F, V5F e VI5F (dieta bagaço)..... 95
- Figura 38 - Análise de redundância (RDA) baseado nas UTOS (97% de similaridade) da região V6-V7 do gene 16S rRNA selecionadas pela análise de SIMPER correlacionando os parâmetros de digestibilidade provenientes da fibra ruminal aos 60 dias. Os animais I5F, II5F e III5F= dieta controle; IV5F, V5F e VI5F= dieta bagaço. Os valores nos eixos 1 e 2 indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos..... 96

- Figura 39 - Análise de redundância (RDA) baseado nas UTOS (97% de similaridade) da região ITS2 fúngica selecionadas pela análise de SIMPER correlacionando os parâmetros de digestibilidade provenientes da fibra ruminal aos 60 dias. Os animais I5F, II5F e III5F= dieta controle; IV5F, V5F e VI5F= dieta bagaço. Os valores nos eixos 1e 2 indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos 97
- Figura 40 - Curva de rarefação das sequencias anotadas no MG-RAST de amostras da dieta controle (I3F, II3F e III3F) e dieta bagaço (IV3F V3F e VI3F) 99
- Figura 41 - Análise de agrupamento da classificação funcional usando o heatmap gerado no MG-RAST segundo o banco de dados SEED Subsystems, baseado na abundância de proteínas a nível 1. As amostras I3F, II3F e III3F são os animais que receberam a dieta controle; IV3F, V3F e VI3F são os animais que receberam a dieta bagaço 101
- Figura 42 - Análise de Componentes Principais (PCA) das funções anotadas com o banco de dados *SEED Subsystems* nas amostras da fibra ruminal aos 30 dias 101
- Figura 43 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de *Ovis aries*. Anotadas a nível de função pelo banco de dados SEED, enzimas selecionadas nos estágios iniciais da despolimerização da parede celular vegetal. A= 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18); B= α -galactosidase (EC3.2.1.22); C= β -galactosidase (EC 3.2.1.23); D= β -xilosidase (EC 3.2.1.37); E= Endo 1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8); F= xilose isomerase (EC 5.3.1.5); G= Celobiose fosforilase (EC 2.4.1.-); H= α -N-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) (continua) 104
- Figura 44 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de *Ovis aries*. Anotadas a nível de função pelo banco de dados SEED, enzimas selecionadas nos estágios iniciais da despolimerização da parede celular vegetal. A= 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18); B= α -galactosidase (EC3.2.1.22); C= β -galactosidase (EC 3.2.1.23); D= β -xilosidase (EC 3.2.1.37); E= Endo 1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8); F= xilose isomerase (EC 5.3.1.5); G= Celobiose fosforilase (EC 2.4.1.-); H= α -N-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) (conclusão) 105
- Figura 45 - Análise de agrupamento da classificação funcional usando o heatmap gerado no MG-RAST segundo o banco de dados SEED Subsystems, baseado na abundância de proteínas a nível 1. As amostras I3F, II3F e III3F são os animais que receberam a dieta controle; IV3F, V3F e VI3F são os animais que receberam a dieta bagaço 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da dieta ofertada aos animais durante o experimento.....	35
Tabela 2 - Composição da dieta controle e da dieta bagaço utilizada nos experimentos.....	37
Tabela 3 - Composição bromatológica dos ingredientes da dieta ofertada aos seis animais da raça <i>Ovis aries</i> durante os 60 dias	37
Tabela 4 - Consumo de nutrientes em ovinos suplementada com diferentes dietas ao longo dos 60 dias.....	52
Tabela 5 - Composição bacteriana (média geral) a nível de filo na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (<i>Ovis aries</i>) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias	66
Tabela 6 - Composição taxonômica a nível de gênero da região V3 do gene 16S rRNA no rúmen de <i>O. aries</i>	66
Tabela 7 - ‘Core’ bacteriano no microbioma ruminal de <i>O.aries</i> da região V3 do gene 16S rRNA	73
Tabela 8 - Análise de dissimilaridade (SIMPER) da região V3 do gene 16S rRNA da fibra ruminal aos 60 dias	77
Tabela 9 - Média da composição taxonômica da região V6-7 do gene 16S rRNA da fibra e líquido ruminal ao longo dos 60 dias*	79
Tabela 10 - ‘Core’ bacteriano no microbioma ruminal de <i>O.aries</i> da região V6-7 do gene 16S rRNA	83
Tabela 11 - Análise de dissimilaridade (SIMPER) da região V6-7 do gene 16S rRNA da fibra ruminal aos 60 dias	85
Tabela 12 - Composição do ‘core’ fúngico no microbioma ruminal de <i>O. aries</i> . Os gêneros listados são todos pertencentes à família Neocallimastigaceae do filo Neocallimastigomycota	90
Tabela 13 - Análise de dissimilaridade (Simper) da região ITS2 fúngica da fibra ruminal aos 60 dias*.....	92
Tabela 14 - Valores do teste de Monte Carlo das variáveis ruminais	96
Tabela 15 - Valores do teste de Monte Carlo das variáveis ruminais	97
Tabela 16 - Valores dos dados do sequenciamento metagenômico das amostras de fibra ruminal aos 30 dias anotados pelo MG-RAST.....	99
Tabela 17 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de <i>Ovis aries</i> (continua)	102
Tabela 18 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de <i>Ovis aries</i> (conclusão)	103
Tabela 19 - Valores dos dados do sequenciamento metatranscriptoma das amostras de fibra ruminal do aos 60 dias anotados pelo MG-RAST.....	109
Tabela 20 - A lista de enzimas preditas para carboidratos ativos identificados no rúmen de <i>Ovis aries</i>	110
Tabela 21 - Alterações no desempenho animal e microbioma do rúmen causadas pela introdução de bagaço de cana-de-açúcar em carneiros	114

1 INTRODUÇÃO

A dependência mutualística entre mamíferos e micro-organismos ocorreu devido a habilidade dos micro-organismos em acessar a fonte de energia contida na biomassa vegetal (CANNAS et al., 2004). Os ruminantes são mamíferos herbívoros que possuem um sistema digestivo com quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. O rúmen em especial, abriga uma grande diversidade de Bactérias, Arquéias, Fungos, Protozoários, Vírus e Bacteriófagos que compõe o microbioma ruminal e são responsáveis pela ciclagem do carbono e nitrogênio neste ambiente (HUNGATE, 1966).

Uma vez que os carboidratos compõem 70 a 90% da dieta dos ruminantes, a dinâmica microbiana no rúmen em resposta a manipulação da dieta tem despertado interesse em inúmeras áreas. A manipulação da fermentação microbiana via dieta pode auxiliar no aumento da performance dos ruminantes em sistemas de produção agropecuária (CHALUPA, 1977; CARBERRY et al., 2012), e pode, ainda, ter aplicação na área biotecnológica para a obtenção de novas enzimas para a produção de biocombustíveis (HESS et al., 2011), ou impactar nas mudanças climáticas por meio da mitigação da emissão de metano (THORPE, 2009).

O microbioma ruminal é dominado por bactérias pertencentes, principalmente, aos filos Bacteroidetes e Firmicutes. Estes dois filos dependendo do tipo de dieta, espécie de ruminante podem representar quase 80% da comunidade bacteriana. Além de abrigarem gêneros como *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Prevotella* e *Bacteroides* que são capazes de degradar carboidratos estruturais como hemicelulose e celulose (KOIKE; KOBAYASHI, 2001). Em fungos, os gêneros *Orpinomyces*, *Caecomyces*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces*, *Piromyces* e *Neocallimastix* são os micro-organismos residentes do rúmen e peças chaves na degradação de carboidratos (AKIN et al., 1988).

A dieta é um fator chave no microbioma ruminal e o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agrícola comumente utilizado como fonte de alimento para os ruminantes. O bagaço de cana-de-açúcar como fonte de fibra para o animal, tem como principal característica elevado conteúdo de carboidratos estruturais, baixa digestibilidade e baixo teor de proteínas (BULLE et al., 2002). Vários estudos têm apontado o uso de bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de carbono (SINGHANIA et al., 2009) para a produção de papel, fertilizantes e para a produção de etanol de segunda geração. Atualmente, um dos maiores desafios no uso do bagaço de cana-de-açúcar pela indústria de biocombustíveis é a fermentação da biomassa lignocelulolítica em açúcares simples pelos micro-organismos.

Pelo exposto, neste trabalho objetivou-se analisar o efeito da substituição parcial da porção volumosa da dieta de *O. aries* por bagaço de cana-de-açúcar sobre a comunidade microbiana ruminal aos 60 dias. Buscou-se o uso do animal como um biorreator natural visto que esse possui uma comunidade microbiana naturalmente enriquecida e eficaz na hidrólise de celulose e fermenta açúcares em produtos que são precursores de biocombustíveis.

1.1 Hipótese e Objetivos

Neste estudo, testamos a hipótese de que a substituição parcial da porção volumosa da dieta de ovinos por bagaço de cana-de-açúcar altera a dinâmica do microbioma do rúmen de *Ovis aries* e conduz ao enriquecimento de espécies microbianas que despolimerizam carboidratos oriundos do bagaço de cana-de-açúcar aos 60 dias. O entendimento da dinâmica da comunidade microbiana ruminal associada a digestibilidade animal é necessária para se conhecer os parâmetros cruciais do metabolismo microbiano relacionados ao animal.

O objetivo geral deste estudo foi elucidar a composição e funcionalidade do microbioma ruminal com uma dieta suplementada com bagaço de cana-de-açúcar via sequenciamento metagenômico e metatranscriptômico da fibra e líquido ruminal.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Determinar a dinâmica da comunidade bacteriana presente no líquido e na fibra ruminal ao longo de 60 dias por meio do sequenciamento das regiões V3 e V6-V7 do gene 16S rRNA;
- ✓ Determinar a dinâmica da comunidade fúngica na fibra ruminal no decorrer de 60 dias por meio do sequenciamento da região intergênica (ITS2) do rRNA.
- ✓ Correlacionar a estrutura da comunidade bacteriana com parâmetros de digestibilidade animal após 60 dias sob dieta controlada.
- ✓ Identificar micro-organismos degradadores de biomassa enriquecidos na dieta suplementada com bagaço de cana-de-açúcar.
- ✓ Determinar a diversidade funcional e mapear o perfil metabólico do microbioma ruminal e o seu papel na degradação de biomassa por meio do sequenciamento do DNA total.
- ✓ Determinar a diversidade funcional e mapear o perfil metabólico do microbioma ruminal por meio do sequenciamento do RNA total.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Subordem Ruminantia

Os ruminantes são animais herbívoros e pertencentes a subordem Ruminantia, que engloba seis famílias: Tragulidae, Moschidae, Bovidae, Giraffidae, Antilocapridae e Cervidae (NOWAK, 1999). Membros da subordem Ruminantia possuem ampla distribuição geográfica e são encontrados em diversos climas e habitats (VAN WIEREN, 1996). Os primeiros ruminantes a serem domesticados pelo homem foram os ovinos há aproximadamente 11000 a.c. (ZEDER, 2008). A domesticação destes animais foi devida ao aumento da população humana e sua produção resumia-se no fornecimento de carne e leite. Entretanto, a caça excessiva da população selvagem destes ruminantes sofreu uma queda significativa na natureza e o número destes indivíduos foi rapidamente reduzido (ZEDER e HESSE, 2000).

A população atual dos ruminantes é de ~200 espécies, com uma população de 75 milhões de ruminantes selvagens e 3,5 bilhões de animais domesticados (HACKMANN; SPAIN, 2010). A família Bovidae representa 95% da população domesticada e engloba os bovinos, caprinos e ovinos (NOWAK, 1999). No mercado atual, os bovinos e ovinos são os ruminantes domesticados que possuem o maior número de espécies de importância econômica responsáveis pela produção de carne e leite.

Ovis aries são mamíferos ungulados de origem asiática (ZEDER; HESSE, 2000) e a fisiologia de *Ovis aries* pode variar no comprimento do corpo (90-140 cm), no peso (40-130 kg) e no tempo de vida (5-10 anos de idade). *O. aries* são ruminantes versáteis e encontrados em vários habitats e preferem gramíneas (ricos em carboidratos estruturais) como dieta principal, mas podem se alimentar de dietas ricas em amido (VAN VUREN; COBLENTZ, 1987).

2.2 O trato digestivo dos ruminantes

O sistema digestório dos ruminantes possui quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso, como apresentado no diagrama na Figura 1.

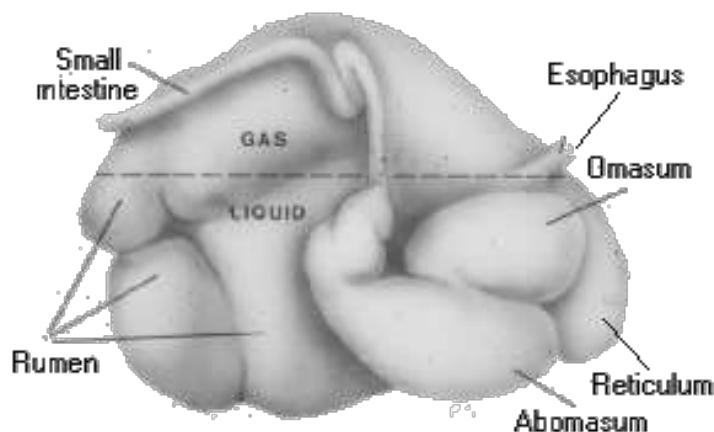


Figura 1 - Sistema digestório dos ruminantes esquematizando os quatro compartimentos
 Fonte: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu>

Os órgãos coletivamente representam cerca de 3/4 da cavidade abdominal. O rúmen é o maior órgão dos ruminantes e abriga uma comunidade microbiana capaz de converter energia de forma eficiente a partir de celulose e outros componentes de parede celular de plantas (HUNGATE, 1966). O rúmen é uma câmara fermentadora anaeróbica, com pH entre 5,5 e 7, temperatura de ~38-40°C (HUNGATE, 1966). Os ruminantes não possuem enzimas de degradação de material de planta lignocelulítica recalcitrante, contudo estes animais possuem uma relação simbiótica de sucesso com os micro-organismos presentes no rúmen (VAN SOEST, 1994). A comunidade microbiana presente neste ambiente são os responsáveis pela despolimerização de parede celular vegetal e portadores de um arcabouço enzimático de extrema eficiência (BERGMAN, 1990).

2.3 A fermentação microbiana no microbioma ruminal

A fermentação microbiana no rúmen é realizada por grupos de micro-organismos representados por Bactérias, Arquéias, Fungos, Protozoários e Vírus (HUNGATE, 1966). A complexa comunidade microbiana tem entrada no rúmen de recém-nascidos via contato materno (leite) e também contato com outros ruminantes ao seu redor (ZIOLECKI; BRIGGS, 1961). Os micro-organismos no rúmen são responsáveis pela fermentação de carboidratos e proteínas, os quais são convertidos em moléculas mais simples, tais como açúcares e aminoácidos (WEIMER, 1996). A fermentação microbiana ruminal ocorre em condições anaeróbicas, como consequência açúcares são metabolizados em ácidos graxos voláteis, ácido lático, dióxido de carbono e metano (BERGMAN, 1990).

Estudos de cultivo, isolamento e caracterização nutricional tem fornecido informações significativas a respeito da diversidade do microbioma ruminal. São mais de 200 espécies de

bactérias, pelo menos 100 espécies de protozoários e fungos identificados em técnicas baseadas em cultivo (CANNAS et al., 2004). A caracterização da diversidade microbiana ainda é limitada, pelo fato da maioria dessas espécies ainda não ser cultivada (HUNGATE, 1966). A dieta (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2012) e a genética do hospedeiro (BENSON et al., 2010; KITTELMANN et al., 2014) podem interferir significativamente na diversidade microbiana ruminal e selecionar grupos específicos.

2.4 O domínio Bactéria

A abundância de bactérias ruminais tem sido reportada ser acima de 10^{12} por grama de conteúdo ruminal (JAMI; MIZARAH, 2012), contudo, a abundância pode variar por animal. As bactérias ruminais representam possivelmente o mais importante e diverso grupo microbiano. São classificadas de acordo com a atividade metabólica: fibrolíticas (e.g., *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, e *Butyrivibrio fibrisolvens*), amilolíticas (e.g., *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*), proteolíticas (e.g., *Prevotella* spp.), lipolíticas (e.g., *Anaerovibrio lipolytica*), produtoras de lactato (e.g., *S. bovis* e *S. ruminantium*) e consumidoras de lactato (e.g., *Megasphaera elsdenii*) (HUNGATE, 1966).

O isolamento de micro-organismos ruminais tem sido descrito por mais de 50 anos (BRYANT, 1958; HUNGATE, 1966), (principalmente bactérias). As principais e mais estudadas bactérias ruminais são: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens* e *Eubacterium ruminantium* (STEWART; FLINT, BRYANT, 1997). Estas bactérias são caracterizadas como fibrolíticas, ou seja, participam da despolimerização da parede celular vegetal (KOIKE; KOBAYASHI, 2001).

No rúmen de *Ovis aries*, os filos Bacteroidetes e Firmicutes são os maiores representantes (LOPES et al., 2015). Estes dois filos possuem espécies bacterianas especialistas na degradação de biomassa vegetal (STEVENSON; WEIMER, 2007). Em Bacteroidetes, o gênero *Prevotella* é descrito como o mais abundante em ruminantes (STEVENSON; WEIMER, 2007). Em humanos, estudos tem apontado que o gênero *Prevotella* é fortemente associado a dietas ricas em carboidratos (WU et al., 2011). Alguns membros deste gênero possuem enzimas hemicelulolíticas e proteolíticas (MATSUI et al., 2000), além disso, podem degradar xilana, pectina e amido (KRAUSE et al., 2003; KABEL et al., 2011).

Em Firmicutes, o gênero *Ruminococcus* são caracterizadas como bactérias fibrolíticas e importantes na conversão de alimentos ricos em fibra a ácidos graxos voláteis para o hospedeiro animal (CARBERRY et al., 2012). Este gênero representa 10% da comunidade microbiana presente no rúmen de bovinos e são cruciais na degradação da celulose (STEVENSON; WEIMER, 2007). Entre os ruminococci, a digestão da celulose é bem descrita em *R. flavefaciens* (BERG et al., 2009). A aderência na fibra por *R. flavefaciens* é mediada por um complexo multi enzimático chamado celulosoma (RINCON et al., 2005). O celulosoma possui proteínas andaimas que ancoram e coordenam enzimas fibrolíticas através de domínios interligados chamados ‘dockerin’ e ‘cohesin’ (FLINT et al., 2008).

2.5 O domínio Arquéia

As arqueias no rúmen são produtoras de metano e estão afiliadas ao filo Euryarchaeota e mais de 90% de sequências de arqueias ruminais estão relacionadas com os gêneros *Methanobrevibacter* (>60%), *Methanomicrobium* (~15%) e um grupo ainda não cultivado comumente referido como Cluster C (16%). Dentro do gênero *Methanobrevibacter*, existe duas espécies que são dominantes: os *Methanobrevibacter* sp. e *Methanobrevibacter ruminantium*. A abundância dessas espécies no rúmen é dependente do gene alvo estudado (*rrs* ou *mcrA*), ou seja, resultados de PCR em tempo real reportam valores entre 10^8 a 10^{10} o número de cópias por grama de conteúdo ruminal (MOSONI et al., 2011).

As espécies metanogênicas crescem utilizando os elétrons derivados do H_2 como fonte de energia e reduzem o CO_2 para a formação de CH_4 (HUNGATE et al., 1970). Estes microorganismos são encontrados no líquido, aderidos na fibra ruminal, em protozoários e no epitélio ruminal. A taxa de crescimento das arqueias metanogênicas varia de acordo com as frações ruminais, animal e a taxa de passagem através do sistema (JANSSEN; KIRS, 2008).

2.6 Protozoários ruminais

A população de protozoários é predominantemente de ciliados e representa 10^5 a 10^6 células por grama de conteúdo ruminal (HUNGATE, 1966) e o gênero *Entodinium* é o representante mais abundante deste grupo. Os protozoários no rúmen estão envolvidos no controle populacional de bactérias (NAGARAJA; TOWNE; BEHARKA, 1992), auxiliando na manutenção do pH ruminal (DEHORITY, 2005). Os protozoários se alimentam de carboidratos e celulose (FINDLEY et al., 2011) e por consequência liberam H_2 no ambiente, o qual é utilizado pelas metanogênicas (SKILLMAN et al., 2006; TYMENSEN et al., 2012).

Vários estudos têm acessado a diversidade de protozoários no rúmen via técnicas moleculares com o desenho de *primers* específicos para este grupo (SKILLMAN et al., 2006; TYMENSEN et al., 2012). Sylvester et al. (2004) observaram que a dieta interfere diretamente na diversidade de protozoários no rúmen e no duodeno e identificaram as espécies predominantes como *Epidinium caudatum*, *Entodinium caudatum*, e *Isotricha prostoma*. Outros gêneros de protozoários tem sido descrito como por exemplo: *Dasytricha*, *Ostracodinium*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Eudiplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex* e *Polyplastron*.

2.7 Fungos anaeróbicos ruminais

Os fungos anaeróbicos do rúmen são representados pelo filo *Neocallimastigomycota* e são conhecidos por degradarem lignocelulose de plantas (ORPIN, 1975). O filo *Neocallimastigomycota* abriga seis gêneros: *Orpinomyces*, *Caecomycetes*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces*, *Piromyces* e *Neocallimastix*, cada um destes gêneros apresenta características morfológicas distintas (HO; BARR, 1995; OZKOSE et al., 2001; GRIFFITH et al., 2009).

Os fungos no rúmen possuem organelas especialistas chamadas de hidrogenossomos e acopladas ao metabolismo da glicose para a produção de energia sem oxigênio. Estas organelas possuem características em comum com mitocôndrias (VAN DER GIEZEN, 2002) e possivelmente derivadas delas (EMBLEY et al., 1997; VONCKEN et al., 2002; MULLER et al., 2012). O hidrogenossomo contém a enzima hidrogenase responsável pela produção de H₂, CO₂, lactato e acetato, como produtos metabólicos finais da fermentação anaeróbica fúngica de polissacarídeos de parede celular vegetal (BRUL; STUMM, 1994; THEODOROU et al., 1996; MULLER et al., 2012).

O genoma da linhagem C1A de *Orpinomyces* sp. foi sequenciado recentemente e forneceu informações valiosas sobre a diversidade de enzimas ativas na degradação de carboidratos (YOUSSEF et al., 2013) e muitas destas enzimas teriam sido adquiridas por transferência horizontal de genes oriundas de bactérias ruminais.

A maquinária celulolítica de fungos anaeróbicos consiste de ambas as enzimas livres, bem como os complexos multienzimáticos (WILSON; WOOD, 1992), conhecidos como celulosomas (KRAUSE et al., 2003; JOBLIN et al., 2010). Essa característica tem chamado atenção, tanto para aplicação biotecnológica, bem como para suplemento microbiano para produção de ruminantes como meio de melhorar o uso de forragens de baixa qualidade como fonte de alimento. A inclusão de culturas de fungos anaeróbicos em dietas tem sido feita e o

resultado aponta melhora de consumo de ração, taxa de crescimento animal, eficiência alimentar e aumento na produção de leite (GAO et al., 2013).

2.8 Fatores que alteram o microbioma ruminal

O microbioma ruminal responde rapidamente a mudanças na dieta, idade, uso de antibióticos, localização geográfica, estações do ano, regime de dieta e na saúde do animal hospedeiro (KOCHERGINSKAYA; AMINOV; WHITE, 2001). Henderson et al. (2015) mostraram que o microbioma ruminal é dominado por um *core* de micro-organismos mal caracterizados, especialmente as bactérias (HENDERSON et al., 2015). Vários estudos apontam a inferência genética do hospedeiro no microbioma ruminal (LI et al., 2009). O microbioma ruminal é caracterizado por fortes interações metabólicas entre os micro-organismos que facilitam a fermentação do material vegetal a produtos úteis para o hospedeiro (RUSSEL; RYCHLIK, 2001).

A manipulação nutricional pode afetar substancialmente a saúde e a produção de leite e carne em bovinos (WHITAKER et al., 1993). O tipo de dieta e sua composição é um fator chave, podendo mudar a fermentação ruminal e direcionar vias metabólicas visando grupos de micro-organismos específicos (HART et al., 2008). Na dieta de ruminantes, os carboidratos constituem a maior proporção e fonte energética para os micro-organismos ruminais (HALL; HEREJK, 2001). No gado leiteiro os carboidratos representam de 70 a 80% da dieta (NOCEK; RUSSEL, 1988). No rúmen, os micro-organismos possuem um complexo conjunto enzimático especial na hidrólise de carboidratos recalcitrantes, tais como hemicelulose e celulose, os quais requerem diferentes famílias de enzimas (BRULC et al., 2009). A fermentação de carboidratos chega a 90% no rúmen, contudo, em algumas circunstâncias pode ocorrer uma rápida taxa de passagem do alimento e uma quantidade significativa pode ocorrer no intestino delgado e grosso (CANNAS et al., 2004).

A fração de carboidratos dos alimentos é definida de acordo com os métodos químicos e enzimáticos utilizados para disponibilizar a quantidade correta para os ruminantes (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). As frações de carboidratos não estruturais (CNE) em uma dieta incluem ácidos orgânicos, mono e oligossacarídeos, amidos e outros carboidratos de reserva. A fração de carboidratos estruturais é caracterizada através de fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido (FDA). O FDN inclui uma matriz rica em celulose, hemicelulose e lignina, os maiores componentes de parede celular vegetal (VAN SOEST et al., 1963). A fração de FDN, FDA e celulose são quantificadas por métodos descritos por Van

Soest et al. (1991). A fração de FDN, FDA e hemicelulose são calculadas por métodos descritos por Mertens (1992).

A concentração de monossacarídeos, glicose e frutose é estimada de 1 a 3% em gramíneas e plantas herbáceas, já a sacarose é de 2 a 8% (SMITH, 1973). A molécula de sacarose é formada por α -D-glicose e β -D-frutose via ligações 1, 2 glicosídicas (BARRAS; MOORE; STONE, 1969). A sacarose sofre degradação via sacarose fosforilase (EC 2.4.1.7) e no rúmen, *Streptococcus bovis*, *Lachnospira multiparus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus vitulinis*, *Clostridium longisporum*, *Eubacterium cellulosolvens*, e alguns cepas de *Eubacterium ruminantium*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella spp.*, *Selenomonas ruminantium*, *Pseudobutyrvibrio ruminis* e *Succinivibrio dextrinosolvens* são descritos por utilizar a sacarose como fonte de energia (STEWART; FLINT; BRYANT, 1997). No caso da maltose os *Ruminobacter amylophilus* e oligossacarídeos os *Actinomyces ruminicola* (AN et al., 2006).

2.8.1 Pectina e sua despolimerização

As pectinas são constituídas de arabinose e galactose (JUNG, 1997) e encontrados na lamela média de plantas (VAN SOEST, 1994). A enzima pectina liase (EC 4.2.2.10) (WOJCIECHOWICZ, 1982) é responsável pela degradação da pectina no rúmen. *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Fibrobacter succinogenes*, *S. bovis* e *Lachnospira multiparus* (CZERKAWSKI; BRECKENRIDGE, 1969; GRADEL; DEHORITY, 1972; BALDWIN; ALLISON, 1983) são reportados na literatura em utilizar a pectina e de ser primariamente fermentada a acetato (DUŠKOVÁ, 1999).

2.8.2 Amido e sua complexa composição

O amido é constituído por dois polímeros complexos: a amilose e amilopectina (CHESSON, 1997). A amilose é quimicamente composta por polímeros de α -1,4 glicose e sofrem o ataque enzimático por α -amylases (EC 3.2.1.1). A amilopectina é uma molécula altamente ramificada de ligações α -1,4 glicose e sofrem o ataque enzimático via ação da β -amilases (50%), glicohidrolases (EC 3.2.1.3 e EC 3.2.1.41) e as isoamilases (EC 3.2.1.68) resultando em maltose. A maltose e a maltodextrinas são degradadas a glicose via α -glicolases (EC 3.2.1.20) (HOBSON, 1989). *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Succinimonas amyolytica* e muitas cepas de *Selenomonas ruminantium*,

Butyrivibrio fibrisolvens, *Eubacterium ruminantium* e *Clostridium* ssp., todos os protozoários entodiniomorfos e fungos são amilolíticos (CHESSON, 1997).

Dietas com altas concentrações de amido propiciam o desenvolvimento de espécies de bactérias produtoras de propionato (FRANCE; DIJKSTRA, 2005). A fermentação do amido no rúmen depende da estrutura da molécula (taxa amilose/amilopectiana), fonte vegetal, alterações mecânicas (processo de mastigação), composição da dieta, a quantidade de dieta consumida por unidade de tempo e grau de adaptação da microbiota ruminal (EASTRIDGE, 2006).

2.8.3 A digestão dos carboidratos estruturais no rúmen

Os carboidratos estruturais são menos digeríveis que os carboidratos não fibrosos e possui correlação negativa com a concentração de energia na dieta para os ruminantes. Contudo, estes carboidratos são importantes para a ruminação, o fluxo de saliva, o tamponamento no rúmen e na saúde da parede ruminal. O tempo de retenção de vegetal fibroso no rúmen é suficientemente longo (~48 horas ou mais, dependendo da espécie) e permitindo o crescimento de populações fibrolíticas e a extensiva utilização da fibra vegetal contribui para uma maior porção de energia ao hospedeiro (VAN SOEST, 1994).

A lignina é um complexo polímero fenólico e indigerível pelos micro-organismos presentes no rúmen (VAN SOEST, 1994). A razão pela difícil degradação da lignina e acessibilidade de hidrolases secretadas pelos micro-organismos do rúmen é a presença de fortes ligações covalentes entre a lignina e a parede celular de polissacarídeos (CHESSON, 1993).

A concentração de hemicelulose em folhas de forragens e ervas varia de 6 a 22% (com base em matéria seca) (SCHÄDEL et al., 2010). A hemicelulose é composta de complexos heteropolímeros e que varia consideravelmente na composição primária e grau de ramificação podendo ser agrupados em quatro classes: xilanas, xiloglicanas, mananas e β -glicanas (EBRINGEROVA et al., 2005). *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e algumas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Bacteroides rumenicola* são considerados micro-organismos responsáveis pela maior parte de degradação da hemicelulose (HESPELL, 1988). A degradação de hemicelulose no rúmen varia de 16 a 90%, dependendo da sua composição (PIGDEN; HEANEY, 1969; COEN; DEHORITY, 1970).

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal e está embebida em uma matriz de biopolímeros estruturais conhecidos como hemicelulose e lignina (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999; MARCHESSAULT; SUNDARARAJAN, 1993; VAN SOEST, 1994). A hidrólise completa da celulose requer a atividade sinérgica de uma ampla variedade de enzimas (RUSSEL, 2001). Dietas com altos teores de forragem estimulam o crescimento de espécies de bactérias produtora de acetato, propionato e butirato, com uma proporção de 70:20:10 (FRANCE; DIJKSTRA, 2005). A degradabilidade da celulose de algumas plantas no rúmen pode variar, dependendo da espécie de planta, no caso da forragem variar entre 25 a 90% (PIGDEN; HEANEY, 1969).

A digestão da fibra pode auxiliar na manutenção do pH (6,2 a 6,8) e aumentar a superfície de contato para a colonização (CHESSON; FORSBERG, 1997). Os fungos apresentam um papel ativo e positivo na degradação da fibra vegetal (WILLIAMS; ORPIN, 1987). O teor de celulose em matéria seca vegetal pode representar de 35 a 50% (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999). E é quimicamente composta por polímeros homogêneos de β -1,4-D-glicose ligadas por ligações β -1,4 glicosídicas. As fibrilas de celulose possuem regiões amorfas e cristalinas, formadas por cadeias de celulose e cada uma delas possuem entre 500 e 14.000 unidades de β -1,4-D-glicose (BAZOOYAR; MOMANY; BOLTON, 2012).

A digestão da celulose exige a combinação de muitas classes de celulases, incluindo a atividade de endoglucanases (EC 3,2,1,4), que cortam aleatoriamente a cadeia de celulose em locais amorfos internos, as exoglucanases (EC 3.2.1.74 e EC 3.2.1.91), atuantes na redução de extremidades da celulose, liberando a celobiose e a glicose como produtos principais e as glicosidades (EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose e a celodextrinas solúveis em glicose (LYND et al., 2002). *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* são consideradas as bactérias celulolíticas predominantes no rúmen. Estes micro-organismos são ativos em duas atividades católicas: i) a hidrólise da celulose (despolimerização) e a ii) utilização eficiente de produtos hidrolíticos (celodextrina) (KOIKE; KOBAYASHI, 2001). *Fibrobacter succinogenes* é responsável pela solubilização de cadeias cristalinas da celulose (SHINKAI; KOBAYASHI, 2007) e produzem primariamente succinato (precursor de propionato), além de poucas quantidades de acetato, *Ruminococcus flavefaciens* produz primariamente acetato e poucas quantidade de succinato, o succinato é convertido a propionato pelas *Selenomonas ruminantium* (WEIMER et al., 1999). A abundância de espécies celulolíticas ruminais que digerem a celulose no rúmen é de ~5-10%, a maior

limitação de degradação de celulose pelos micro-organismos no rúmen é a associação da celulose com a lignina (WEIMER, 1996).

2.9 Ácidos graxos voláteis

Os ácidos graxos voláteis são os produtos finais da fermentação microbiana no rúmen (BERGMAN, 1990). No líquido ruminal os AGVs predominantes são acetato, propionato, butirato, isobutirato, valérico, isovalérico e outros geralmente presentes em pequenas quantidades. O acetato, propionato e butirato produzem ATP no metabolismo intermediário e também são usados como precursores na síntese de glicose (HUNTINGTON, 1990).

Vários estudos a respeito de sistemas de tecidos têm mostrado que as propriedades funcionais relacionadas a saúde do leite e da carne bovina estão ligadas a presença de ácido rumênico (conjugado ao ácido linoleico) e o ácido vacênico (FIELD et al., 2009).

A gordura do leite fornece 30% de gordura consumida pelos seres humanos e é a fonte alimentar mais rica e natural de ácidos graxos (RITZENTHALER et al., 2001). Niwińska, Bilik e Andrzejewski (2011) observaram que a produção e leite têm indicado que a concentração de bons ácidos gordos no leite pode ser controlada pela razão amido:fibra na dieta de vacas leiteiras.

2.10 Emissão de metano

A produção de metano em ruminantes representa uma perda de 2 a 14% de energia e substancial contribuição para emissão de gás de efeito estufa. Vários estudos têm buscado estratégias de redirecionar o fluxo ou redirecionar para um aceptor de elétrons alternativo no intuito de diminuir a produção de metano no rúmen (MCALLISTER et al., 1996).

As arqueias metanogênicas são o grupo responsável pela produção de metano (JANSSEN; KIRS, 2008; LIU; WHITMAN, 2008), utilizando produtos finais da fermentação de outros micro-organismos, particularmente o H₂ como substrato. O aumento de H₂ no microbioma ruminal esta correlacionado com protozoários e alguns micro-organismos fibrolíticos (HACKSTEIN et al., 2001). Por sua vez, a produção de metano é dependente da composição de carboidratos na dieta, ou seja, uma oferta excessiva de nutrientes ao ruminante resulta em um aumento de resíduos excretados no ambiente. A seleção adequada de carboidratos na dieta ou ração e a utilização da proporção de carboidratos não fibrosos e estruturais, podem auxiliar na redução de dióxido de carbono e hidrogênio que é dos principais precursores de produção de metano no rúmen (MITSUMORI; SUN, 2008).

2.11 Estudos moleculares do microbioma de ruminantes

A ecologia microbiana teve um imenso avanço com o desenvolvimento de técnicas moleculares para a caracterização da comunidade microbiana via o sequenciamento de subunidades do gene 16S ribossomal (rRNA) (McCANN; WICKERSHAM; LOOR, 2014). Este avanço tem auxiliado com rapidez e robustez na classificação de novas espécies microbianas, baseados em informações genéticas e fenotípicas. Contudo, mesmo no rúmen ou em qualquer outro ecossistema a caracterização dessas e de outras espécies de micro-organismos é um processo lento e difícil devido a necessidade de se conhecer também as exigências metabólicas de cada micro-organismo no ambiente de origem.

O interesse no microbioma ruminal se fez pela relação simbiótica entre micro-organismo-hospedeiro, os micro-organismos são os grandes responsáveis pela degradação de materiais recalcitrantes de parede celular vegetal (HUNGATE, 1966). Considerando a celulose como a molécula orgânica mais abundante no planeta Terra e a habilidade da comunidade microbiana ruminal em fermentar biomassa vegetal sem entrar em conflito com o homem. O microbioma ruminal é um reservatório altamente evoluído e diversificado de funções microbianas com uma capacidade inigualável em degradar biomassa vegetal. O uso de técnicas de sequenciamento metataxômico (regiões do gene 16S rRNA e de regiões intergênicas fúngica (ITS) rRNA) e metagenômico (shotgun) tem auxiliado em uma maior compreensão da composição e capacidade metabólica no rúmen (McCANN; WICKERSHAM; LOOR, 2014). O entendimento sobre as funções metabólicas exercidas pelos micro-organismos tem sido estendido no âmbito nutricional (produção animal) (CARBERRY et al., 2012), na busca de novas enzimas para a produção de biocombustíveis (HESS et al., 2011) e na mitigação de metano (diminuição de gases de efeito estufa) (THORPE, 2009) via a manipulação da dieta.

O sequenciamento do gene 16S rRNA bacteriano tem mostrado que independente do tipo de dieta, espécie de ruminante e idade, os filos Bacteroidetes e Firmicutes podem representar aproximadamente 80% da população bacteriana (DE MENEZES et al., 2011; HENDERSON et al., 2013; MOHAMMED et al., 2014). Já os filos Proteobacteria, Fibrobacter e Spirochaetes estão presentes, contudo em minoria (de MENEZES et al., 2011). Membros do filo Bacteroidetes são hábeis na degradação de polissacarídeos complexos, incluindo amido, xilana, pectina, galactomana e arabinogalactana (MARTENS et al., 2011). Ainda em Bacteroidetes, o gênero *Prevotella* tem sido descrito como o mais abundante no rúmen em várias condições dietéticas (STEVENSON, WEIMER, 2007; PITTA et al., 2010).

Ramsak et al (2000) mostrou que *Prevotella* possui divergência genética altamente variada e propôs que este gênero em especial possui uma ampla versatilidade funcional. *Prevotella* tem sido descrita participando na fermentação de polissacarídeos estruturais (MATSUI et al., 2000), sendo que espécies deste gênero foram encontradas tanto em frações fibrosas (KOIKE; KOBAYASHI, 2009) quanto em frações líquidas (PITTA et al., 2010) no rúmen. O filo Firmicutes possuem espécies que podem utilizar amido, celulose xilana, galactomana e hemicelulose como fonte de energia (DASSA et al., 2014). Em Firmicutes, os gêneros *Ruminococcus*, *Clotridium* e *Butyrivibrio*, estes micro-organismos possuem espécies bacterianas com diferentes mecanismos de ataque a fibra ruminal (KIM; MORRISON; YU, 2011). Em especial, o gênero *Ruminococcus* que representa ~10% da população bacteriana (PALMONARI et al., 2010) e espécies com diferentes mecanismos de aderência a fibra ruminal (MORRISON; MIRON, 2000).

Hess et al (2011), analisou o DNA metagenômico de micro-organismos aderidos a fibra ruminal incubado por 72 horas no rúmen e identificou 27.755 genes putativos carboidratoativos e 90 proteínas candidatas, das quais 57% foram ativas em substratos celulósicos. Este estudo expandiu substancialmente o catálogo de genes e genomas que participam na destruição celulósica da biomassa. Em outros estudos, Wang et al. (2011), durante análises proteômicas e transcriptômicas do rúmen, descobriram que o fungo *Neocallimastix patriciarum* W5 produziu um grande número de celulases diferentes, incluindo 48 famílias, das quais nove não são encontrados em quaisquer outros fungos.

Análises de genomas de várias bactérias conhecidas têm indicado que um número de vias metabólicas de genes órfãos é muito maior que o número de compostos conhecidos atualmente para estas bactérias (GROSS, 2007; ZERIKLY; CHALLIS, 2009). O uso da metagenômica tem provado ser uma poderosa ferramenta para a descoberta de novas biomoléculas (SIMON; DANIEL, 2009) e, neste contexto, a utilização desta abordagem tende a aumentar a capacidade da exploração da biodiversidade microbiana na busca de moléculas inéditas para aplicação biotecnológica e para o uso industrial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba/SP, Brasil, em colaboração com o Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla de acordo com os princípios da Comissão de Ética em Experimentos com Animais (número do protocolo 002/2009). Seis animais fistulados do sexo masculino da raça Santa Inês (*Ovis aries*), com idades entre 5 e 7 anos foram usados no experimento. Os animais foram divididos em dois grupos, no primeiro grupo três animais (tratamento “controle”) foram alimentados com uma dieta de manutenção constituída de milho, farelo de soja e Tifton-85 (*Cynodon* sp.) (Tabela 2). O segundo grupo de três animais (tratamento com “bagaço” de cana-de-açúcar) foi alimentado com a mesma dieta do tratamento controle, porém, 14% da porção volumosa da dieta foi substituído por bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 2).

Tabela 1 - Composição da dieta ofertada aos animais durante o experimento

Ingrediente	Dieta controle (%)	g/dia/animal	Dieta Bagaço (%)	g/dia/animal
Tifton-85 (<i>Cynodon</i> sp.)	70	136	56	1058
Bagaço cana-de-açúcar	0	0	14	265
Milho	15	284	17	321
Farrelo de soja	11	208	11	208
Sal	2	38	2	38

Foram utilizadas duas dietas que estão sumarizadas na Tabela 2. Além disso, na Tabela 3 pode ser encontrada a composição bromatológica dos ingredientes de cada dieta.

O valor de proteína bruta no bagaço de cana-de-açúcar (4,38%) foi menor do que no capim Tifton-85 (7,18%) (Tabela 3). Por isso, foi feito um aumento de 2% de farelo de milho na dieta bagaço para suprir as necessidades proteicas e energéticas dos animais pertencentes a este grupo. O bagaço de cana-de-açúcar é um dos resíduos agrícolas mais utilizados como fonte de alimento para os ruminantes e tem como principais características o elevado conteúdo de carboidratos estruturais, baixa digestibilidade e baixo teor de proteínas. Este material é uma importante fonte de fibra para o ruminante, no entanto, é restrito devido a limitações nutricionais. Bulle et al. (2002) testaram o efeito da utilização de 9, 15 e 21% de bagaço como única fonte de volumoso para taurinos cruzados e concluíram que 15% de

bagaço proporcionaram melhor desempenho dos animais. Além disso, Pereira, Ferreira e Garcia (2008) estudaram o efeito do bagaço de cana-de-açúcar e silagem de milho como fonte de fibra efetiva em dietas concentradas para novilhos em terminação, e concluíram que o bagaço pode ser utilizado como fonte exclusiva de volumoso, embora o ganho de peso e a eficiência de conversão tenham sido menores que os observados com silagem de milho, quando comparados a mesma proporção de concentrado.

Vários estudos têm apontado o uso de bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de carbono (SINGHANIA et al., 2009) para a produção de papel, fertilizantes e etanol de segunda geração. O bagaço de cana-de-açúcar tem chamado atenção pela alta quantidade de carboidratos (glicose e xilose) (CANILHA et al., 2011). A sua composição é de 45% de celulose, 27% de hemicelulose e 21% de lignina (ROCHA et al., 2011). O uso deste material é justificado por ser um resíduo lignocelulolítico gerado em grandes quantidades durante a produção industrial de açúcar e álcool no Brasil. A produção deste resíduo no Brasil é de aproximadamente 174 milhões de toneladas por ano (PROCKNOR, 2000). Atualmente, um dos maiores desafios no uso do bagaço de cana-de-açúcar pela indústria de biocombustíveis é a baixa eficiência da fermentação de biomassa lignocelulolítica em açúcares simples pelos micro-organismos.

Tabela 2 - Composição da dieta controle e da dieta bagaço utilizada nos experimentos

Experimento	Composição			Dieta controle				Kg por dia e por animal		Dieta bagaço				Kg por dia e por animal		
	FDN	PB	MS	FDN	PB	MS	%			FDN	PB	MS	%			
Feno Tifton-85 <i>Cynodon</i> sp	771,68	71,88	909,33	555,60	51,75	654,71	72	1.361		432,14	40,25	509,22	56	1.058		
Bagaço de cana-de-açúcar	928,32	43,81	597,03	0	0	0	0	0		129,96	6,13	83,58	14	265		
Milho	183,80	83,75	886,5	27,57	12,56	132,97	15	284		31,24	14,23	150,70	17	321		
Soja	270,26	478,07	907,85	29,72	52,58	99,86	11	208		29,72	52,58	99,86	11	208		
Mineral*			920			18,4	2	38		0	0	18,4	2	38		
Consumo por animal e por dia				612,90	116,90	905,95	1	1.890		623,08	113,21	861,77	1	1.890		
								Volumoso	72%					Volumoso	70%	
								Concentrado	26%					Concentrado	28%	

MS= Matéria seca; MO= Matéria orgânica; FDN= Fibra detergente neutro; FDA= Fibra detergente ácido;
EE= Extrato etéreo; PTN= Proteína

Tabela 3 - Composição bromatológica dos ingredientes da dieta ofertada aos seis animais da raça *Ovis aries* durante os 60 dias

Ingrediente	MS	MO	FDN	FDA	EE	PTN
Milho	886,5	989,29	183,8	55,1	38,55	83,75
Farelo Soja	907,85	935,43	270,26	157,43	17,37	478,07
Feno Tifton-85 sp	909,33	932,01	771,68	403,09	19,65	71,88
Bagaço de cana-de-açúcar	597,03	946,24	928,32	597,61	10,59	43,81

MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido;
EE= extrato etéreo; PTN= proteína

O experimento foi iniciado em 04 de novembro de 2012 até 08 de janeiro de 2013. A dieta foi delineada com o objetivo de enriquecer micro-organismos degradadores de bagaço de cana-de-açúcar no rúmen de ovinos. Os ingredientes da dieta foram analisados quimicamente para a quantificação dos teores de matéria seca (MS), matéria mineral, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente ácido (FDA) de acordo com Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2010), fibra em detergente neutro (FDN) segundo Mertens (2002) e lignina segundo Robertson e Van Soest (1981) (Tabela 2). As rações foram formuladas de acordo com as exigências preconizadas pelo NRC (2007) e fornecidas em mistura composta (70% de volumoso e 30% de concentrado), descritas na Tabela 3 no item resultados, os quais foram ofertadas duas vezes ao dia, pela manhã às 08 h e à tarde às 16 h.

Os seis animais foram alimentados e acompanhados por seis dias nas gaiolas metabólicas como descrito por Abdalla et al. (2012). No primeiro dia de experimento, os animais foram pesados e colocados em gaiolas individuais e mantidos até o sexto dia. Este processo foi repetido, 1, 15, 30, 45 e 60 dias após o início do experimento. Em cada coleta, cada gaiola teve suas laterais cobertas, com exceção da parte inferior, com folhas de polietileno de 0,3 mm de espessura. Orifícios de 5 cm de diâmetro foram deixados na parte dianteira e traseira da câmara para circulação de ar. Uma bomba de escape foi ligada ao orifício traseiro da câmara a fim de remover o ar anterior a um fluxo de 133 L min^{-1} (medido por um anemômetro CE Instrutherm AD-240). O ar de saída foi amostrado em balão de 5 L, revestido com película de alumínio, a 100 mL min^{-1} usando uma bomba peristáltica. A temperatura ($27 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade ($76 \pm 4,5\%$) foram medidas em intervalos regulares de 2 h. Após 23 h de coleta, 10 mL da amostra de gás foi coletada em balões e armazenada em tubos a vácuo e enviada ao laboratório para determinação de CH_4 por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2104, detector FID à $240 \text{ }^\circ\text{C}$ e coluna Shincarbon a $60 \text{ }^\circ\text{C}$) utilizando como padrão o gás metano 99%.

Nos intervalos de coleta, os animais foram mantidos separados em dois grupos e alojados em uma baía ($2,5 \text{ m} \times 1,5 \text{ m}$) dividida ao meio, providas de cocho, bebedouro e piso emborrachado (Figura 2).



Figura 2 - Local de permanência dos animais nos intervalos de coleta. A baia foi dividida ao meio para comportar os dois grupos de animais e foi provida de alimentação e água individuais para cada grupo

3.2 Amostragem do líquido e da fibra ruminal

Amostras do líquido e da fibra ruminal foram coletadas 1, 15, 30, 45 e 60 dias após o início do experimento para a caracterização do ambiente ruminal. A amostragem foi realizada 3 h após a oferta da dieta. As coletas do líquido e da fibra ruminal foram feitas separadamente, as coletas foram realizadas via fistula dos animais mantidos individualmente em gaiolas metabólicas (Figura 3A). O líquido ruminal foi coletado com uma seringa conectada a uma sonda. Foram coletados 250 mL do líquido ruminal por amostragem e armazenamos em uma garrafa térmica em torno de 38 °C (Figura 3B). Já a fibra ruminal foi coletada com uma pinça e colocada em uma caixa de isopor (Figura 3C). Amostras das fases líquida e sólida também foram colocadas em tubos de 50 mL e armazenadas a -80 °C para posterior extração de DNA. Logo após a coleta, o fluido ruminal foi levado imediatamente para verificação do pH em potenciômetro digital (DIGIMED® DM20). Além disso, duas alíquotas de 25 mL do líquido ruminal foram colocadas em frascos contendo 1,25 mL de ácido clorídrico e mantidas a -20 °C para análise de N amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

O líquido ruminal foi amostrado para análise de N-NH₃ pelo método micro-Kjeldahlji (AOAC, 1997) por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5%), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de ácido sulfúrico (0,01 N). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram separados e quantificados por meio da técnica de cromatografia gasosa, de acordo com Nocek, Hart e Polan (1987), Palmiquist e Conrad (1971), com modificações na programação da temperatura da coluna (temperatura inicial de 115°C mantida por 3 min e 20 s, 123 °C por 1 min e 25 s e 126 °C por 5 min). Após centrifugação do fluido ruminal (11.000 rpm por 30 min a 4 °C), foi coletado 800 µL do sobrenadante e adicionado 100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno) e 200 µL de ácido fórmico (P.A.). A solução de padrão externo foi preparada contendo concentrações conhecidas de cada AGCC (ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) para calibração do integrador. Um µL desta amostra foi injetado em cromatógrafo a gás Shimadzu 2014 acoplado a um detector de Ionização de Chama (FID), com uma coluna GP 10% SP-1200 H3PO480/100 Chromosorb WAW. O delineamento experimental, códigos e períodos de amostragem estão detalhados no Anexo A.



Figura 3 - Gaiolas metabólicas (A), coleta do líquido ruminal (B) e foto da fibra ruminal (C)

3.3 Contagem de protozoários

As amostras foram preparadas e a contagem de protozoários segundo metodologia descrita por Dehority, Damron e McLaren (1983). Foram feitas duas repetições, ou seja, a câmara de Neubauer foi utilizada duas vezes para a mesma amostra, garantindo assim um

total de quatro repetições por amostra. Ao final dessa etapa, calculou-se a média de protozoários pela área da câmara ($0,0025 \text{ mm}^2$). Para obter a quantidade de protozoários por mL de amostra esse valor médio foi utilizado a seguinte fórmula:

$$(1) \text{Número de protozoários / mL} = N \times 2 \times 3 \times 10000$$

Em que:

N = média de protozoários

2 = fator de correção da diluição do inóculo *in vivo*

3 = fator de correção da diluição do inóculo *in vivo*

10000 = constante

3.4 Análise do desempenho animal

3.4.1 Consumo de matéria seca

No dia de amostragem e avaliação, às 7 h, as sobras de ração de cada gaiola foram pesadas em balança eletrônica com precisão de 5 g para obtenção do consumo de matéria seca (CMS) por animal. Foram amostradas 10% das sobras colhidas do 1º ao 4º dia de cada período de coleta, as quais foram armazenadas a -20°C até a análise. A quantidade ofertada foi ajustada de acordo com as sobras diárias, o que evitou sobras superiores a 10%, garantindo o consumo voluntário máximo pelos animais, sem desperdícios.

3.4.2 Digestibilidade *in vivo*

Para a determinação da digestibilidade *in vivo* foi utilizado o método da coleta total de fezes. No 1º, 2º, 3º e 4º dia após cada coleta, às 8 h, a produção fecal total dos animais foi pesada e uma amostra de 10% deste material foi coletada e armazenada a -20°C . Ao final de cada coleta, as amostras de fezes foram divididas em duas alíquotas. Uma foi armazenada em frasco de vidro e mantida sob refrigeração a -4°C para análise da fibra vegetal e a outra, assim como a amostra da ração ofertada, foi homogeneizada por animal por coleta e armazenada a -20°C para a análise bromatológica. As amostras de fezes e urina foram analisadas para determinação da concentração de nitrato e nitrito conforme Van Zijderveld et al. (2010).

Depois de descongeladas, as amostras das rações ofertadas, das sobras e das fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 h. Em seguida, todas as amostras foram moídas em moinho do tipo Wiley (Marconi, Piracicaba, Brasil), com peneiras de crivos de um

mm e foram analisadas no LANA - CENA/USP. As determinações de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) foram realizadas segundo metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002). O N total foi determinado utilizando o Leco FP 528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI) conforme a AOAC (1997). As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos por Van Soest et al. (1991) utilizando-se α -amilase (Ankom Technology, Tecnoglobo Equipamentos Ltda) e sulfito de sódio após correção para cinza. A matéria orgânica (MO) foi calculada pela diferença entre MS e MM. Os teores de carboidratos totais (CHOT) foram calculados segundo Sniffen, O'Connor e Van Soest (1992) e os teores de carboidratos não-estruturais (CNE) foram calculados pela diferença entre CHOT – FDN.

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestório total (2) e o balanço de nitrogênio (3) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$(2) \text{DNNDT} = [(\%PB \times \text{CDPB}) + (\%CHO \times \text{CDCHO}) + 2,25(\%EE \times \text{CDEE})]$$

Sendo CDPB: coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDCHO: coeficiente de digestibilidade dos carboidratos totais; e CDEE: coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo.

$$(3) \text{Retenção de N (g/dia)} = \text{Nconsumido} - \text{Nfezes} - \text{Nurina}; \text{Retenção de N (\% N consumido)} = (\text{Nconsumido} - \text{Nfezes} - \text{Nurina}) / \text{Nconsumido}; \text{Retenção de N (\% N absorvido)} = (\text{Nconsumido} - \text{Nfezes} - \text{Nurina}) / (\text{Nconsumido} \times \text{Absorção de N}).$$

3.5 Sequenciamento de segunda geração

3.5.1 Isolamento do DNA total de fibra e líquido ruminal

Cada amostra da fibra (seis amostras) e do líquido ruminal (seis amostras) foi submetida a duas extrações independentes de DNA, as quais foram combinadas para as análises subsequentes. O isolamento de DNA foi feito com o PowerSoil[®] DNA Isolation kit (Mo Bio), a quantificação e a pureza do DNA total foi realizada por meio do NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Neste trabalho foram sequenciadas, independentemente, as regiões V3 e V6-V7 do gene 16S rRNA bacteriano e a região ITS2 fúngica.

3.5.2 Amplificação e sequenciamento da região V3

A região V3 do gene 16S rRNA de bactéria foi amplificada a partir do DNA extraído do líquido e fibra ruminal de cada animal e de cada coleta, resultando em 60 bibliotecas finais. A

amplificação para a região V3 foi realizada utilizando os *primers* 338F e 533R (HUSE et al., 2008). A amplificação do DNA extraído da fibra e do líquido ruminal foi conduzida em um termo-ciclador Veriti (Applied Biosystems, USA), para a região V3 o volume final foi de 100 μ L; 40 ng do gDNA; 0,3 pmol de cada primer; 8 μ L de DreamTaq Buffer (1X); 0,02 μ mol de dNTP's, 0,2U de DreamTaq polymerase e água Milli-Q. As condições de amplificação foram 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 min e 45 s, e uma extensão final de 72°C por 5 min.

Os *amplicons* foram tratados com NEBNext® end repair module (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA). Os produtos da reação foram purificados pela adição de dois volumes de AMPure XP beads (Beckman Coulter inc, Atlanta GA), lavadas duas vezes com etanol 70%, secos e eluídos em água. Os adaptadores foram ligados aos barcodes usando ligase T4 (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras ligadas foram amplificadas em cinco ciclos usando o kit Platinum®PCR supermix (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). A purificação e a seleção por tamanho para remover os produtos ligados <150 pares de bases (pb) foram feitas pela adição de 1,65 volumes de AMPure XP beads (Beckman Coulter inc, Atlanta GA). As *beads* foram lavadas duas vezes com etanol 70%, secadas e eluídas em água. Os fragmentos da biblioteca foram quantificados utilizando o kit de quantificação Ion library (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). A PCR de emulsão para incorporar o fragmento da biblioteca de DNA nas *beads* de sequenciamento foi realizada utilizando o Ion OneTouch™ 2 equipado com o Ion OneTouch™ 2 System Template kit (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). As amostras foram sequenciadas no Ion Torrent Personal Genome Machine com Torrent suite 3.2.1, usando o Ion chip 316 e chip 314 com o kit de sequenciamento Ion PGM™ v2 200 (Life Technologies Inc, Grand Island, NY), seguindo o protocolo do fabricante.

3.5.3 Amplificação e sequenciamento da região V6-V7

A região V6-V7 do gene 16S rRNA de bactéria foi amplificada a partir do DNA extraído do líquido e fibra ruminal de cada animal e de cada coleta, resultando em 60 bibliotecas finais. A região V6-V7 foi amplificada com os primers A967F e 1177R (WANG et al., 2009), sendo que o primer *forward* foi modificado pela adição de um PGM sequencing adapter e um barcode, separados por um espaçador “GT”. Os produtos de PCR de cada um dos animais foram marcados diferentemente usando trinta barcodes diferentes e checados em eletroforese de gel de agarose (2% m/v) quanto ao tamanho e especificidade do fragmento.

A amplificação foi conduzida em um Termo-ciclador Veriti (Applied Biosystems, USA), com um volume final de 100 μ L; 40 ng do gDNA; 0,4 pmol de cada primer; 10 μ L de DreamTaq Buffer (1X); 0,02 μ mol de dNTP's, 0,2U de DreamTaq polymerase e água Milli-Q. As condições de amplificação foram 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 45 s e 72°C por 1 min, e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Os *amplicons* foram preparados para o sequenciamento, ajustando-se as concentrações finais para 10-15 ppm e conectando-os à superfície de partículas Ion Sphere, antes da introdução no Ion-316 micro-chip. O sequenciamento foi realizado no Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA) por 130 ciclos (520 fluxos), usando o kit Ion Sequencing. *Reads* de seqüências policlonais e de baixa qualidade foram filtradas pelo software PGM e os dados exportados como arquivos FastQ e Sff.

O esquema do gene 16S rRNA com as suas 6 regiões e com as 9 regiões variáveis estão representadas na Figura 4. As posições dos dois conjuntos de *primers* utilizados neste estudo, conjunto para a amplificação da região V3 e o conjunto que se anela na região V6-7 do gene 16S rRNA estão indicadas na Figura 2.

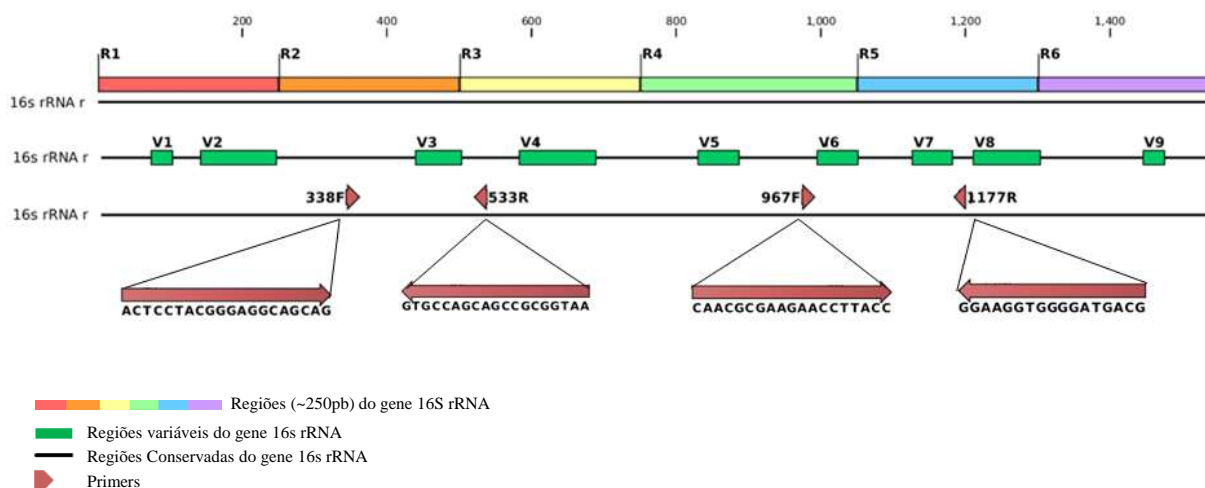


Figura 4 - Estrutura do gene 16s rRNA de *Escherichia coli*, utilizando o software CLC Genomics Workbench. (A) Seis regiões de fragmento R (R1: 1-250; R2: 251-500; R3: 501-750; R4: 751-1050; R5: 1051-1300; R6: 1301-1542). (B) Em verde estão representadas as nove regiões variáveis (V1: 69-99; V2: 133-242; V3: 433-497; V4: 576-682; V5: 822-879; V6: 986-1043; V7: 1117-1173; V8: 1243-1294; V9: 1435-1465) e as linhas pretas da seqüência representam as regiões conservadas do gene 16s RNA (YARZA et al., 2014). (C) Posição e seqüência dos *primers* no gene 16s rRNA. O fragmento R1, em vermelho, contém as regiões variáveis V1 e V2, o fragmento R2, em laranja, contém a região variável V3; o fragmento R3; em amarelo, contém a região V4; em verde o fragmento R4 contém as regiões V5 e V6; em azul, o fragmento R5 contém as regiões V7 e V8; e em roxo o fragmento R6 contém a região V9

O sequenciamento da região V3 do gene 16S rRNA de bactéria e das regiões do ITS2 e do *shotgun* foram realizados no laboratório do Dr. Christopher Dunlap, no United States Department of Agriculture (USDA), em Peoria, IL, EUA, usando o DNA extraído da fibra e do líquido ruminal de cada animal e coleta.

3.5.4 Amplificação e sequenciamento da região transcrita interna (ITS)

A região ITS2 fúngica foi amplificada a partir do DNA extraído da fibra ruminal de cada animal e de cada coleta, resultando em 30 bibliotecas finais. A amplificação para a região ITS2 foi realizada utilizando os *primers* ITS3f e ITS4r (WHITE et al., 1990). A amplificação do DNA extraído da fibra ruminal foi conduzida em um termo-ciclador Veriti (Applied Biosystems, USA), para o volume final foi de 55 µL; com 40 ng do gDNA; 25 µL de AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,2 pmol de cada primer e água Milli-Q. As condições de amplificação foram 95°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 58°C por 30 s, 72°C por 30 s, e uma extensão final de 72°C por 7 min.

Os *amplicons* foram tratados com NEBNext® end repair module (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA). Os produtos da reação foram purificados pela adição de dois volumes de AMPure XP beads (Beckman Coulter inc, Atlanta GA), e lavados duas vezes com etanol 70%, secos e eluídos com água. Os adaptadores foram ligados aos barcodes usando ligase T4 (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras ligadas foram amplificadas em cinco ciclos usando o kit Platinum®PCR supermix (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). A purificação e a seleção por tamanho para remover os produtos ligados <150 pares de bases (pb) foram feitas pela adição de 1,65 volumes de AMPure XP beads (Beckman Coulter inc, Atlanta GA). As *beads* foram lavadas duas vezes com etanol 70%, secas e eluídas com água. Os fragmentos da biblioteca foram quantificados utilizando o kit de quantificação Ion library (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). A PCR de emulsão para incorporar o fragmento da biblioteca de DNA nas *beads* de sequenciamento foi realizada utilizando o Ion OneTouch™ 2 equipado com o Ion OneTouch™ 2 System Template kit (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). As amostras foram sequenciadas no Ion Torrent Personal Genome Machine com Torrent suite 3.2.1, usando o Ion chip 316 com o kit de sequenciamento Ion PGM™ v2 400 (Life Technologies Inc, Grand Island, NY), seguindo o protocolo do fabricante.

3.5.5 Controle de qualidade e anotação dos dados de sequenciamento do gene 16S rRNA e da região intergênia fúngica (ITS2)

Para a análise com base em unidades taxonômicas operacionais (UTOs), definida por um nível de distância de 3%, usamos o pipeline Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) (CAPORASO et al., 2010). Para análise do gene 16S rRNA (regiões V3 e V6-V7) foi utilizado o banco de dados Greengenes. Para a região ITS2 foi utilizado o banco de dados UNITE (<http://unite.ut.ee/>) (KÖLJALG et al., 2005; ABARENKOV et al., 2010).

Para remover a heterogeneidade entre as amostras e regiões estudadas, tanto para o gene 16S rRNA (ambas regiões V3 e V6-V7) quanto para o ITS2 foi realizado a rarefação. Na região V3 a rarefação foi feita com 2225 sequências, na região V6-V7 com 8880 e na ITS2 com 4330. Foi verificado o índice de alfa diversidade, os quais foram determinados pelos índices de Shannon's e Chao.

As matrizes geradas no QIIME foram analisadas pelos softwares PAST 2.14 (© Hammer and Harper, 1999-2012), adotando como estimativa de similaridade o modelo 'Bray-Curtis'. Assim, foi obtida a distribuição espacial das amostras baseadas em UTOs (97% de similaridade) das regiões V3 e V6-7 do gene 16S rRNA das amostras do líquido e fibra ruminal e da região ITS2 fúngica de amostras da fibra ruminal de *O. aries*. Adicionalmente, o índice de similaridade da comunidade bacteriana e fúngica presente nas amostras foi obtido pela análise de similaridade (ANOSIM), utilizando o modelo 'Bray-Curtis' (CLARKE, 1993).

Para as análises multivariadas, foram elaboradas matrizes com as Tabelas de UTOs (amostras) para ambas regiões do gene 16S rRNA e a região ITS2 fúngica e com os parâmetros do animal. A primeira abordagem foi a Análise de Coordenadas Principais 'Constrained' (CPCA) (RAMETTE, 2007) com a matrix de abundância relativa a nível de família bacteriana de amostras do líquido e fibra ruminal, separadamente, aos 60 dias.

Na segunda abordagem, foi avaliado a relação da comunidade bacteriana e fúngica estudada com os parâmetros animais (AGCC e digestibilidade animal). Foi realizada a análise de redundância (RDA), utilizando o software Canoco 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda). Primeiramente, foi realizada uma análise de correspondência ('Detrended correspondence analysis' – DCA) para verificar o comprimento e decidir qual análise usar: 'Principal componente analysis' – PCA; 'canonical analysis' – CA; 'redundancy analysis' – RDA ou 'canonical correspondence analysis' – CCA. Para os dados ruminais, foi aplicada a análise de RDA, esta análise utiliza uma coordenação linear para correlacionar a espécie com o ambiente

por somas ponderadas das pontuações da espécie e do ambiente, sendo determinadas quais fatores ambientais foram mais significativos para explicar a variação na composição da comunidade microbiana (RAMETTE, 2007). Além disso, foi realizado o teste de significância realizado pelo teste de permutação não-paramétrico de Monte Carlo com 499 permutações, oferecendo informações suplementares sobre os efeitos das variáveis ambientais, quantificando a variância explicada por cada fator independentemente (λ) (DIAS et al., 2011).

Foi feito o teste de SIMPER ('Similarity percentage') para pesar a contribuição de cada UTO na similaridade/dissimilaridade entre as amostras (MESEL et al., 2004).

Para verificar a diferença estatística entre a frequência de enzimas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) pelo software STAMP ('Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles') versão 2.0.9 (PARKS; BEIKO, 2010).

3.5.6 Sequenciamento e controle de qualidade e anotação dos dados de sequenciamento do DNA total

Seis amostras aos 30 dias (três amostras da dieta controle e três amostras da dieta bagaço) foram sequenciadas. As bibliotecas foram preparadas usando NEBNext[®]Fast DNA de acordo com as instruções do ION TORRENT. As bibliotecas foram processadas em OneTouch 2 e enriquecidas no OneTouch 2 ES. Após o enriquecimento, as bibliotecas foram carregadas no Chip 1 P1 Proton e sequenciadas no Ion Proton.

Os dados metagenômicos gerados pelo sequenciador Ion Proton PGM (Life Technologies, USA) em formato *fast.q* foram inseridos no servidor MG-RAST (*Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (<http://metagenomics.anl.gov/>) (MEYER et al., 2008). Para a anotação e classificação taxonômica e funcional, foram utilizados os parâmetros (*default*): *Max. e-Value Cutoff*: $1e-5$, *Min. % Identity Cutoff*: 60%, *Min. Alignment Length Cutoff*: 15. As anotações taxonômicas estiveram baseadas no método *Lowest Common Ancestor (LCA)* e comparadas com os bancos de dados *M5NR* e *M5RNA*. A abundância funcional foi anotada usando a Classificação hierárquica e o banco de dados *SEED Subsystems*.

3.5.7 Sequenciamento e controle de qualidade e anotação dos dados de sequenciamento do RNA total

A extração de RNA foi feita de seis amostras (três amostras da dieta controle e três amostras da dieta bagaço) aos 60 dias pelo kit Power Microbiome RNA isolation (MoBio Laboratories, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi determinada pelo Bioanalyzer (Agilent). O enriquecimento do RNAm foi feito pelo kit RiboMinus Bacteria transcriptome isolation (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A preparação de seis bibliotecas foi realizada pelo Ion total RNA seq kit V2 protocol #4476286B (Life Technologies). Os fragmentos da biblioteca foram quantificados utilizando o kit de quantificação Ion library (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). A PCR de emulsão para incorporar o fragmento da biblioteca de DNA nas *beads* de sequenciamento foi realizada utilizando o Ion OneTouch™ 2 equipado com o Ion OneTouch™ 2 System Template kit (Life Technologies Inc, Grand Island, NY). As amostras foram sequenciadas no Ion Torrent Personal Genome Machine com Torrent suite 3.2.1, usando o Ion chip 316 com o kit de sequenciamento Ion PGM™ v2 400 (Life Technologies Inc, Grand Island, NY), seguindo o protocolo do fabricante.

Os dados metagenômicos gerados pelo sequenciador Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA) em formato *fast.q* foram inseridos no servidor MG-RAST (*Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (<http://metagenomics.anl.gov/>) (MEYER et al., 2008). Para a anotação e classificação taxonômica e funcional, foram utilizados os parâmetros (*default*): *Max. e-Value Cutoff*: 1e-5, *Min. % Identity Cutoff*: 60%, *Min. Alignment Length Cutoff*: 15. As anotações taxonômicas estiveram baseadas no método *Lowest Common Ancestor (LCA)* e comparadas com os bancos de dados *M5NR* e *M5RNA*. A abundância funcional foi anotada usando a Classificação hierárquica e o banco de dados *SEED Subsystems*.

3.5.8 Análise estatística

Para os parâmetros pH, CH₄, acetato, butirato, Protozoário, Bacteroidetes, Firmicutes, as diferenças das médias entre as dietas e cada coleta foram testadas quanto a significância utilizando a análise não paramétrica para medidas repetidas (os mesmos animais foram avaliados no tempo) com a função "f1.LD.f1" do pacote "nparLD" do R (NOGUCHI et al., 2012) no R versão 3.2.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). Nos casos em que houve efeito significativo do tipo de dieta ($P < 5\%$), a função "npar.t.test" do pacote "nparcomp" do R (KONIETSCHKE, 2012) foi utilizada para verificar diferenças significativas entre os tratamentos em cada um dos cinco períodos de coleta. Com este mesmo pacote, o teste não

paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey) foi aplicado nos casos em que houve efeito significativo do período de coleta ($P < 5\%$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 Consumo dos animais ao longo de 60 dias

Os valores de consumo de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, carboidratos não fibrosos e nutrientes digestíveis, extrato etéreo, hemicelulose, fibra detergente ácido e o consumo de nutrientes totais estão apresentados na Tabela 4. A dieta ofertada aos dois grupos de animais foi composta de 70% de volumoso.

O consumo da dieta com altos teores de fibra é controlado pela mastigação, ruminação, taxa de passagem e enchimento ruminal (MERTENS, 1997). Forragens de baixa qualidade nutricional são ricas em fibra detergente neutro indigestível (FDNi) que pode diminuir o consumo voluntário (SAMPAIO et al., 2009), como no caso do bagaço de cana-de-açúcar. No âmbito nutricional, o uso de bagaço de cana-de-açúcar tratado com NaOH tem sido testado no intuito de facilitar a hidrólise de ligações éster entre a lignina e os demais carboidratos (celulose e hemicelulose) (MOORE; JUNG, 2001). Este complexo lignocelulolítico é susceptível ao tratamento com NaOH pela presença de grande quantidade de ligações do tipo éster (VAN SOEST, 1994). Este processo tem facilitado a remoção da lignina e é caracterizado como ponto chave para o aproveitamento de resíduos lignocelulolíticos (LEHNINGER, 2011).

Tabela 4 - Consumo de nutrientes em ovinos suplementada com diferentes dietas ao longo dos 60 dias

Animais	Digestibilidade (g/Kg de matéria seca)								
	MS	MO	FDN	PB	EE	CNF	HEM	FDA	TND
I1	0,62	0,57	0,42	0,05	0,01	0,07	0,26	0,26	0,96
II1	0,83	0,74	0,52	0,09	0,01	0,10	0,31	0,29	1,24
III1	0,97	0,88	0,61	0,10	0,01	0,14	0,34	0,35	1,46
IV1	0,88	0,80	0,54	0,10	0,01	0,13	0,32	0,31	1,34
V1	0,89	0,79	0,56	0,12	0,02	0,09	0,34	0,30	1,33
VI1	0,76	0,67	0,46	0,09	0,01	0,09	0,34	0,23	1,18
I2	1,02	0,89	0,62	0,12	0,02	0,13	0,40	0,31	1,53
II2	0,84	0,74	0,49	0,11	0,01	0,11	0,33	0,26	1,29
III2	0,99	0,88	0,60	0,11	0,01	0,14	0,39	0,31	1,51
IV2	0,94	0,81	0,56	0,13	0,01	0,09	0,39	0,26	1,42
V2	0,70	0,68	0,46	0,06	0,00	0,13	0,24	0,32	1,11
VI2	0,98	0,89	0,62	0,11	0,01	0,14	0,36	0,34	1,50
I3	1,06	0,96	0,66	0,12	0,01	0,16	0,39	0,35	1,62
II3	1,03	0,93	0,66	0,11	0,01	0,14	0,38	0,36	1,56
III3	0,97	0,86	0,59	0,13	0,01	0,12	0,35	0,32	1,46
IV3	0,77	0,68	0,50	0,08	0,01	0,08	0,33	0,27	1,17
V3	0,92	0,81	0,56	0,11	0,02	0,11	0,39	0,26	1,42
VI3	0,99	0,88	0,61	0,12	0,01	0,12	0,40	0,31	1,52
I4	0,89	0,79	0,55	0,11	0,01	0,10	0,37	0,28	1,37
II4	0,92	0,80	0,56	0,12	0,01	0,10	0,37	0,28	1,39
III4	0,70	0,68	0,47	0,07	0,00	0,12	0,29	0,28	1,15
IV4	0,83	0,77	0,53	0,09	0,00	0,12	0,28	0,34	1,26
V4	1,09	0,99	0,72	0,12	0,01	0,13	0,41	0,38	1,65
VI4	1,02	0,92	0,63	0,11	0,01	0,15	0,37	0,34	1,55
I5	1,17	1,05	0,75	0,12	0,01	0,15	0,43	0,39	1,76
II5	0,48	0,40	0,28	0,04	0,01	0,05	0,25	0,13	0,75
III5	0,81	0,71	0,53	0,08	0,01	0,07	0,37	0,26	1,23
IV5	1,04	0,91	0,64	0,12	0,01	0,12	0,41	0,32	1,56
V5	0,91	0,79	0,55	0,10	0,01	0,12	0,38	0,27	1,39
VI5	0,95	0,83	0,58	0,12	0,01	0,10	0,38	0,29	1,43

*MS= matéria seca, MO= matéria orgânica, FDN= fibra detergente neutro, PB= proteína bruta, EE= extrato etéreo, CNF= carboidratos não fibrosos, HEM= hemicelulose, FDA= fibra detergente ácido e NT= nutrientes totais digeríveis

4.1.2 Variação do pH ruminal dos animais ao longo de 60 dias

Os valores médios de pH ruminal dos animais alimentados com dieta controle e dieta bagaço foram, respectivamente, 6,22 e 6,43. Além disso, somente o pH do rúmen dos animais que receberam a dieta bagaço apresentou diferenças ao longo do tempo (Figura 5B; “ANOVA-Type Statistic”, $P<0,05$), sendo significativamente maior aos 45 dias em relação ao primeiro e aos 15 dias (Figura 5B; “ANOVA-Type Statistic”, $P<0,05$). Comparando as duas dietas, verificou-se que a fermentação do bagaço de cana-de-açúcar pelos micro-organismos

fibrolíticos do rúmen de *O. aries* resultou em um valor de pH significativamente maior aos 45 dias (Figura 6; contrastes do tipo Tukey, $P < 0,05$).

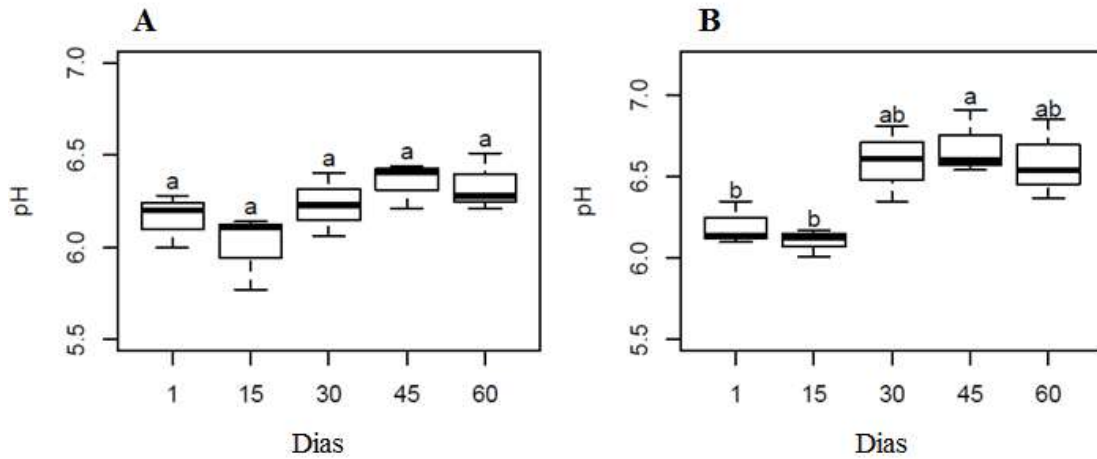


Figura 5 - “Boxplots” dos valores de pH no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A= dieta controle e B= dieta bagaço. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastos do tipo Tukey, $P < 5\%$)

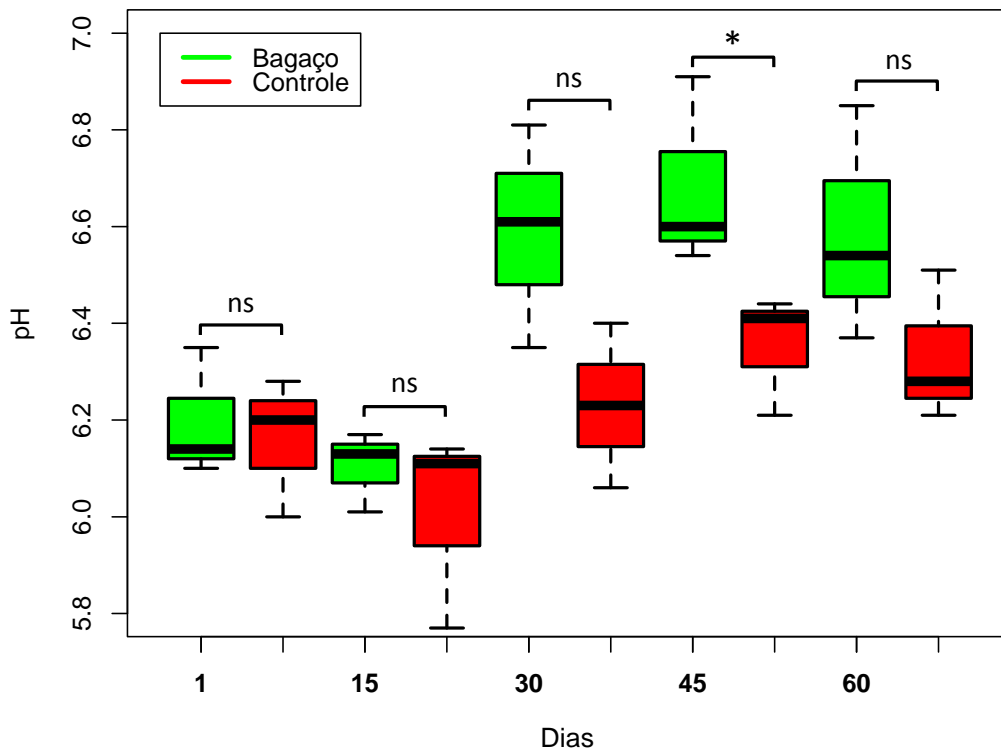


Figura 6 - “Boxplots” dos valores de pH no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negro. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P < 5\%$). Verde= bagaço e vermelho= controle

Estes resultados apontam um aumento do pH em animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar e este aumento pode estar ligado com a alta atividade de micro-organismos fibrolíticos, principalmente os celulolíticos. O bagaço de cana-de-açúcar é constituído basicamente de celulose (45%), hemicelulose (27%) e lignina (21%), a presença de celulose chega quase a metade da composição total, explicando este aumento do pH nestes animais (ROCHA et al., 2011). De fato, o crescimento de micro-organismos fibrolíticos no rúmen está intimamente ligada ao tipo de dieta e conseqüentemente afetando diretamente o pH ruminal (HARVATINE; ALLEN, 2006). Van Soest (1994) propôs que o pH do rúmen abaixo de 6,2 pode inibir a taxa de digestão e suprimir a atividade celulolítica de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroidetes succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*. Valores de pH abaixo de 6 além de inibir as bactérias fermentadoras de celulose, diminuem significativamente a eficiência da síntese de proteínas microbianas (STROBEL; RUSSELL, 1986).

A digestão da fibra é um processo que exige a adesão de micro-organismos à superfície dos carboidratos para facilitar a hidrólise antes da fermentação (WEIMER, 1996). Palmonari et al. (2010) demonstraram que o pH ruminal de bovinos alimentados uma vez ao dia diminuiu logo após a ingestão de alimento, mas aumentou poucas horas depois, devido a absorção de ácidos graxos voláteis, ruminação e salivação. Franzolin e Dehority (1996) demonstraram que animais alimentados com dietas ricas em grãos (90% de concentrado) tiveram valores de pH ruminal reduzidos. O crescimento bacteriano cessa quando a diferença entre o pH extracelular e intracelular atinge valores acima de 7,0. Essa sensibilidade é explicada quando o pH extracelular de bactérias sensíveis a ácidos, como *Fibrobacter succinogenes*, que diminui o pH intracelular, é relativamente estável, mas o aumento do gradiente de pH transmembrana provoca um acúmulo logarítmico de ânions de ácidos de fermentação intracelular (RUSSEL; WILSON, 1996). Em contraste, as bactérias ruminais resistentes a pH menor que seis (*S. bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Clostridium aminophilum* e *S. ruminantium*) diminuem o seu pH intracelular para se protegerem do influxo e acúmulo de ânions de ácidos da fermentação (RUSSEL; STROBEL; MARTIN, 1990).

4.1.3 Quantificação da emissão de metano no rúmen

A emissão de metano pelos animais foi significativamente maior no primeiro dia em relação aos 45 e 60 dias em ambas as dietas (Figura 7A-B; contraste do tipo Tukey, $P < 0,05$).

Contudo, este parâmetro não apresentou diferenças entre as dietas testadas dentro de cada coleta (Figura 8; $P < 0,05$).

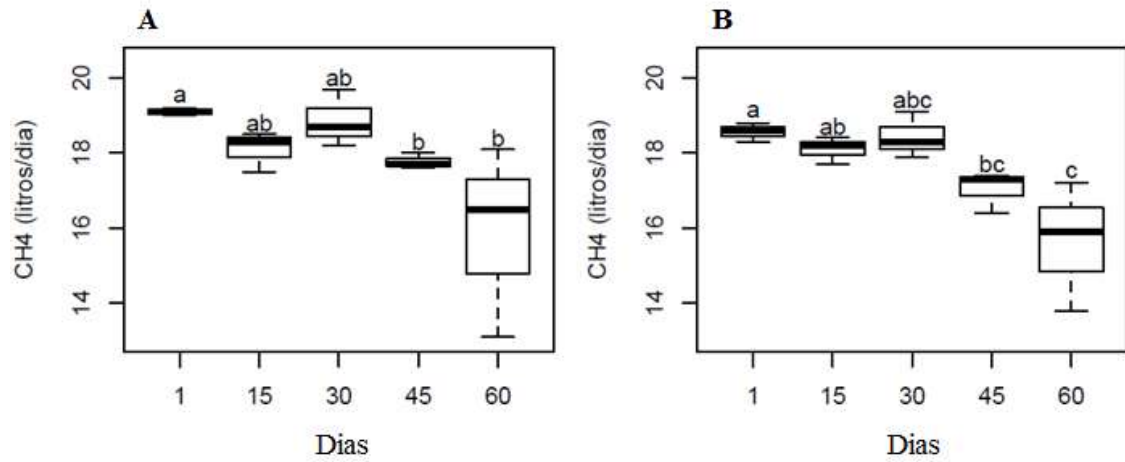


Figura 7 - “Boxplots” da emissão de metano no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A= dieta controle e B= dieta bagaço. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)

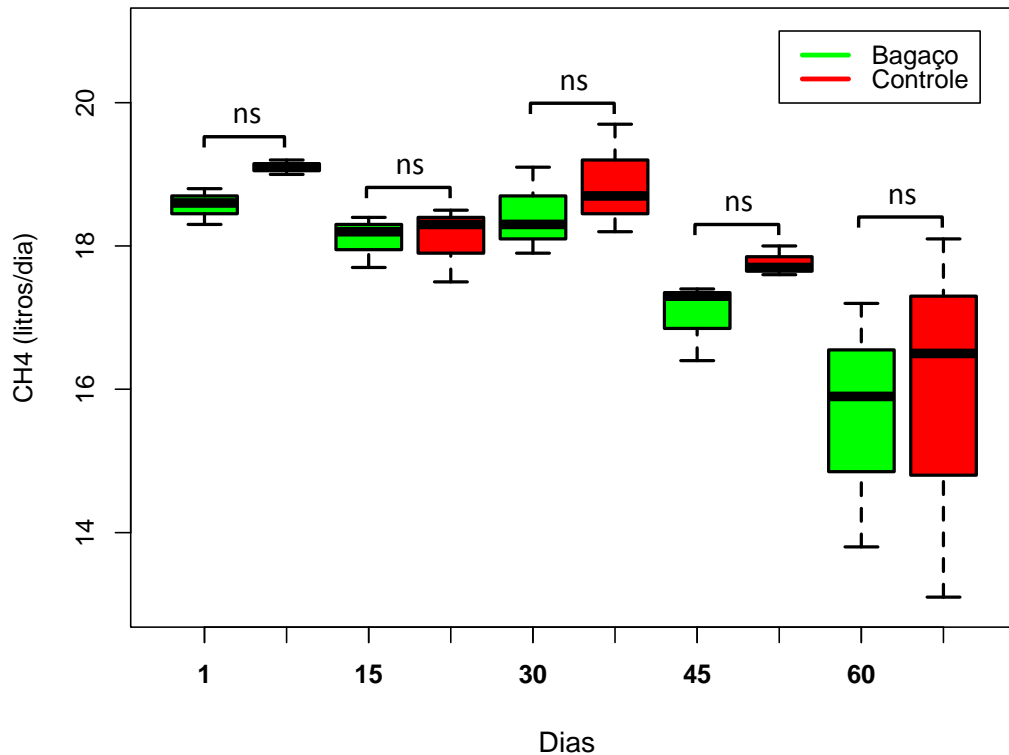


Figura 8 - “Boxplots” da emissão de metano no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P < 5\%$).

A emissão de metano foi menor em ambas as dietas controle e bagaço nas duas últimas coletas realizadas. Kittelmann et al. (2014) sugeriram que existe uma correlação significativa entre a estrutura da comunidade microbiana e as variações naturais de emissões de CH₄ em carneiros alimentados com a mesma dieta. McAllister et al. (1996) mostraram que os dois maiores grupos de micro-organismos envolvidos na fermentação ruminal são os celulolíticos e amilolíticos. Os micro-organismos amilolíticos digerem amido e geram como produto final o ácido propiônico, já os micro-organismos que utilizam a celulose como fonte de energia geram o ácido acético como produto final da fermentação (MCALLISTER et al., 1996). Basicamente a fermentação no rúmen ocorre por um processo oxidativo e durante este processo ocorre a redução de cofatores (NADH, NADPH, FADH) por reações de desidrogenação que, por sua vez, liberam o hidrogênio no rúmen (MARTIN; MORGAVI; DOREAU, 2010). Este hidrogênio é consumido por arqueias metanogênicas, as quais reduzem CO₂ em CH₄ de acordo com a seguinte equação $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ (MORGAVI et al., 2010). A produção de metano no rúmen ocorre predominantemente por esta via e a atividade das arqueias metanogênicas é essencial para o bom funcionamento deste ambiente (HUNGATE et al., 1970).

A fermentação dos substratos no microbioma ruminal produz diferentes produtos finais, tais como o acetato, propionato e butirato. A produção de acetato e butirato resulta na liberação de hidrogênio e favorece a produção de metano. Já, a formação de propionato no rúmen compete pelo uso de hidrogênio (DEMEYER; FIEVEZ, 2000), desfavorecendo a produção de metano. A emissão de metano pelos ruminantes é totalmente desfavorável ao animal, pelo fato de ser uma grande perda de energia nutricional do alimento ingerido, como também contribui para o aumento dos gases de efeito estufa (LENG, 1993). A liberação de metano pelos ruminantes é realizada via eructação causada pelo processo de fermentação microbiana no rúmen (HUNGATE, 1966) e 98% dele é liberado pelo nariz e boca (JOHNSON et al., 2000).

O aumento de produção de metano pelos ruminantes é relacionado diretamente pelo tipo de dieta e conseqüentemente por espécies de forrageiras, pela proporção de volumoso e a origem de grãos na dieta. Estes fatores têm influência direta na fermentação microbiana e na produção de metano (OLESEN et al., 2006), ou seja, a produção de metano no rúmen tende a diminuir a medida que o teor de proteína no alimento é maior (BHATTA; ENISHI; KURIHARA, 2007) e, quanto maior o teor de fibra bruta maior será a produção de metano (THORPE, 2009).

4.1.4 Disponibilização de ácidos graxos de cadeia curta pela fermentação microbiana no rúmen

No presente estudo, foi verificado que o acetato representou 70% dos AGCC no líquido ruminal, seguido pelo propionato (15,6%), butirato (10%), isovalerina (2%), valerina (1,1%) e isobutirato (0,9%) (Figura 9).

O acetato foi significativamente maior no primeiro dia e aos 15 dias em relação aos 30 dias no líquido ruminal de animais alimentados com a dieta controle (Figura 10-A1; “ANOVA-Type Statistic”, $P<0,05$). Já, este parâmetro foi significativamente maior aos 15 dias em comparação ao primeiro e aos 30 e 45 dias no líquido ruminal dos animais alimentados com a dieta bagaço (Figura 10-A2; “ANOVA-Type Statistic”, $P<0,05$). Comparando as duas dietas, observou-se que o acetado foi significativamente maior em animais alimentados com a dieta bagaço aos 60 dias (Figura 11C; contraste do tipo Tukey, $P<0,05$). Tomando este último resultado, sugerimos que a fermentação do bagaço de cana-de-açúcar por micro-organismos fibrolíticos de carboidratos estruturais é maximizada aos 60 dias.

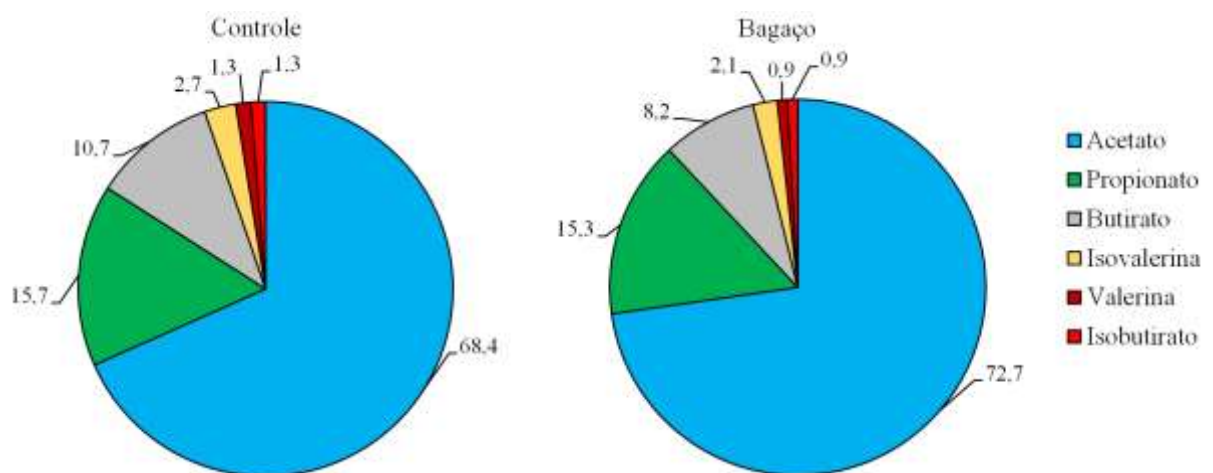


Figura 9 - Porcentagem de ácidos graxos voláteis (AGCC) presentes no líquido ruminal de *O. aries* submetidos a dieta controle e dieta bagaço ao longo de 60 dias

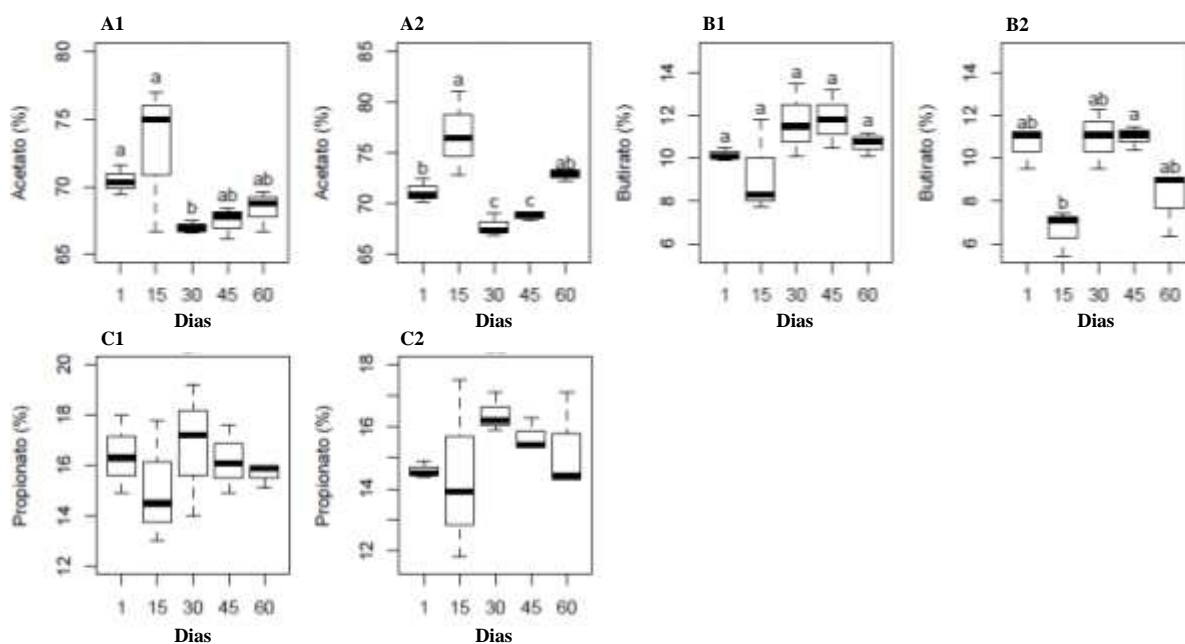


Figura 10 - “Boxplots” dos ácidos graxos voláteis no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A1= porcentagem de acetato no líquido ruminal na dieta controle; A2= porcentagem de acetato no líquido ruminal na dieta bagaço; B1= a porcentagem de butirato no líquido ruminal na dieta controle; B2= porcentagem de butirato no líquido ruminal na dieta bagaço; C1= porcentagem de propionato no líquido ruminal na dieta controle e C2= porcentagem de propionato no líquido ruminal na dieta bagaço. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)

O butirato foi significativamente maior aos 45 dias em comparação aos 15 dias no líquido ruminal de animais alimentados com a dieta bagaço (Figura 10-B2; “ANOVA-Type Statistic”, $P < 0,05$). Por outro lado, o propionato no líquido ruminal não apresentou diferenças no tempo (Figura 10-C1 e 2; “ANOVA-Type Statistic”, $P < 0,05$) e entre as dietas (Figura 11B, contraste do tipo Tukey, $P < 0,05$)

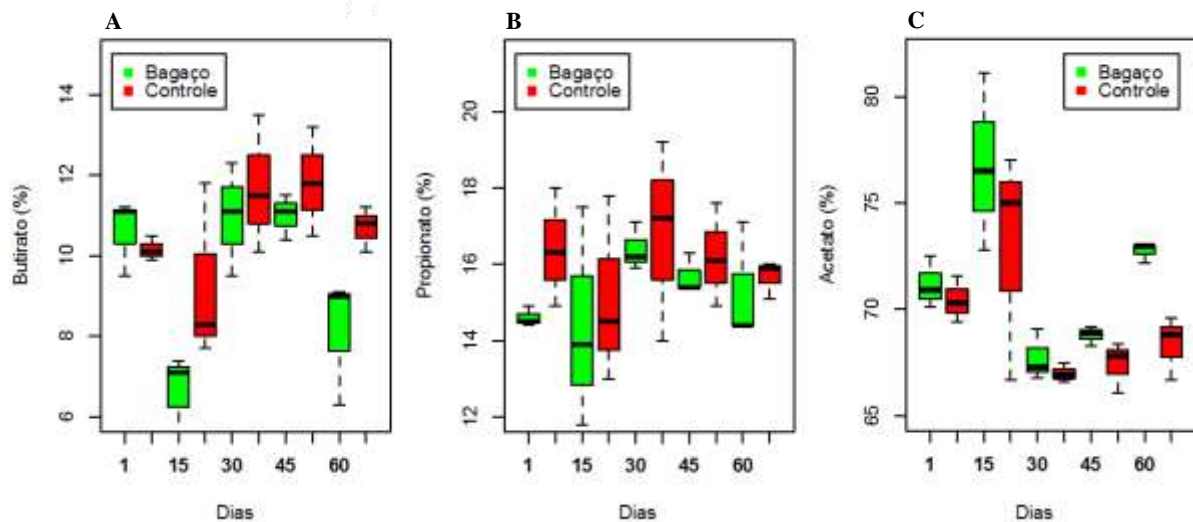


Figura 11 - “Boxplots” dos ácidos graxos voláteis no microbioma ruminal de *Ovis aries* alimentados com dois tipos de dietas ao longo do tempo. A= porcentagem de butirato no líquido ruminal; B= a porcentagem de propionato no líquido ruminal; C= porcentagem de acetato no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta (* $P < 5\%$)

A proporção molar de ácidos graxos voláteis encontrada neste estudo foi de 70:15:10 (acetato:propionato:butirato), sendo muito próximas das encontradas por (BANNINK et al., 2012). A concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen depende da composição da população microbiana que, por sua vez, é determinada pela dieta (DIJKSTRA, 1994). Dietas ricas em forragens favorecem os micro-organismos degradadores de fibra, o que aumenta a concentração de acetato:propionato:butirato, com proporção molares de 70:20:10. Por outro lado, dietas ricas em amido favorecem o crescimento de bactérias produtoras de propionato (BANNINK et al., 2008). A absorção dos AGCC em ruminantes ocorre rapidamente pela corrente sanguínea e são transportados para os tecidos periféricos, onde serão utilizados na síntese de leite (em fêmeas) ou acúmulo de tecido adiposo (em machos). O transporte dos AGCC através da membrana plasmática é realizado por famílias de transportadores chamados de monocarboxilato (KOHO et al., 2005).

4.2 Análise da dinâmica do microbioma ruminal

4.2.1 Quantificação de protozoários no líquido ruminal

Foi observado que o número de protozoários no líquido ruminal dos animais alimentados com a dieta bagaço foi significativamente maior aos 60 dias em relação aos 15 dias (Figura 12; “ANOVA-Type Statistic”, $P < 0,05$). Entre as dietas, não foi observado

nenhuma diferença significativa dentro de cada coleta (Figura 13; contraste do tipo Tukey, $P < 0,05$).

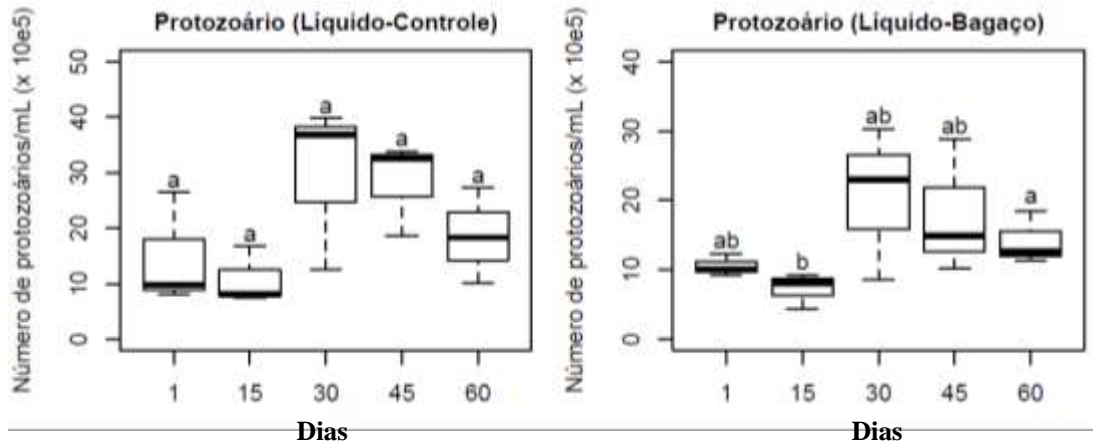


Figura 12 - Contagem de protozoários em câmara de Neubauer (média \pm erro padrão) proveniente do líquido ruminal das duas dietas testadas e ao longo de 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)

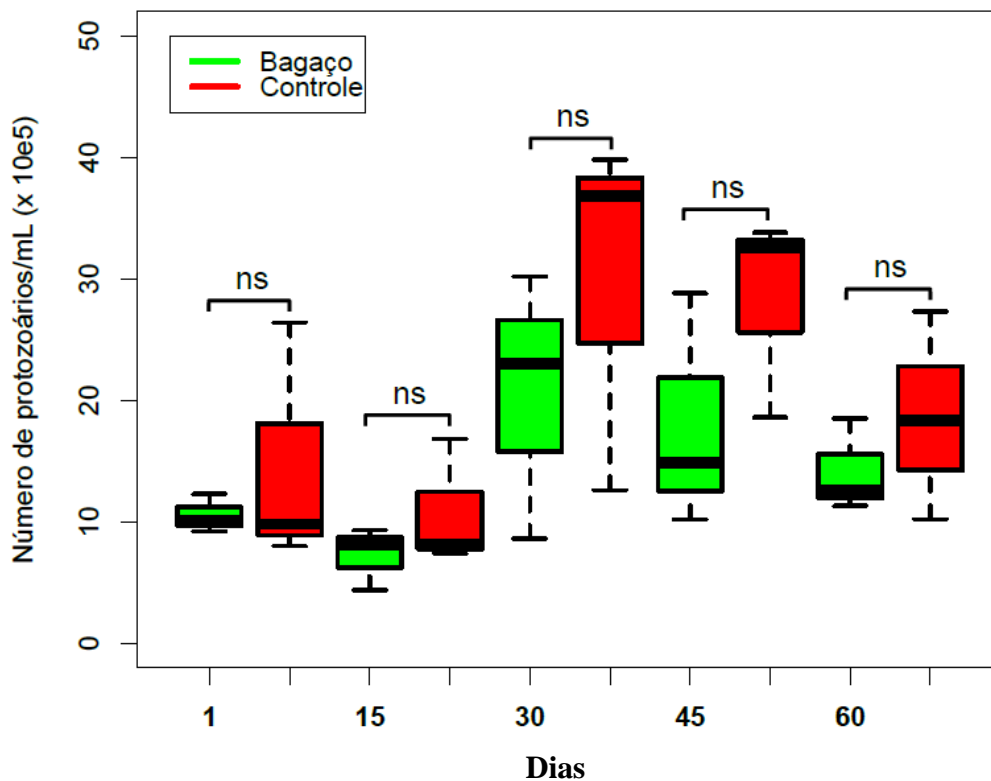


Figura 13 - Contagem de protozoários em câmara de Neubauer (média \pm erro padrão) proveniente do líquido ruminal comparando as duas dietas testadas e ao longo dos 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta (* $P < 5\%$)

Coleman (1985) reportou a habilidade fibrolítica dos protozoários no rúmen, os quais ingerem partículas de alimentos e degradam os principais componentes fibrosos dos vegetais, incluindo celulose, hemicelulose e pectina (MESSANA et al., 2010). Os protozoários são predadores vorazes, que se alimentam de bactérias para suprir suas necessidades nutricionais (BONHOMME, 1990). Os protozoários são importantes para a estabilização da fermentação ruminal (SLYTER, 1976), a qual se realiza mediante o consumo de açúcares, predação de bactérias e armazenamento de polissacarídeos, que controla o nível de substratos disponíveis na fermentação. Esta atividade pode evitar a digestão rápida dos açúcares e a produção excessiva de ácidos, auxiliando no tamponamento do ambiente ruminal, reduzindo, assim, o risco de acidose em dietas ricas em grãos ou açúcares (LOPES et al., 2002).

Um dos principais problemas relacionados aos protozoários no rúmen é a contribuição para a metanogênese por meio do fornecimento de H₂ produzido durante a fermentação dos carboidratos e servirem de hospedeiros para arqueias metanogênicas (JOUANY, 1996; NEWBOLD; LASSALAS; JOUANY, 1995).

4.2.2 Composição taxonômica e dinâmica das comunidades bacterianas e fúngicas no rúmen

O microbioma ruminal é um ecossistema único que possui uma relação simbiótica complexa, além de um sistema eficiente na despolimerização da biomassa lignocelulolítica (HUNGATE, 1966). Há várias décadas, consideráveis esforços têm sido realizados no intuito de isolar micro-organismos fibrolíticos e identificar enzimas degradadoras de lignocelulose do rúmen de várias espécies de herbívoros, principalmente os ruminantes (FLINT et al., 2008). Em bactérias, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butirivibrio fibrisolvens* e *Prevotella ruminicola* são tidas como degradadoras de lignocelulose. O genoma destas bactérias tem sido sequenciado e um amplo número de celulases, hemicelulases e esterases tem sido identificado (BERG et al., 2009; BRUMM et al., 2011; SUEN et al., 2011b). O filo Neocallimastigomycota é o maior representante fúngico no rúmen, o qual possui seis gêneros: *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Neocallimastix*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces* e *Caecomyces* (GRUNINGER et al., 2014).

A aplicação biotecnológica de bactérias e fungos anaeróbicos e suas respectivas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas ativas, tem despertado interesse na área acadêmica e industrial. E para isso, as abordagens genômica, metagenômica, proteômica e transcriptômica,

são de extrema importância para acessar os processos celulares, história evolucionária, capacidade metabólica e adaptações existentes dentro dos grupos bacterianos e fúngicos. O sequenciamento de regiões hipervariadas (V1-V9) do gene 16S rRNA e de regiões intergênicas fúngicas (ITS1 e 2) são utilizadas para avaliar a dinâmica da comunidade bacteriana e fúngica. Neste estudo, foram utilizados o sequenciamento metagenômico das regiões V3 e V6-7 do gene 16S rRNA bacteriano, da região ITS2 fúngica, shotgun e o sequenciamento metatranscriptômico.

Após a filtragem, controle da qualidade das sequências, checagem das quimeras e remoção das sequências menores que 100 pares de bases, o sequenciamento da região V3 do gene 16S rRNA bacteriana resultou em 1.677.599 sequências (Anexo C) e a região V6-7 resultou em 1.095.882 sequências (Anexo D), as quais foram usadas para análises subsequentes. Para a região ITS2 fúngica foram obtidas 590.242 sequências (Anexo E).

4.2.2.1 Análise de alfa diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas do rúmen

Os índices de riqueza bacteriana (região V3 e V6-7) e fúngica (região ITS2) baseadas em UTOs (unidades taxonômicas operacionais) foram estimadas pelo método de Ace e Chao. Para os índices de diversidade bacteriana foram determinados usando o método de Simpson e Shannon (Anexos C, D e E).

Pelas análises feitas na fibra ruminal, os animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar apresentaram valores maiores do índice Ace aos 15 dias (Figura 14; Anexo C). Já no líquido ruminal, o número de UTOs e o índice de Fisher foram maiores aos 30 dias (Figura 15).

Os valores de diversidade na região V6-7 estão representados na Figura 16 (fibra) e 17 (líquido ruminal). Aos 15 dias os animais que receberam a dieta controle apresentaram valores maiores do índice Ace (Figura 16). Já, aos 30 dias os animais que receberam a dieta bagaço apresentaram valores maiores do índice de Chao (Figura 16 e Anexo D). Ainda na região V6-7, não houve diferenças entre os índices no líquido ruminal (Figura 17).

Em relação a fungos, as amostras de fibra ruminal de animais alimentados com a dieta bagaço exibiram maior número de UTOs, assim como maiores valores dos índices de Ace, Simpson, Shannon e Fisher aos 30 dias (Figura 18) (Anexo E).

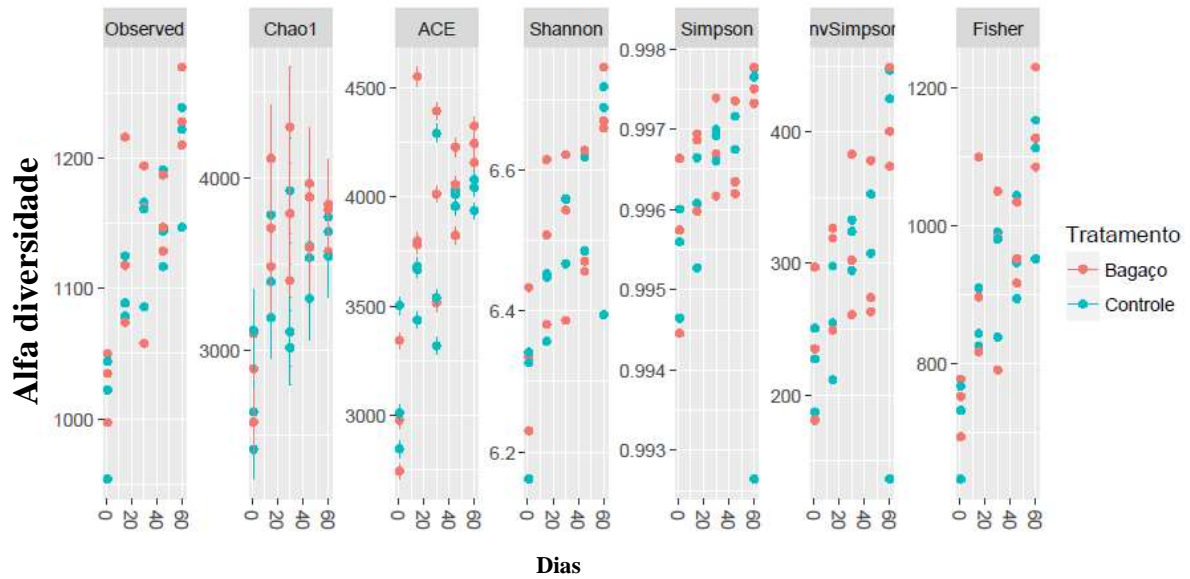


Figura 14 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle

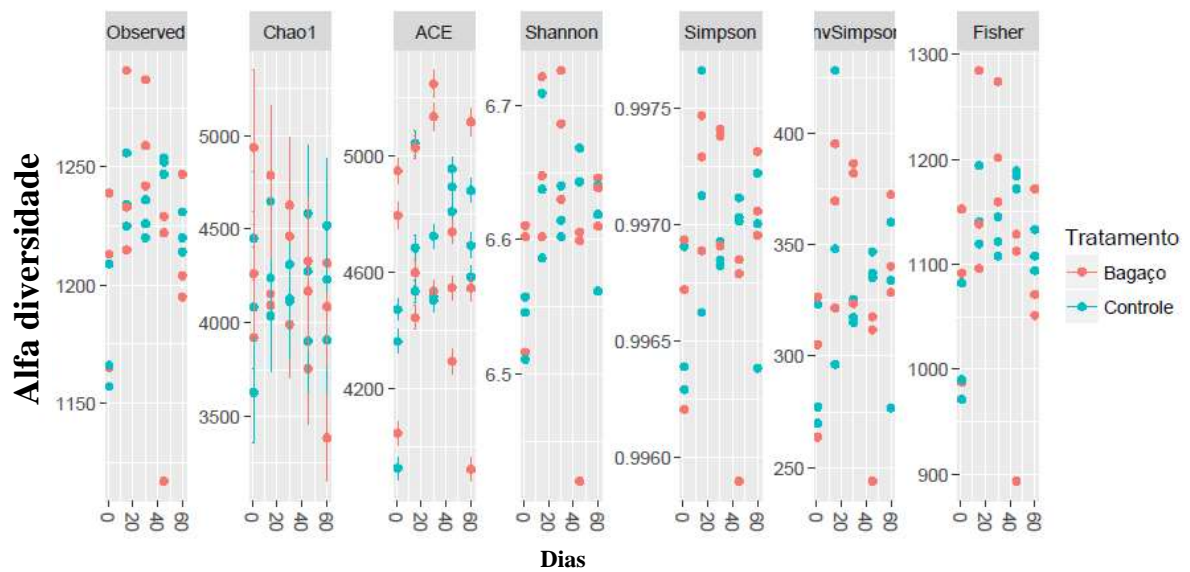


Figura 15 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V3 do gene 16S rRNA encontrados no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle

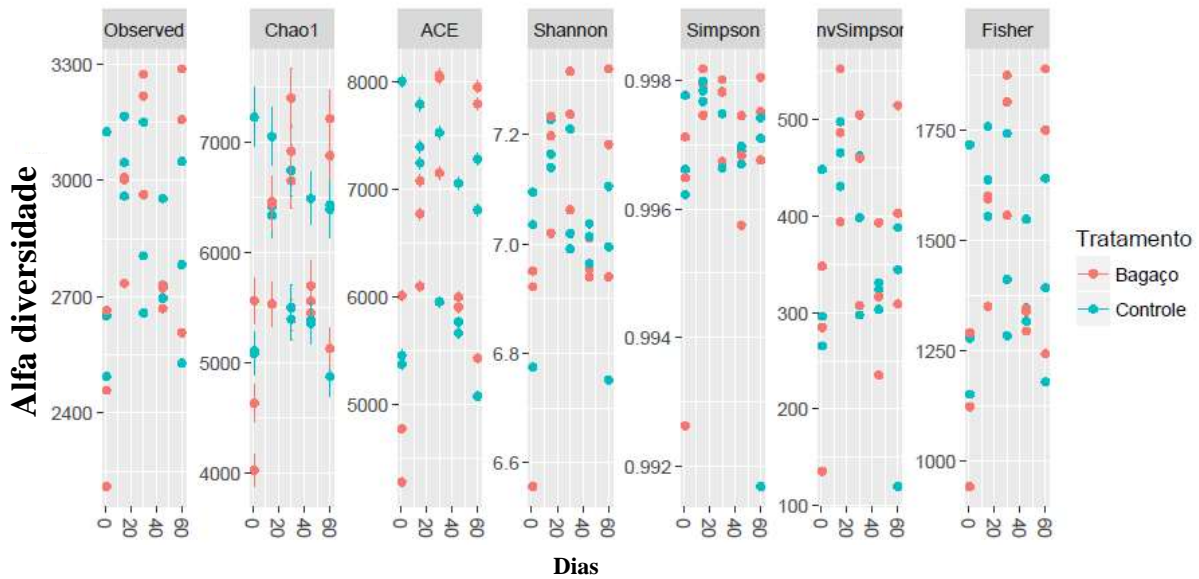


Figura 16 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle

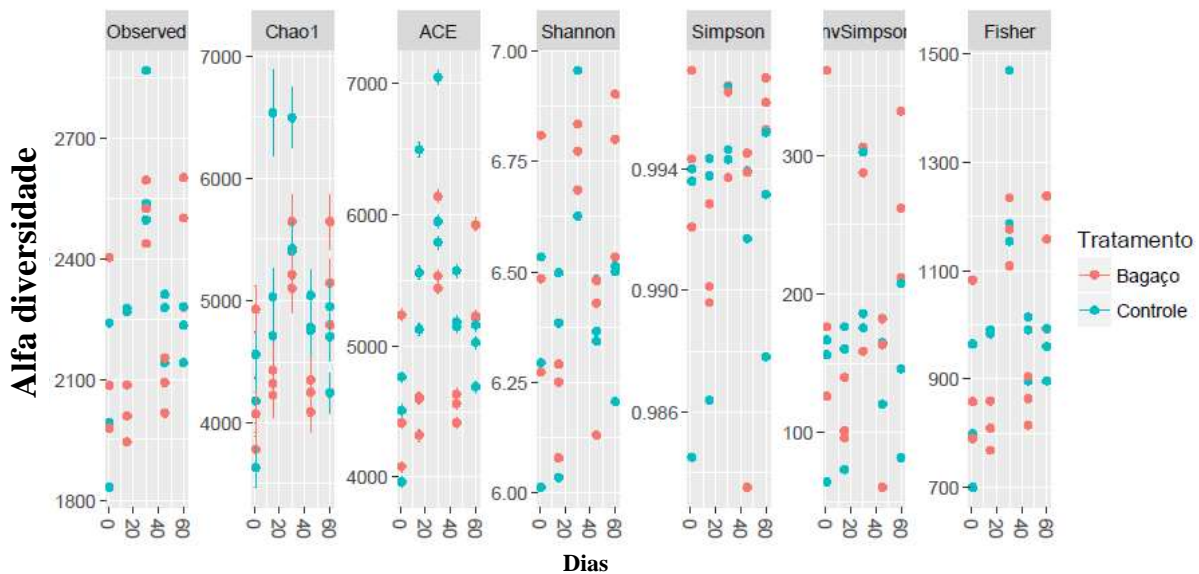


Figura 17 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle

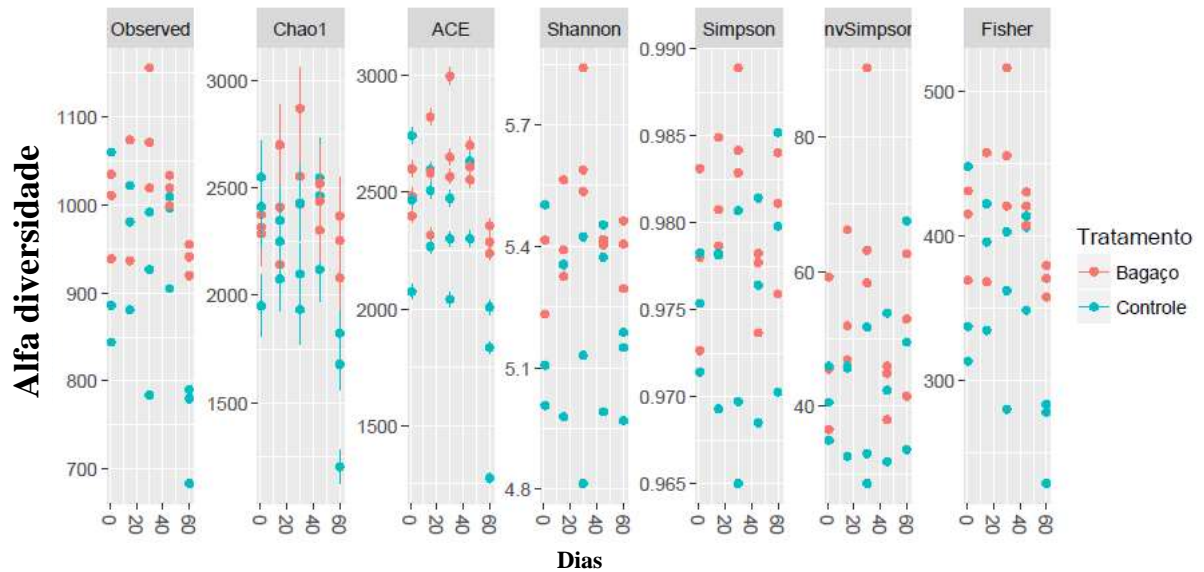


Figura 18 - Alfa diversidade baseada na similaridade da composição de UTOs (97% de similaridade) da região ITS2 fúngica encontrados na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. Os três pontinhos vermelhos são os três animais alimentados com a dieta bagaço e os três pontinhos em azul são os três animais alimentados coma dieta controle

4.2.1.2 Determinação da composição da comunidade bacteriana do rúmen via sequenciamento da região V3 do gene 16S rRNA

No geral, a região V3 do gene 16S rRNA apresentou 11 filós (Tabela 5), sendo que Bacteroidetes representou 48% das sequências avaliadas, seguido por Firmicutes (28%). Estes dois filós representaram 76% da comunidade bacteriana presente no rúmen de *O. aries* (Figura 19). Os demais filós foram Fibrobacteres (2%), Tenericutes (2%), Verrucomicrobia (2%), Lentisphaerae (1%), Proteobacteria (1%), SR1 (1%), Spirochaetes (1%) e TM7 (1%) (Figura 19). As sequências não classificadas foram de 10% e os filós com menos de 1% de abundância foram agrupados em Outros, e juntos representaram 2% das amostras analisadas.

Em Bacteroidetes, o gênero *Prevotella* foi o mais abundante com ~20% das sequências analisadas, seguido por um gênero não classificado da ordem Bacteroidales (15%) (Tabela 6). Em Firmicutes, a ordem Clostridiales esteve em 8% de todas as amostras estudadas. As famílias Lachnospiraceae (4%) e Ruminococcaceae (7%) e o gênero *Ruminococcus* (3%) foram constantes em todas as amostras (Tabela 6).

Tabela 5 - Composição bacteriana (média geral) a nível de filo na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias

Filo	Fibra	Líquido
Não classificados	7	14
Outros	0	2
Actinobacteria	1	1
Bacteroidetes	50	47
Fibrobacteres	1	2
Firmicutes	32	25
Lentisphaerae	1	2
Proteobacteria	2	1
SR1	0	1
Spirochaetes	2	1
TM7	1	1
Tenericutes	2	2
Verrucomicrobia	1	1

Tabela 6 - Composição taxonômica a nível de gênero da região V3 do gene 16S rRNA no rúmen de *O. aries*

Filo	Ordem	Família	Gênero	Fibra	Líquido
Bacteroidetes	Bacteroidales			15,62±0,47	13,62±0,31
		BS11		4,51±0,44	4,83±0,18
		Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	19,92±0,5	20,7±0,76
		RF16		1,68±0,21	2,17±0,11
Fibrobacter	Fibrobacterales	S24-7		3,01±0,46	1,13±0,05
		Fibrobacteraceae	<i>Fibrobacter</i>	1,39±0,13	1,77±0,09
Firmicutes	Clostridiales			8,89±0,35	6,43±0,2
		Lachnospiraceae		4,04±0,19	2,73±0,09
		Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio</i>	0,82±0,06	0,42±0,02
		Ruminococcaceae		6,98±0,24	7,16±0,3
		Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>	3,31±0,2	2,35±0,12
Spirochaetes		Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	1,57±0,11	0,97±0,06
Tenericutes	RF39			1,81±0,14	1,53±0,07
Verrucomicrobia		RFP12		0,69±0,07	1,70±0,08

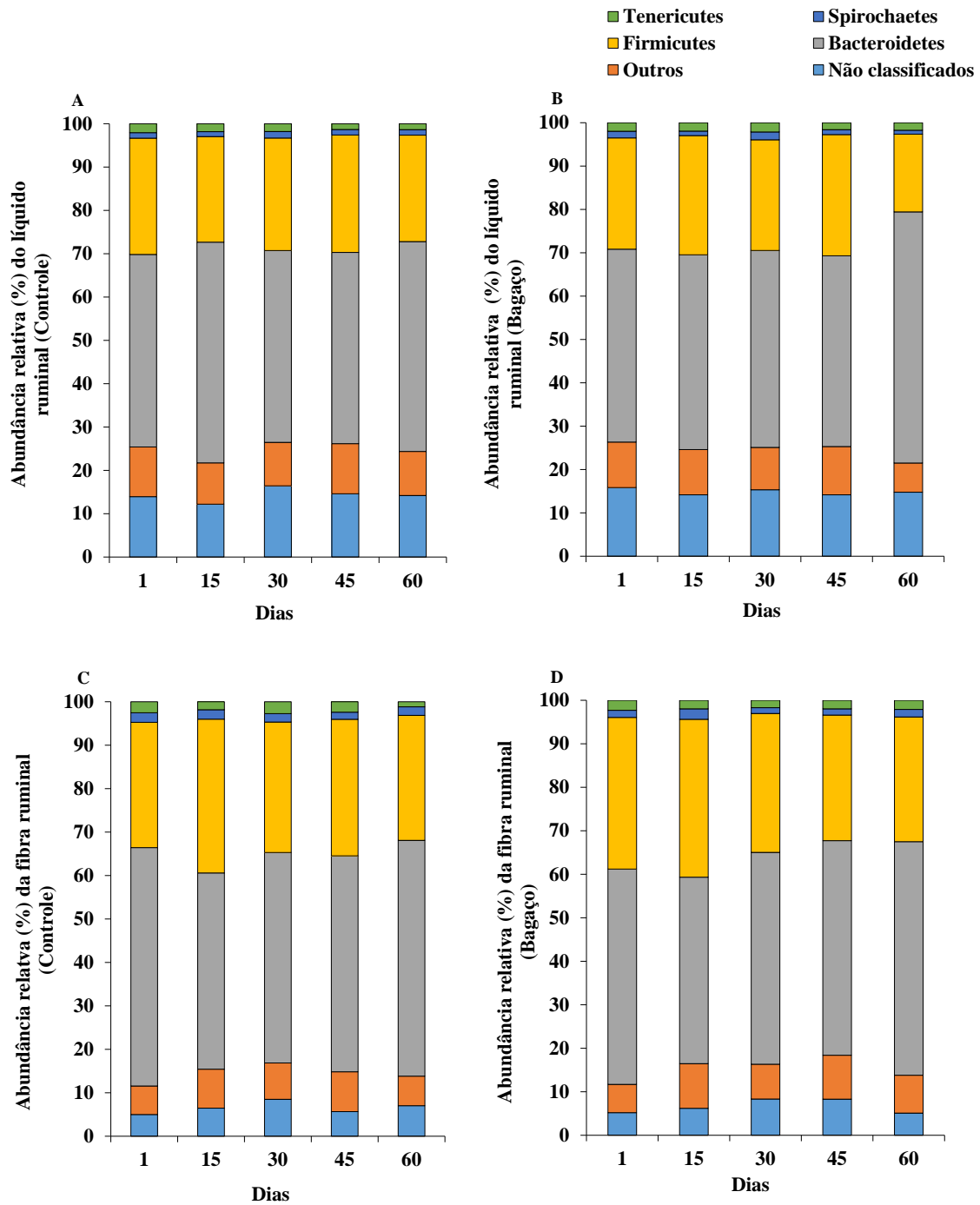


Figura 19 - Composição da comunidade bacteriana a nível de filo na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= líquido ruminal (dieta controle); B= líquido ruminal (dieta bagaço); C= fibra ruminal (dieta controle) e D= fibra ruminal (dieta bagaço)

Como os filós Bacteroidetes e Firmicutes foram os mais abundantes em todas as amostras estudadas, foi feita a observação deles separadamente na fibra e no líquido ruminal (Figura 20). A abundância relativa de ambos os filós não apresentou diferenças significativas

ao longo dos dias e entre as dietas (Figura 20-A1 e B2= Bacteroidetes; e Figura 20-B1 e B2= Firmicutes; “ANOVA-Type Statistic”, $P<0,05$).

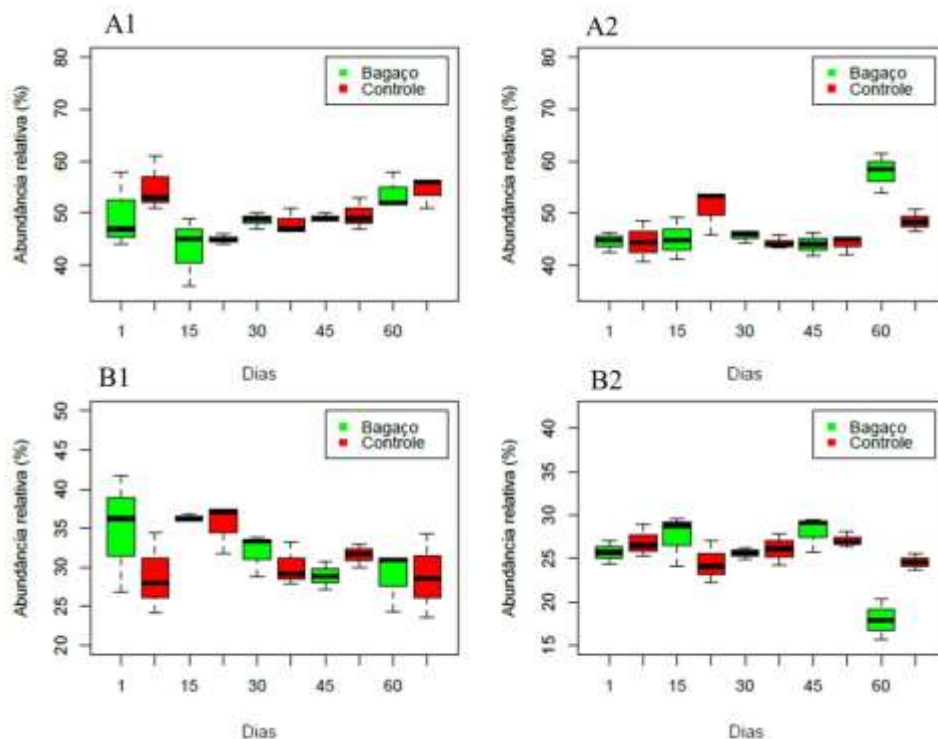


Figura 20 - Dinâmica entre os filos Bacteroidetes e Firmicutes na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes na fibra ruminal, A2= Bacteroidetes no líquido ruminal, B1= Firmicutes na fibra ruminal e B2= Firmicutes no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito

É interessante notar que vários estudos têm apontado que a microbiota intestinal de humanos é dominada por Bacteroidetes e Firmicutes (ECKBURG; BIK; BERNSTEIN, 2005; LAY; DORÉ; RIGOTTIER-GOIS, 2007). Estes estudos mostram que estes dois filos competem pelo mesmo nicho. Como em humanos, este padrão também ocorre no rúmen de ovinos, como verificado no presente trabalho. Neste caso, Bacteroidetes apresentou abundância relativa significativamente maior do que Firmicutes tanto na fibra quanto no líquido ruminal. Tanto em animais alimentados com a dieta controle, quanto aqueles alimentados com a dieta bagaço (Figura 21; contrastes do tipo Tukey, $P<0,05$).

A abundância relativa de Bacteroidetes na fibra ruminal de animais alimentados com a dieta controle foi significativamente maior no primeiro e aos 60 dias em comparação aos 15 dias (Figura 22A-1; contrastes do tipo Tukey, $P<0,05$). Já, nos animais alimentados com a dieta bagaço a abundância relativa foi significativamente maior aos 60 dias em relação aos 15 e 45 dias (Figura 22A-2; contrastes do tipo Tukey, $P<0,05$). Por outro lado, no líquido

ruminal não houve diferenças significativas na abundância de Bacteroidetes ao longo do tempo em ambas as dietas (Figura 22A-3 e A-4; “ANOVA-Type Statistic”, $P < 0,05$).

Em Firmicutes foi verificado que a abundância relativa no líquido ruminal foi significativamente maior aos 45 dias em comparação aos 60 dias na dieta bagaço (Figura 22B-4; contrastes do tipo Tukey, $P < 0,05$).

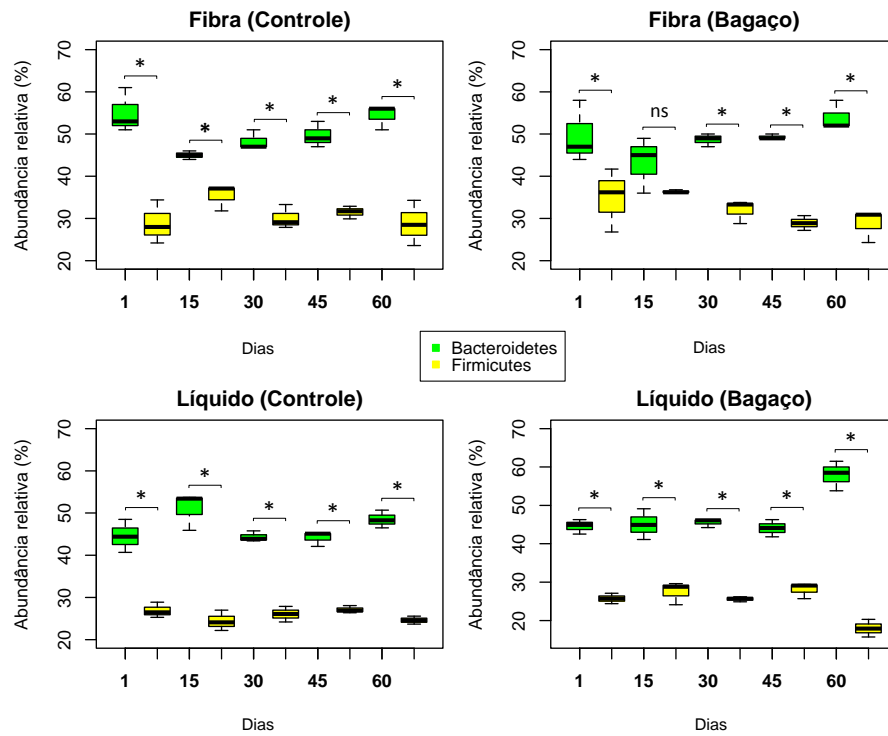


Figura 21 - Dinâmica entre os filos Bacteroidetes e Firmicutes na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($*P < 5\%$)

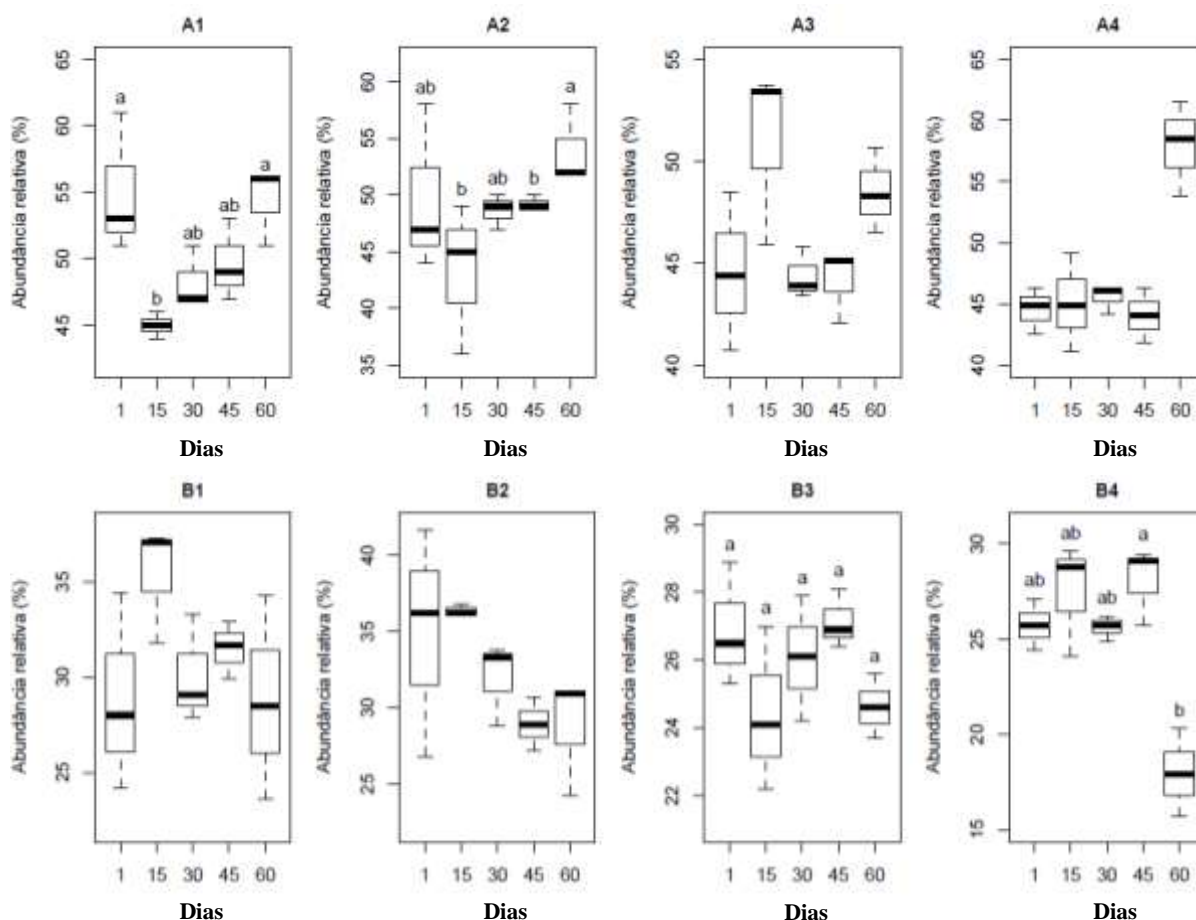


Figura 22 - Abundância relativa (%) dos filos Bacteroidetes e Firmicutes na região V3 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta controle); A2= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta bagaço); A3= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta controle); A4= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta bagaço); B1= Firmicutes na fibra ruminal (dieta controle); B2= Firmicutes na fibra ruminal (dieta bagaço); B3= Firmicutes no líquido ruminal (dieta controle); B4= Firmicutes no líquido ruminal (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negro. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)

Foi verificado que a dinâmica de *Fibrobacter* na fibra e no líquido ruminal não diferiu entre as dietas dentro de cada coleta (Figura 23; contrastes do tipo Tukey, $P < 0,05$). Ao longo do tempo, por outro lado, a abundância relativa de *Fibrobacter* no líquido ruminal (dieta bagaço) foi significativamente maior no primeiro e aos 15 dias em relação aos 60 dias (Figura 24; “ANOVA-Type Statistic”, $P \leq 0,05$). Este filo representou 2% da comunidade total no rúmen de *O. aries*. *Fibrobacter* possui espécies especialistas na degradação da biomassa vegetal (KOBAYASHI; SHINKAI; KOIKE, 2008). Hungate (1947) foi o primeiro a isolar uma espécie de *Fibrobacter*, *Fibrobacter succinogenes*, do rúmen bovino. Espécies do gênero de *Fibrobacter* são definidos como gram-negativas anaeróbicas obrigatórias, não formadoras de esporos, que apresentam células em formato de varetas ou ovoides e com um diâmetro de

0,3 a 0,5 μ m e 0,8 a 2 μ m de comprimento (HUNGATE, 1950). Ranson-Jones et al. (2012) descreveram os mecanismos existentes na parede celular de *Fibrobacter succinogenes* detalhando o processo de degradação da celulose, o qual foi proposto anteriormente por Wilson (2009) e Suen et al. (2011a). Assim, proteínas “fibro-slime” e estruturas “pilin” do tipo IV medeiam a ligação entre cadeias de celulose e a membrana de *Fibrobacter* (RANSON-JONES et al., 2012). Este mecanismo promove a despolimerização de longas cadeias de celulose em cadeias mais simples por atividades enzimáticas. Estas cadeias individuais de celulose são transportadas através da membrana externa por transportadores ABC (SUEN et al., 2011a) para o espaço periplasmático (WILSON, 2009). É neste espaço que ocorre a despolimerização da celulose pelas celulases em açúcares ainda mais simples e que serão transportados para o interior da célula. Uma vez incorporado dentro da célula, as celodextrinas podem ser convertidas a glicose 1 fosfato pela ação das celodextrinas fosfatases (SUEN et al., 2011a).

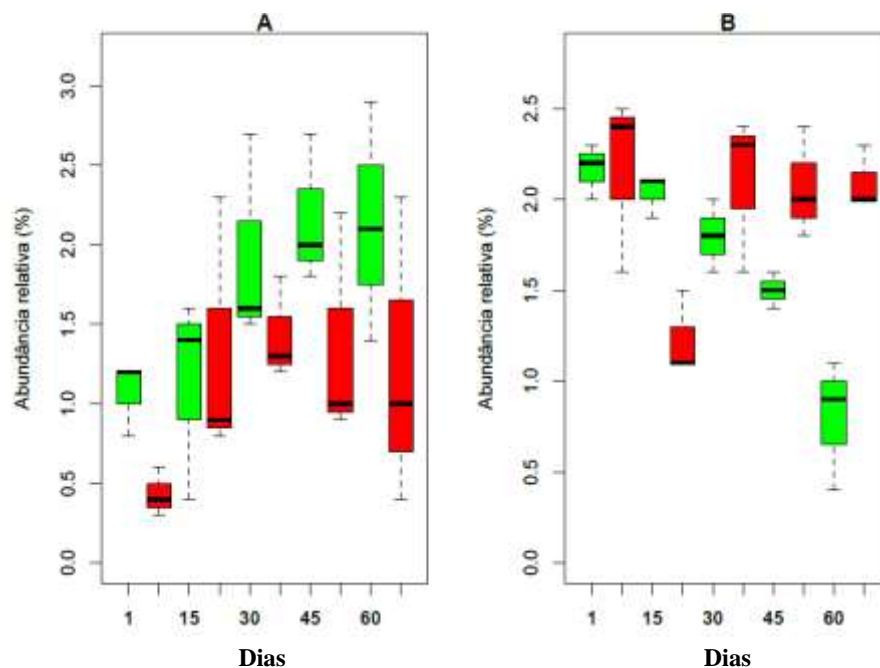


Figura 23 - Abundância relativa (%) do filo *Fibrobacter* na região V3 do gene 16S rRNA encontrada na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. “Boxes” verdes denotam dieta bagaço e os vermelhos denotam dieta controle. A= *Fibrobacter* aderido à fibra ruminal, B= *Fibrobacter* no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negro

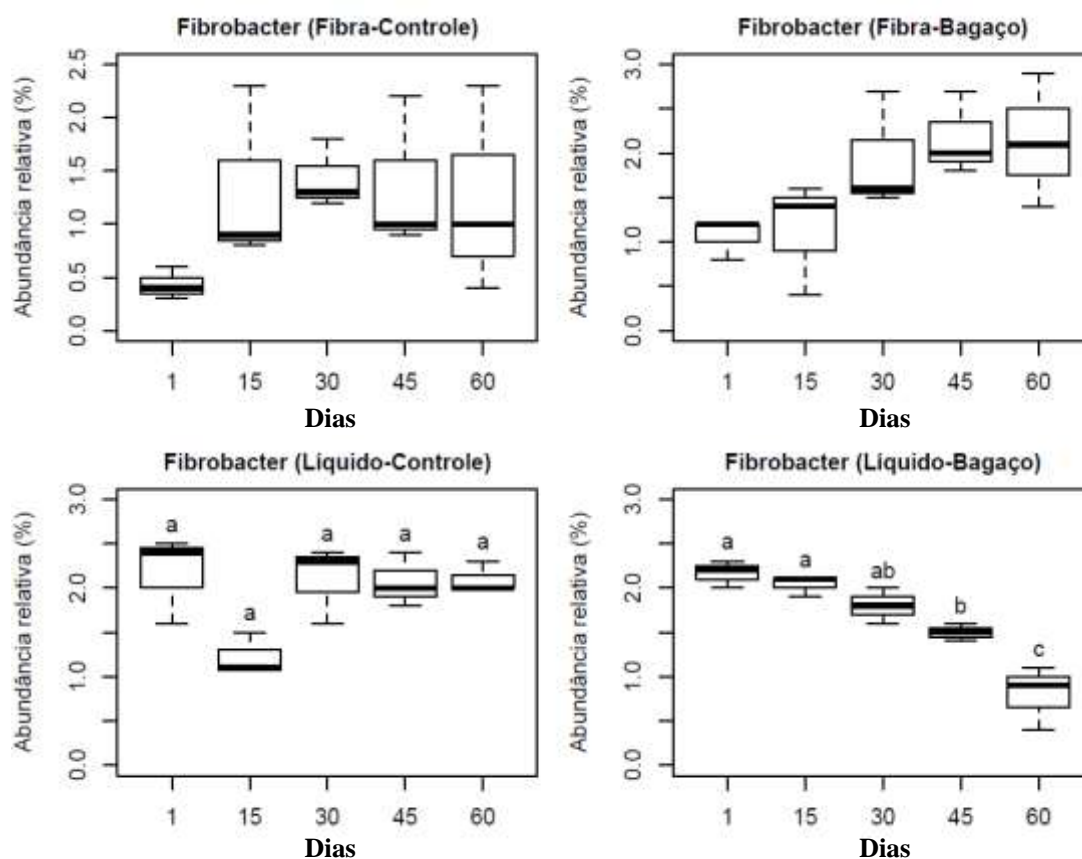


Figura 24 - Abundância relativa (%) do filo Fibrobacter na região V3 do gene 16S rRNA encontrada na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. “Boxes” verdes denotam dieta bagaço e os vermelhos denotam dieta controle. A1= Fibrobacter aderido à fibra ruminal (dieta controle), A2= Fibrobacter aderido à fibra ruminal (dieta bagaço); B1= Fibrobacter no líquido ruminal (dieta controle); B2= Fibrobacter no líquido ruminal (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)

Foram encontradas 33 UTOs em 100% das amostras (Tabela 7). Destas 33 UTOs, três UTOs pertenciam a família Lachnospiraceae e nove a Ruminococcaceae, sendo que três delas foram classificadas no gênero *Ruminococcus* (Tabela 7). Em Bacteroidetes, oito UTOs pertenceram ao gênero *Prevotella* e no filo Fibrobacter uma UTO pertenceu ao gênero *Fibrobacter* (Tabela 7).

Henderson et al. (2015) sugeriram que o microbioma ruminal é dominada por uma comunidade ‘core’, o qual é composta por micro-organismos pobremente caracterizados, especialmente entre as bactérias. No rúmen ocorre alta redundância funcional entre os micro-organismos (WEIMER, 2015) e isso significa que varias espécies microbianas podem desempenhar a mesma função e com diferentes combinações dependendo do tipo de dieta

(HENDERSON et al., 2015). Esta flexibilidade da estrutura da comunidade microbiana no rúmen permite ao hospedeiro explorar uma ampla variedade de plantas (WEIMER, 2015).

Tabela 7 - 'Core' bacteriano no microbioma ruminal de *O.aries* da região V3 do gene 16S rRNA

100%*	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero				
UTO55453	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	RF16 Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>				
UTO177603			Bacteroidales						
UTO37201			Bacteroidales						
UTO2842			Bacteroidales						
UTO30521									
UTO41089									
UTO42615									
UTO86877									
UTO101102									
UTO101136									
UTO140812									
UTO158453			Firmicutes			Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae Lachnospiraceae Lachnospiraceae Ruminococcaceae Ruminococcaceae Ruminococcaceae Ruminococcaceae Ruminococcaceae Ruminococcaceae Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>
UTO100417							Clostridiales		
UTO120084	Clostridiales								
UTO44943	Clostridiales								
UTO377	Clostridiales								
UTO104420									
UTO151959									
UTO65232									
UTO66789									
UTO87526									
UTO179922									
UTO169877									
UTO125926									
UTO163437									
UTO163950									
UTO176746	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Fibrobacteraceae	<i>Fibrobacter</i>				
UTO55486	Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales						
UTO38182	SR1			F16					
UTO7747	TM7	TM7-3	CW040						
UTO8928	Não classificada								
UTO15157	Não classificada								
UTO105382	Não classificada								

A análise das coordenadas principais (PCoA) usando o índice de similaridade Bray-Curtis revelou uma tendência de separação entre as comunidades bacterianas presentes no líquido e na fibra ruminal (Figura 25A, ANOSIM, $R= 0,4084$, $P= 0,0001$). Além disso, foi verificado que aos 60 dias a estrutura da comunidade bacteriana foi distinta entre as dietas estudadas, tanto no líquido como na fibra ruminal (Figura 25J-K). As OTUs que contribuíram para a separação na fibra ruminal entre as dietas foram identificadas e selecionadas através da análise de SIMPER (Tabela 8). De acordo com a análise de Simper, 24 OTUs contribuíram com ~10% da separação entre as dietas. As OTUs foram classificadas nas Ordens Bacteroidetes e Clostridiales, nas famílias Ruminococcaceae, Lachnospiraceae e Micromonosporaceae, e no gênero *Ruminococcus* (Tabela 8).

No rúmen de *O. aries*, Bacteroidetes foi predominante, independentemente do tipo de dieta ou da natureza amostral, representando 50% das sequências analisadas. Este filo é muito diverso e abrange quatro classes, Bacteroidia, Flavobacteria, Sphingobacteria e Cytophagia, as quais representam ~7000 diferentes espécies (THOMAS et al., 2010). Todas essas bactérias são gram negativas, contudo, algumas são estritamente anaeróbicas, como os *Bacteroides*, e outras são estritamente aeróbicas como *Flavobacteria*. Membros do filo Bacteroidetes colonizam diferentes nichos ecológicos, incluindo o solo, oceano, água doce e principalmente trato gastro-intestinal de animais, onde participam de várias funções biológicas (THOMAS et al., 2011). No rúmen, a alta abundância de *Prevotella* está atribuída com a alta variabilidade deste gênero, permitindo que seus membros ocupem vários nichos ecológicos (JAMI; MIZRAHI, 2012). Trabalhos indicam que o gênero *Prevotella* é predominante em diferentes espécies de ruminantes, tais como: Bovinos, Caprinos, Alce e Cervos (LEE et al., 2012). Neste presente estudo, a proporção de *Prevotella* foi de 20%, corroborando com trabalhos anteriores, como exemplo, no rúmen de bovinos (20-30%) (ZENED et al., 2013), alce e cervos (~20%) (GRUNINGER et al., 2014). Porém, no rúmen de *Cervus nippon*, o gênero *Prevotella* corresponde a 50% da abundância relativa da comunidade bacteriana. No intestino de humanos, a atividade metabólica de *Prevotella* está associada com dietas ricas em carboidratos (WU et al., 2011). *Prevotella* pode participar de um nicho central e agir na manutenção da estrutura da comunidade do microbioma do intestino humano, proporcionando ao hospedeiro a habilidade de se adaptar a diferentes dietas (SCHNORR et al., 2014). Além disso, análises metagenômicas apontam *Prevotella* spp. com potencial na degradação de celulose no intestino de canguru (POPE et al., 2010) e no rúmen de renas (POPE et al., 2012). Alguns membros deste gênero possuem enzimas com alta atividade hemicelulolítica e proteolítica (MATSUI et al., 2000), os quais poderiam degradar xilana, pectina e amido (KABEL et al., 2011).

No filo Firmicutes, a ordem Clostridiales representou 27% da comunidade bacteriana presente no rúmen de *Ovis aries*. Este grupo de microrganismos possui bactérias especializadas na degradação da parede celular vegetal, apresentando um sistema complexo multi-enzimático chamado celulosoma (DASSA et al., 2014). A bactéria anaeróbica *Clostridium thermocellum* foi a protagonista da descoberta e portadora deste sistema multi-enzimático (LAMED et al., 1983). A proteína celulosoma é composta por domínios de *Cohesin*, os quais são conectadas a subunidades enzimáticas de domínios *Dockerin* (DOI; KOSUGI, 2004).

Membros da família *Ruminococcaceae* constituem o microbioma do trato gastrointestinal de ruminantes (KIM; MORRISON; YU, 2011) e em monogástricos, tais como humanos (CHASSARD et al., 2008). A capacidade fibrolítica destes micro-organismos fazem deles uma peça chave na dinâmica da comunidade microbiana no rúmen de ovinos e a sua conexão com outras bactérias envolvidas no processo de fermentação, as quais influenciam na saúde de animais e humanos (WALKER et al., 2011). No rúmen de ovinos, os Ruminococci são os maiores contribuidores na conversão de fibra em ácidos orgânicos, os quais são utilizados pelo hospedeiro (CARBERRY et al., 2012; PALMONARI et al., 2010). Em especial, *Ruminococcus albus* é um dos micro-organismos fibrolíticos naturalmente capazes de fermentar açúcares em etanol em temperaturas mesofílicas, podendo produzir etanol a níveis comparáveis ou até mais eficientes do que celulolíticos etanologênicos (CHRISTOPHERSON et al., 2013). Este micro-organismo em questão produz um biofilme como o glicocálice durante o crescimento sobre a celulose, permitindo a melhor aderência da célula sobre a fibra. O glicocálice é um mecanismo usado pela célula como proteção contra o predador e se concentra juntamente com as enzimas fibrolíticas na superfície da célula (WEIMER et al., 2006).

Várias evidências moleculares a respeito de *Ruminococcus albus* apontam o uso de diferentes estratégias de fermentação da celulose, mas que não inclui o sistema multienzimático celulosossoma (MIRON et al., 2001). Este sistema celulosossomal foi ausente em recentes genomas de *R. albus* 7 (SUEN et al., 2011b) e *R. albus* 8 (MOON et al., 2011). Isto indica que os *Ruminococcus* possuem uma ampla variedade de mecanismos de aderência a fibra e que estas espécies utilizam diferentes estratégias celulolíticas (MORRISON; MIRON, 2000).



Figura 25 - Análise de coordenadas principais (PCA) usando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis com as UTOs (3% de dissimilaridade) da região V3 do gene 16S rRNA. (A) UTOs ao longo de 60 dias, analisando a estrutura da comunidade bacteriana no líquido e fibra ruminal. Esta análise é suportada estatisticamente pelo teste de ANOSIM ($R= 0,4084$, $p= 0,0001$); (B) líquido ruminal no 1 dia; (C) fibra ruminal no 1 dia; (D) líquido ruminal aos 15 dias; (E) fibra ruminal aos 15 dias; (F) líquido ruminal aos 30 dias; (G) fibra ruminal aos 30 dias; (H) líquido ruminal aos 45 dias; (I) fibra ruminal aos 45 dias; (J) líquido ruminal aos 60 dias; (K) fibra ruminal aos 60 dias

Tabela 8 - Análise de dissimilaridade (SIMPER) da região V3 do gene 16S rRNA da fibra ruminal aos 60 dias

UTOs	I5F	II5F	III5F	IV5F	V5F	VI5F	Taxonomia	Contribuição %	Acumulativo %
21499	166	2	9	1	0	0	Bacteroidales (ordem)	1,921	1,921
93970	59	1	3	0	0	0	Bacteroidales (ordem)	0,6875	2,608
64107	0	0	2	4	9	30	Bacteroidales (ordem)	0,4474	3,055
137332	0	18	18	2	0	1	Bacteroidales (ordem)	0,3819	3,437
59809	3	3	9	18	7	20	Bacteroidales (ordem)	0,3419	3,779
112881	0	28	4	1	0	1	Bacteroidales (ordem)	0,3419	4,121
65232	13	19	30	34	18	29	<i>Ruminococcaceae</i> (família)	0,3092	4,43
162978	0	0	2	23	6	0	Bacteroidales (ordem)	0,3092	4,74
163437	10	15	16	26	27	16	<i>Ruminococcus</i> (gênero)	0,3055	5,045
151959	4	13	26	18	5	15	<i>Lachnospiraceae</i> (família)	0,2946	5,34
55486	9	0	22	9	2	7	<i>Fibrobacter</i> (gênero)	0,2728	5,613
3632	11	10	8	3	0	1	Bacteroidales (ordem)	0,2728	5,885
140412	0	1	0	0	21	4	Bacteroidales (ordem)	0,2692	6,155
169877	8	26	9	14	18	13	Clostridiales (ordem)	0,2619	6,416
104420	14	6	25	19	21	17	<i>Lachnospiraceae</i> (família)	0,2619	6,678
42615	11	28	30	27	20	24	<i>Prevotella</i> (gênero)	0,2546	6,933
138231	12	1	11	1	1	0	Bacteroidales (ordem)	0,2401	7,424
128751	2	2	1	16	6	5	<i>Micromonosporaceae</i> (família)	0,2401	7,664
120084	12	21	31	25	23	21	Clostridiales (ordem)	0,2292	7,893
137555	2	2	1	0	14	8	Bacteroidales (ordem)	0,2219	8,115
164894	3	0	1	18	3	2	Bacteroidales (ordem)	0,2146	8,548
67205	0	0	2	17	1	0	Bacteroidales (ordem)	0,1964	8,952
13079	5	13	10	4	4	2	Bacteroidales (ordem)	0,1964	9,148
2842	5	18	14	16	20	13	<i>Prevotella</i> (gênero)	0,1891	9,337

4.2.1.3 Determinação da composição da comunidade bacteriana do rúmen via sequenciamento da região V6-7 do gene 16S rRNA

Com o sequenciamento da região V6-7 do gene 16S rRNA nove filos foram detectados no rúmen (Figura 22). No geral, o filo Bacteroidetes representou 44% das sequências avaliadas, seguido por Firmicutes (40%). Estes dois filos representam 84% da comunidade bacteriana presente no rúmen de *O. aries*. Outros filos foram encontrados, tais como: Tenericutes (5%) e Verrucomicrobia (2%). As sequências não classificadas foram de 5% e os filos que foram menores que 1% em sua abundância foram agrupados em Outros, representando 5% das amostras analisadas. As famílias Prevotellaceae, Paraprevotellaceae, Christensenellaceae, Clostridiaceae, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Veillonellaceae, Mogibacteriaceae e Spirochaetaceae e suas respectivas porcentagens estão na Tabela 9. No geral, o gênero *Prevotella* (28%) foi o mais abundante em todas as amostras estudadas, seguido por *Ruminococcus* (1,9%) e *Butyrivibrio* (1,1%) (Tabela 8).

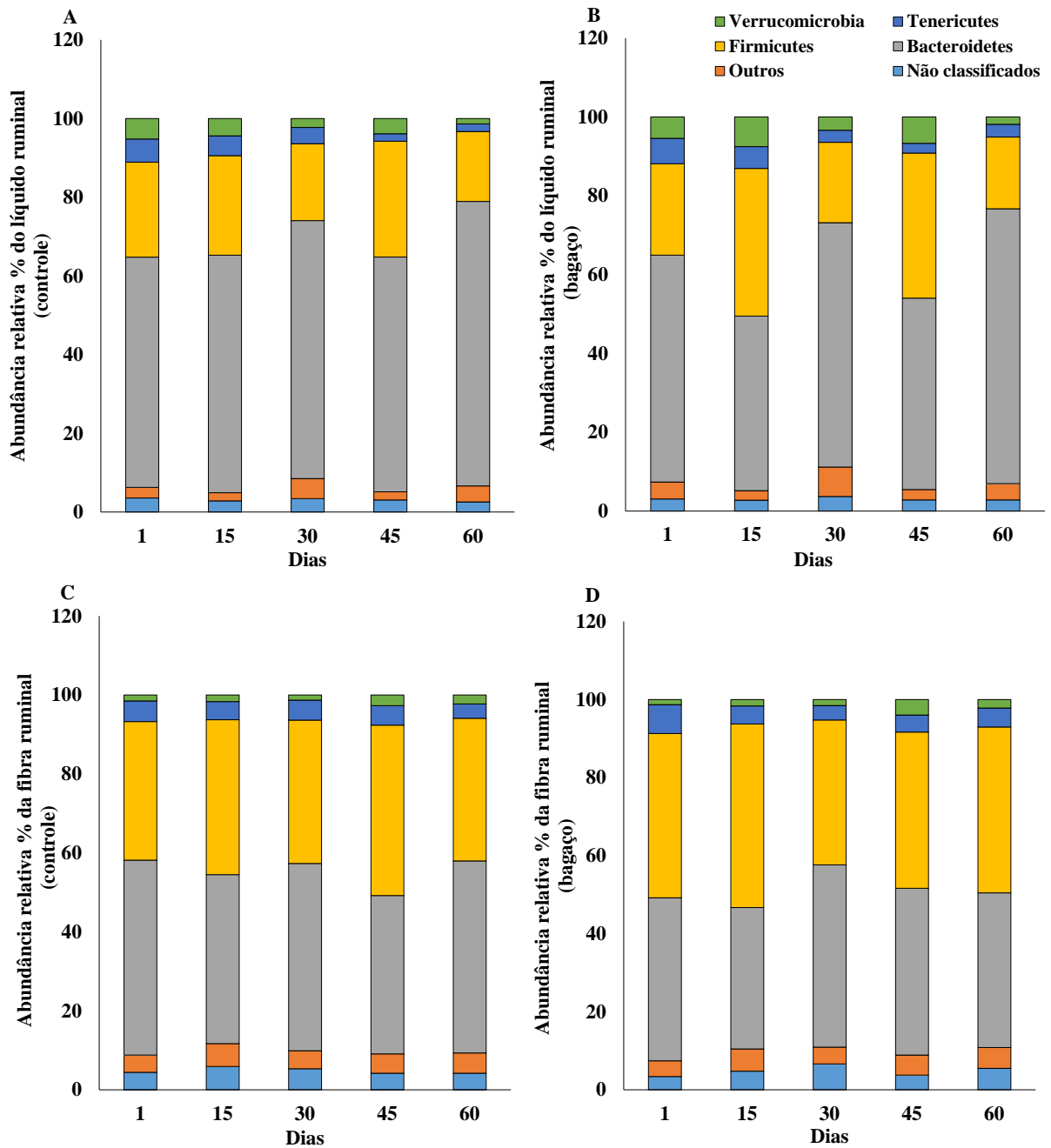


Figura 26 - Composição da comunidade bacteriana a nível de filo na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= líquido ruminal (dieta controle); B= líquido ruminal (dieta bagaço); C= fibra ruminal (dieta controle) e D= fibra ruminal (dieta bagaço)

Tabela 9 - Média da composição taxonômica da região V6-7 do gene 16S rRNA da fibra e líquido ruminal ao longo dos 60 dias*

Filo	Ordem	Família	Gênero	Fibra (%)	Líquido (%)
Bacteroidetes	Bacteroidales	Outros		0,7±0,1	0,8±0,1
		Não classificado		11,9±0,4	13,2±0,9
		BS11		3,9±0,4	3,8±0,5
		Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>	20,0±0,7	36,4±1,4
		S24-7		2,5±0,4	0,8±0,2
		Paraprevotellaceae	<i>CF231</i>	0,7±0,1	0,7±0,1
		Paraprevotellaceae	<i>YRC22</i>	0,8±0,1	1,5±0,2
Firmicutes	Clostridiales			10,7±0,3	6,8±0,6
		Christensenellaceae		0,9±0,1	0,8±0,3
		Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	0,7±0,1	0,7±0,1
		Lachnospiraceae	Outros	0,5±0	0,1±0
		Lachnospiraceae		4,0±0,2	1,3±0,1
		Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio</i>	1,9±0,1	0,2±0
		Lachnospiraceae	<i>Coprococcus</i>	0,8±0,1	0,6±0,1
		Lachnospiraceae	<i>Pseudobutyrvibrio</i>	0,8±0,1	0,1±0
		Ruminococcaceae		8,5±0,4	6,9±0,7
		Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>	2,5±0,1	1,3±0,1
		Veillonellaceae		1,0±0,1	0,8±0,1
		Veillonellaceae	<i>Succiniclasticum</i>	1,0±0,1	0,6±0,1
		Mogibacteriaceae		0,9±0	0,6±0,1
Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	1,3±0	0,1±0
Tenericutes	RF39			4,6±0,3	3,7±0,5
Verrucomicrob	WCHB1-41	RFP12		1,7±0,2	3,8±0,4
	Não classificado			4,8±0,3	3,1±0,2
	Outros			13,1±0,5	11,2±0,7
Total				100%	100%

*Os valores apresentados na Tabela são médias (erro padrão) do líquido e ou fibra ruminal

Na fibra ruminal, o filo Firmicutes foi significativamente mais abundante aos 15 e 60 dias na dieta com bagaço de cana-de-açúcar (Figura 27B1). Já, no líquido ruminal, a abundância foi significativamente maior aos 45 dias (Figura 27B2). Em Bacteroidetes, o comportamento foi totalmente oposto, o qual foi significativamente mais abundante na dieta controle aos 15 e 60 dias (Figura 27A1) e no líquido ruminal aos 45 dias (Figura 27A2).

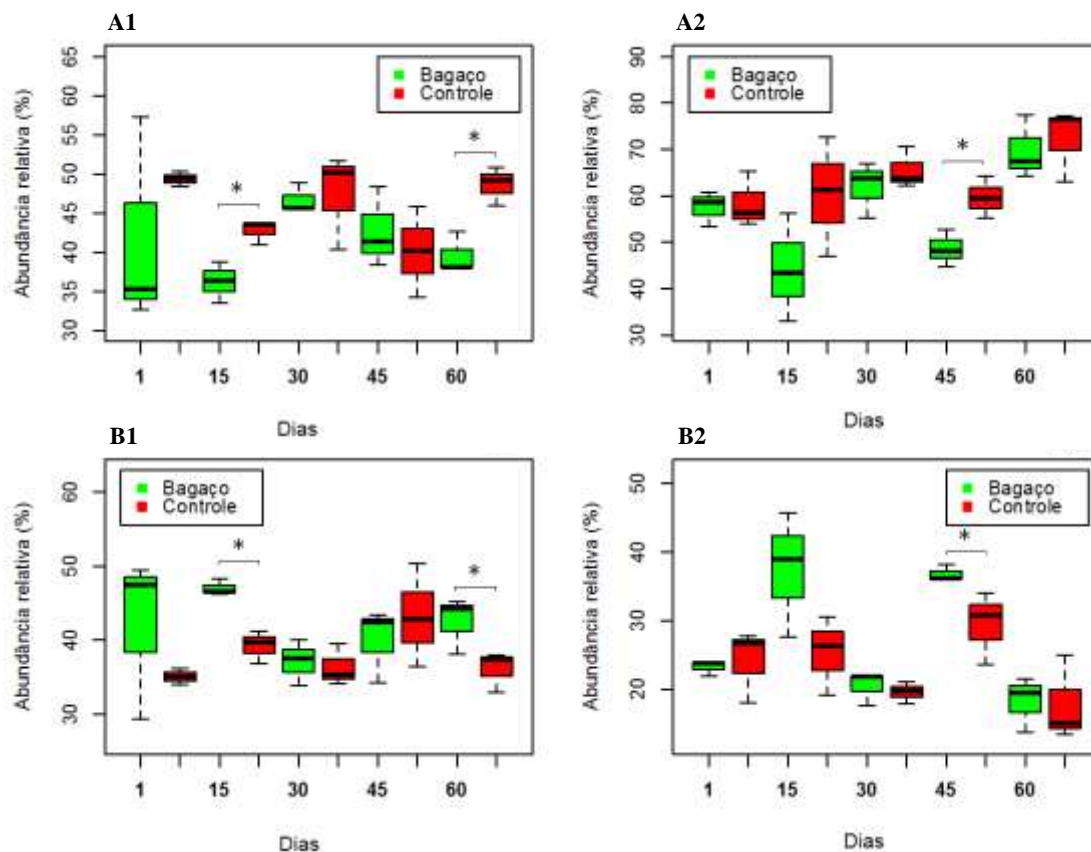


Figura 27 - Dinâmica entre os filis Bacteroidetes e Firmicutes na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes aderido a fibra ruminal, A2= Bacteroidetes no líquido ruminal, B1= Firmicutes aderido a fibra ruminal e B2= Firmicutes no líquido ruminal. As amplitudes dos “boxes” vão do 25º ao 75º percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta (* $P < 5\%$)

Na Figura 28, pode ser observado que o filo Bacteroidetes foi significativamente mais abundante tanto na fibra quanto no líquido ruminal. Contudo, aos 15 dias, na fibra ruminal e na dieta com bagaço de cana-de-açúcar o filo Firmicutes foi significativamente mais abundante do que o filo Bacteroidetes (Figura 28). O filo Firmicutes como dito anteriormente, abriga grupos especialistas na despolimerização de biomassa vegetal (BAYER et al., 2004). Este filo teve ~40% de participação da comunidade bacteriana total no microbioma ruminal de *O. aries*. O gênero *Ruminococcus* possuem espécies, tais como *R. albus* e *R. flavefaciens* que são conhecidas por fermentarem a celulose (WEIMER; RUSSELL; MUCK, 2009).

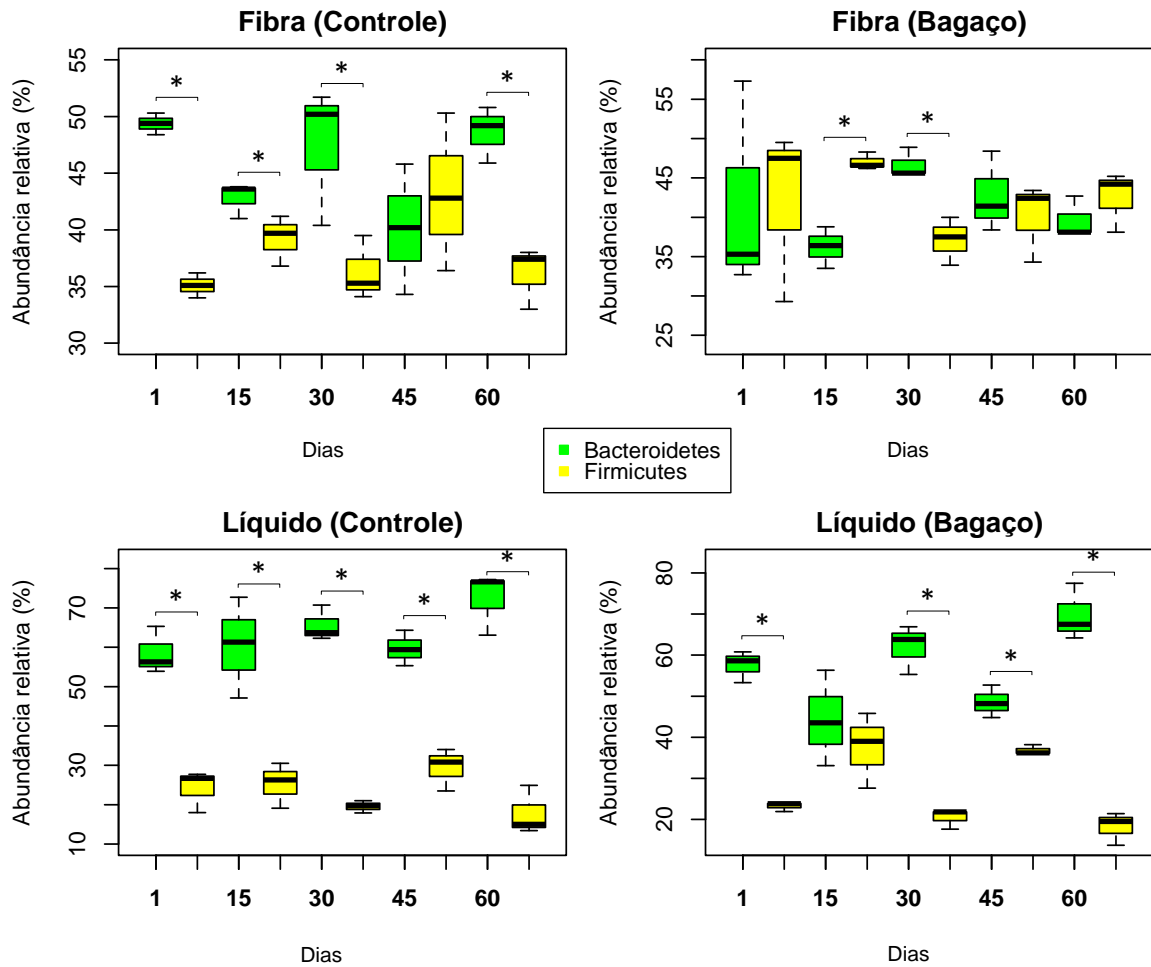


Figura 28 - Dinâmica entre os filis Bacteroidetes e Firmicutes na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. As amplitudes dos “boxes” vão do 25° ao 75° percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta ($P < 5\%$)

Foi observado também, que a abundância do filo Bacteroidetes foi significativamente maior no líquido ruminal na dieta bagaço aos 60 dias (Figura 29A4). Em relação a Firmicutes, observou diferenças significativas na sua abundância relativa aos 15 e 60 dias (Figura 29B4).

Um total de 44 UTOs foram encontradas em 100% das amostras estudadas (Tabela 10). O filo Bacteroidetes representou 31 destas UTOs, sendo que 19 delas foram classificadas no gênero *Prevotella*. Em Firmicutes, foram encontradas as ordens Erysipelotrichales e Clostridiales, e as famílias Veillonellaceae, Ruminococcaceae, Erysipelotrichaceae e Lachnospiraceae (Tabela 10). Por fim, o filo Verrucomicrobia teve duas UTOs como representantes em todas as amostras analisadas.

Algumas espécies do gênero *Prevotella* são hemicelulolíticos e numericamente dominantes na comunidade bacteriana do rúmen, independentemente da dieta ou do hospedeiro (STEVENSON; WEIMER, 2007; PURUSHE et al., 2010).

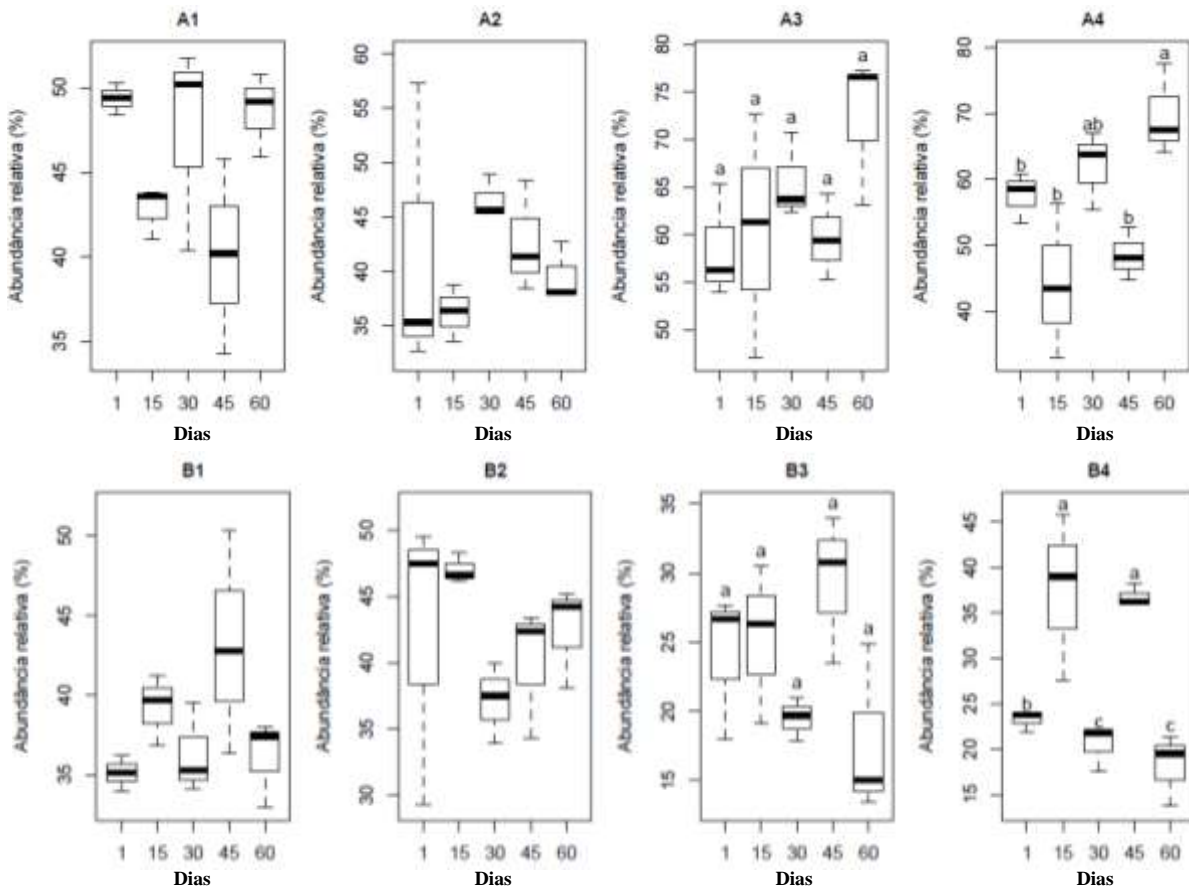


Figura 29 - Abundância relativa (%) dos filos Bacteroidetes e Firmicutes na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta controle); A2= Bacteroidetes na fibra ruminal (dieta bagaço); A3= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta controle); A4= Bacteroidetes no líquido ruminal (dieta bagaço); B1= Firmicutes na fibra ruminal (dieta controle); B2= Firmicutes na fibra ruminal (dieta bagaço); B3= Firmicutes no líquido ruminal (dieta controle); B4= Firmicutes no líquido ruminal (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25º ao 75º percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)

A estrutura da comunidade microbiana no nível de UTOs (97% de dissimilaridade) (Figura 26A, ANOSIM, $R = 0,6655$, $P = 0,0001$) apontam diferenças significativas entre o líquido e a fibra ruminal. Analisando as dietas dentro de cada coleta, apenas na fibra aos 60 dias foi possível observar diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre as dietas controle e bagaço (Figura 15K). O próximo passo, foi selecionar as UTOs que contribuíram para a separação entre as dietas na fibra ruminal aos 60 dias (Tabela 11). De acordo com a

análise de SIMPER, 17 UTOs contribuíram com 10,36% para a separação entre as dietas. Nove OTUs foram classificadas na ordem Bacteroidetes e uma UTO na ordem Clostridiales. Outras UTOs foram caracterizadas a nível de famílias, tais como *Ruminococcaceae* e *Micromonosporaceae*, e os gêneros *Prevotella*, *Clostridium* e *Succiniclasicum* (Tabela 11).

Tabela 10 - 'Core' bacteriano no microbioma ruminal de *O. aries* da região V6-7 do gene 16S rRNA

UTO100%*	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
53208	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales		
70605					
90370					
93018					
96267					
100054					
101583					
131028					
2220					
18632					
46626					
48307					
22333			Bacteroidales	Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>
30236					<i>Prevotella</i>
30357					<i>Prevotella</i>
30749					<i>Prevotella</i>
37904					<i>Prevotella</i>
38086					<i>Prevotella</i>
48928					<i>Prevotella</i>
53924					<i>Prevotella</i>
54660					<i>Prevotella</i>
64264					<i>Prevotella</i>
65484					<i>Prevotella</i>
85527					<i>Prevotella</i>
105019					<i>Prevotella</i>
115115					<i>Prevotella</i>
123370					<i>Prevotella</i>
140925					<i>Prevotella</i>
154060					<i>Prevotella</i>
155056					<i>Prevotella</i>
183288					<i>Prevotella</i>
15371	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales		
24280			Clostridiales		
62123	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	<i>Succiniclasicum</i>
74471				Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>
90078				Ruminococcaceae	
112362				Ruminococcaceae	
165534				Ruminococcaceae	
184022				Ruminococcaceae	
88615	Firmicutes	Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	
11134	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	
39306	Verrucomicrobia	Verruco-5	WCHB1-41	RFP12	
161815				RFP12	

* OTUs encontradas em 100% das amostras analisadas

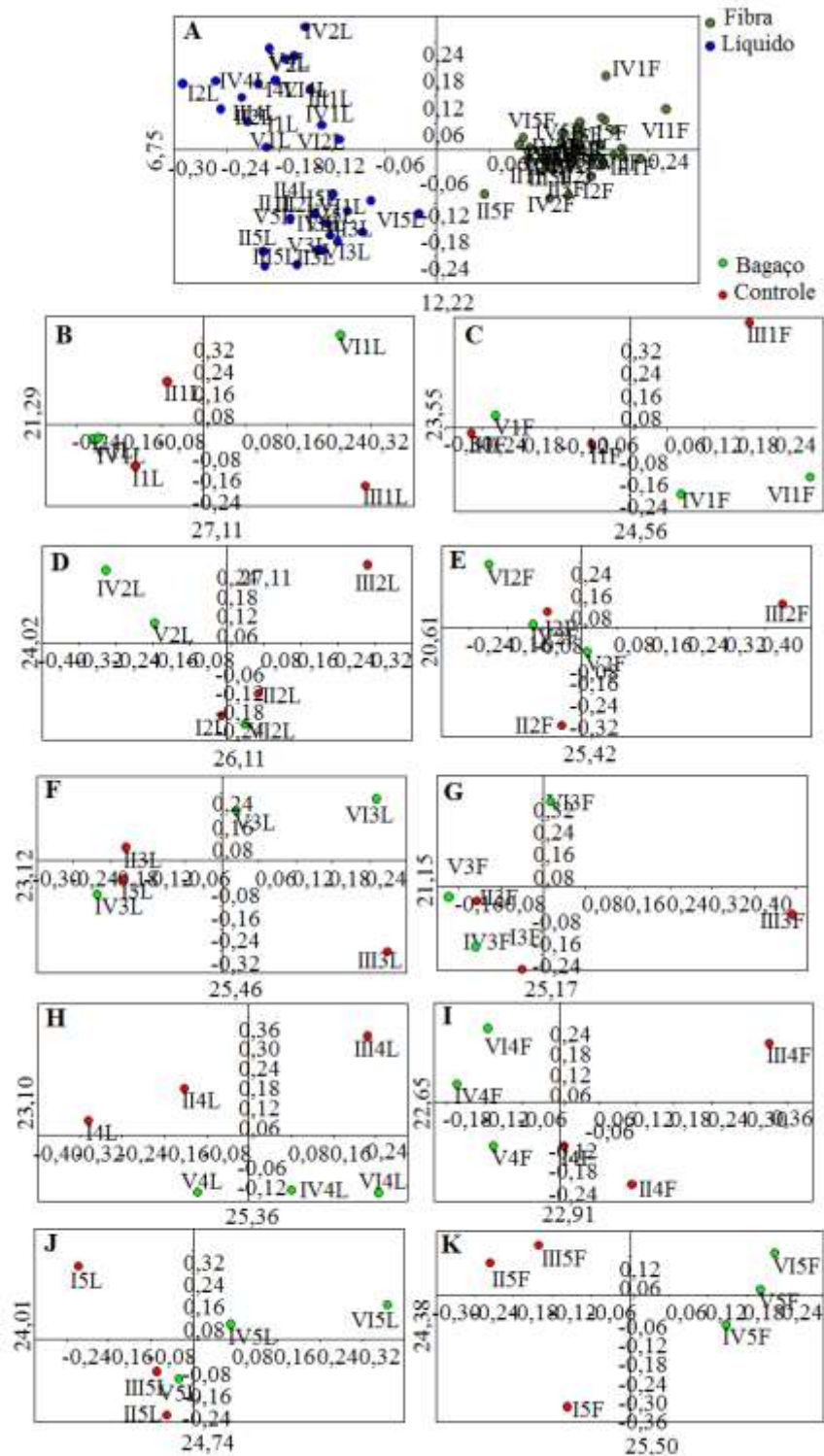


Figura 30 - Análise de coordenadas principais (PCA) usando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis com as UTOs (97% de dissimilaridade) na região V6-7 do gene 16S rRNA encontrados na fibra e no líquido ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. (A) UTOs ao longo de 60 dias, analisando a estrutura da comunidade bacteriana no líquido e fibra ruminal. Esta análise é suportada estatisticamente pelo teste de ANOSIM ($R = 0,6655$, $p = 0,0001$); (B) líquido ruminal no primeiro dia; (C) fibra ruminal no primeiro dia; (D) líquido ruminal aos 15 dias; (E) fibra ruminal aos 15 dias; (F) líquido ruminal aos 30 dias; (G) fibra ruminal aos 30 dias; (H) líquido ruminal aos 45 dias; (I) fibra ruminal aos 45 dias; (J) líquido ruminal aos 60 dias; (K) fibra ruminal aos 60 dias

Tabela 11 - Análise de dissimilaridade (SIMPER) da região V6-7 do gene 16S rRNA da fibra ruminal aos 60 dias

UTOs	I5F	II5F	III5F	IV5F	V5F	VI5F	Taxonômia	Contribuição %	Acumulativo %
55852	7030	80	470	10	0	10	Bacteroidales (ordem)	2,31	2,31
48708	0	2410	1350	70	10	60	Bacteroidales (ordem)	1,14	3,45
							Ruminococcaceae		
112362	1380	310	270	1510	1660	400	(família)	0,69	4,14
910	210	70	80	580	790	1110	Clostridiales (ordem)	0,65	4,79
							Micromonosporaceae		
185976	530	260	160	1990	70	470	(família)	0,65	5,43
							Ruminococcaceae		
90078	1410	660	1320	2160	1320	1590	(família)	0,53	5,96
9481	30	100	0	1210	370	250	Prevotella (gênero)	0,52	6,48
47490	30	0	520	140	420	1280	Bacteroidales (ordem)	0,49	6,98
53498	10	0	30	100	300	1180	Bacteroidales (ordem)	0,47	7,45
131028	1050	330	410	190	170	130	Bacteroidales (ordem)	0,40	7,85
71199	60	60	110	560	250	680	Clostridium (gênero)	0,39	8,23
101529	1220	20	10	10	20	10	Bacteroidales (ordem)	0,37	8,60
62123	710	910	570	1310	580	250	Succiniclasticum (gênero)	0,37	8,97
183288	300	1250	390	340	290	140	Prevotella (gênero)	0,37	9,34
101583	250	500	500	660	680	1030	Bacteroidales (ordem)	0,34	9,68
22098	0	540	660	80	20	140	Bacteroidaceae; (família)	0,34	10,02
34786	20	0	1030	0	180	70	Bacteroidales (ordem)	0,34	10,36

*Dissimilaridade média global: 61,39

O filo Bacteroidetes é dominante tanto no ecossistema microbiano ruminal quanto no microbioma do cólon humano (DODD; MACKIE; CANN, 2011). A abundância de Bacteroidetes e Firmicutes no rúmen e no intestino humano é caracterizada pelo conjunto enzimático pertencente a eles (WONGWILAIWALIN et al., 2013). Vários estudos têm demonstrado que o filo Bacteroidetes produz uma imensa variedade de enzimas hidrolíticas, as quais estão envolvidas no processamento de polissacarídeos complexos (WEBER; STUBNER; CONRAD, 2001). Vários estudos demonstraram que os dois gêneros do filo Bacteroidetes estão envolvidos na degradação da fibra vegetal no rúmen, ou seja, os gêneros *Bacteroides* (CHASSARD et al., 2007) e *Prevotella* (BRYANT et al., 1958; DEHORITY, 1966). Estes micro-organismos são classificados como xilanolíticos. Além disso, espécies de *Prevotella* no rúmen são os responsáveis pela degradação de hemicelulose e além interagir sinérgicamente com outras espécies de bactérias celulolíticas (COTTA; WHITEHEAD, 1993).

A dinâmica da comunidade microbiana no rúmen é alta e está associada com o material alimentar, disponibilidade de nutrientes e a redundância funcional. A estrutura da comunidade microbiana no rúmen é classificada em três grupos de micro-organismos: i) micro-organismos

associados à fibra, ii) micro-organismos associados à fase líquida e iii) micro-organismos associados ao epitélio ruminal (LARUE et al., 2005; CHO et al., 2006; SADET et al., 2007).

Neste estudo, os resultados obtidos pelo sequenciamento de ambas as regiões (V3 e V6-7) do gene 16S rRNA apontam a predominância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes no rúmen de *O. aries*. Estes resultados corroboram com os encontrados por Lopes et al. (2015), que encontraram no rúmen de *O. aries* uma predominância de Bacteroidetes seguido por Firmicutes. A colonização destes grupos no rúmen acontece via lactação nas primeiras horas de vida do animal. Recentes estudos metagenômicos do microbioma ruminal indicam a predominância do filo Proteobacteria nos estágios iniciais de bezerros neonatais (JAMI; MIZARAH, 2012). Os filos Bacteroidetes e Firmicutes se tornam predominantes com a transição da dieta, ou seja, de leite materno a forragem no primeiro ano e no segundo ano de vida (LI et al., 2012; JAMI et al., 2013). A diminuição de Bacteroidetes e o aumento de Firmicutes em vacas leiteiras tem sido reportado no segundo ciclo de lactação (JEWEL et al., 2015). Já a abundância de Firmicutes no rúmen foi apontada pela alta concentração de fibra na dieta (PITTA et al., 2014). Entretanto, em camundongos de laboratório o aumento de dietas gordurosas resultou em um aumento de Firmicutes e a redução de populações de Bacteroidetes (HILDEBRANDT et al., 2009). De Fillippo et al. (2010) demonstraram que humanos que receberam dietas com níveis moderados de gorduras tiveram a predominância de Bacteroidetes do que pessoas que receberam dietas ricas em proteína animal, que neste caso apresentou a predominância de Firmicutes.

A composição dietética modula o microbioma gastrointestinal dos mamíferos e pode levar ao desenvolvimento de várias doenças como, por exemplo, a obesidade em humanos (LEY et al., 2006). De fato, a taxa de aumento do filo Firmicutes em relação a Bacteroidetes está correlacionado a obesidade (KASAI et al., 2015). Em ruminantes, Jami et al. (2014) reportaram que o aumento de Firmicutes em vacas leiteiras esta positivamente correlacionado com a porcentagem de gordura no leite.

4.2.2 Determinação da composição da comunidade fúngica do rúmen via sequenciamento da região ITS2 (“internal transcribed spacer”) do rDNA

Na região ITS2 fúngica, o filo Neocallimastigomycota foi o mais abundante e representou 91% da abundância encontrada na fibra ruminal de *O. aries*. Os filos *Ascomycota* (4%) e *Basidiomycota* (3%) estiveram presentes em todas as amostras (Figura 31). Considerando o filo Neocallimastigomycota, dentro da família *Neocallimasticaceae* os

gêneros *Piromyces* (41%), *Neocallimastix* (19%), *Orpinomyces* (15%), *Anaeromyces* (11%), *Caecomyces* (3%) e *Cyllamyces* (1,5%) foram os representantes deste filo (Figura 32).

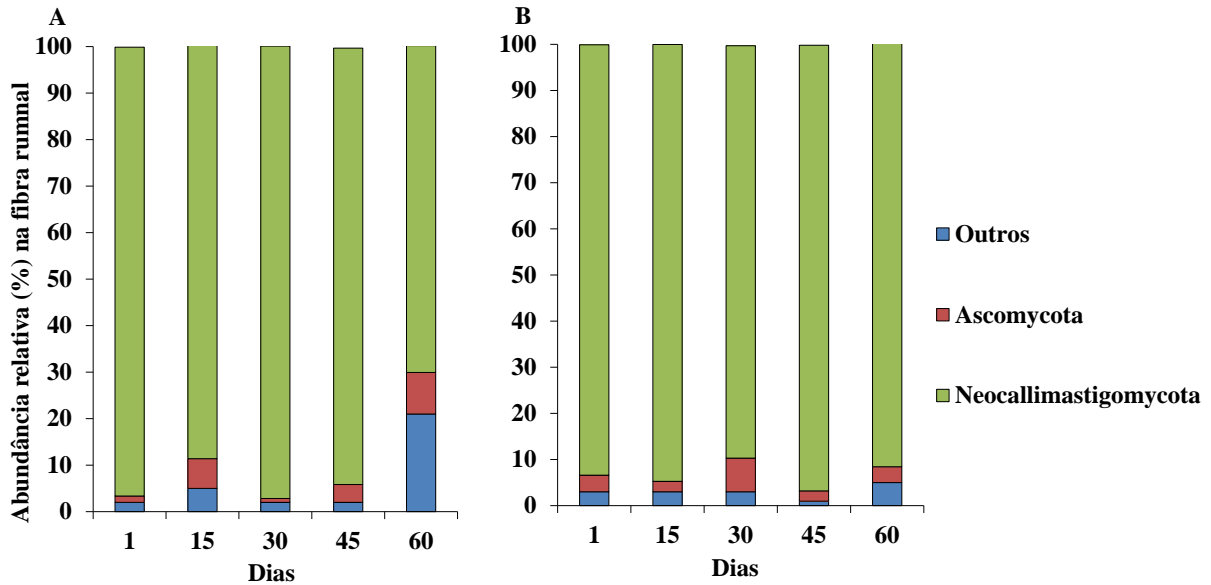


Figura 31 - Composição da comunidade fúngica da região ITS2 a nível de filo encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= fibra ruminal (dieta controle) e B= fibra ruminal (dieta bagaço)

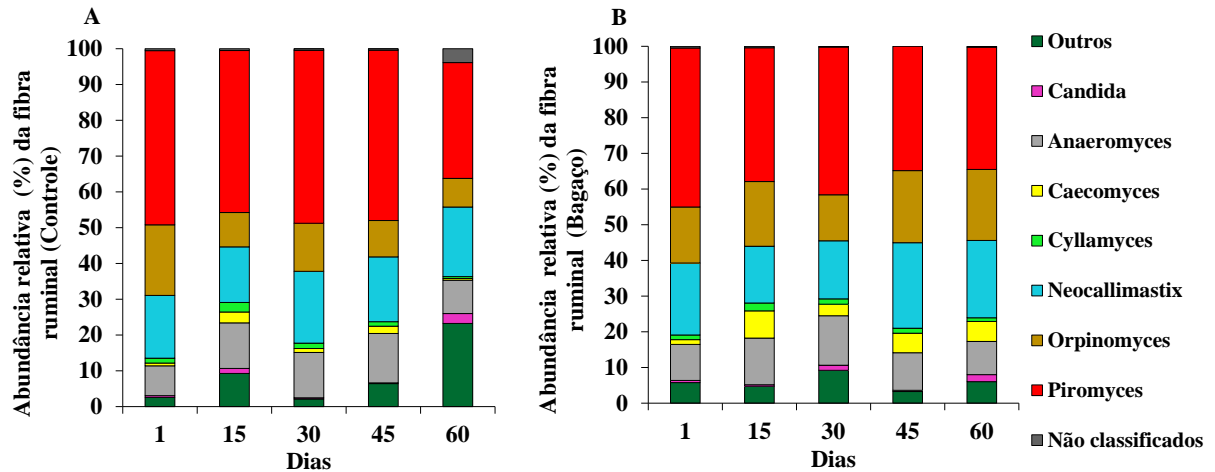


Figura 32 - Composição da comunidade fúngica da região ITS2 a nível de gênero encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= fibra ruminal (dieta controle) e B= fibra ruminal (dieta bagaço)

Foi observado que a abundância relativa do gênero *Caecomyces* foi significativamente maior na dieta bagaço aos 15, 30, 45 e 60 dias (Figura 33B, contrastes do tipo Tukey, $P < 0,05$). Além disso, o gênero *Caecomyces* apresentou diferenças significativas em sua abundância relativa no primeiro dia na dieta com bagaço de cana-de-açúcar (Figura 33B-2, “ANOVA-Type Statistic”, $P < 0,05$).

Na Tabela 12 estão representadas as 35 UTOS encontradas em 100% das amostras estudadas no rúmen de *O. aries* alimentados com dois tipos de dieta. As 35 UTOS foram classificadas nos gêneros *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Piromyces*, *Neocallimastix* e *Cyllamyces* (Tabela 12). Pertencentes ao filo Neocallimastigomycota (HIBBETT et al., 2007), originalmente descrito em ovelhas, este grupo de fungos anaeróbicos tem sido encontrado no rúmen, no intestino e fezes de ruminantes e em mamíferos herbívoros, bem como em herbívoros reptilianos (MACKIE et al., 2004). Os fungos anaeróbicos são micro-organismos fibrolíticos e produzem uma ampla variedade de enzimas ligadas a célula, bem como enzimas livres para o ataque a parede celular vegetal, principalmente a celulose e hemicelulose (WILLIAMS; ORPIN, 1987). A natureza anaeróbica e afiliação eucariótica tem sido um fator limitante para o isolamento e a caracterização destes micro-organismos em laboratório (LIGGESNSTOFFER et al., 2010).

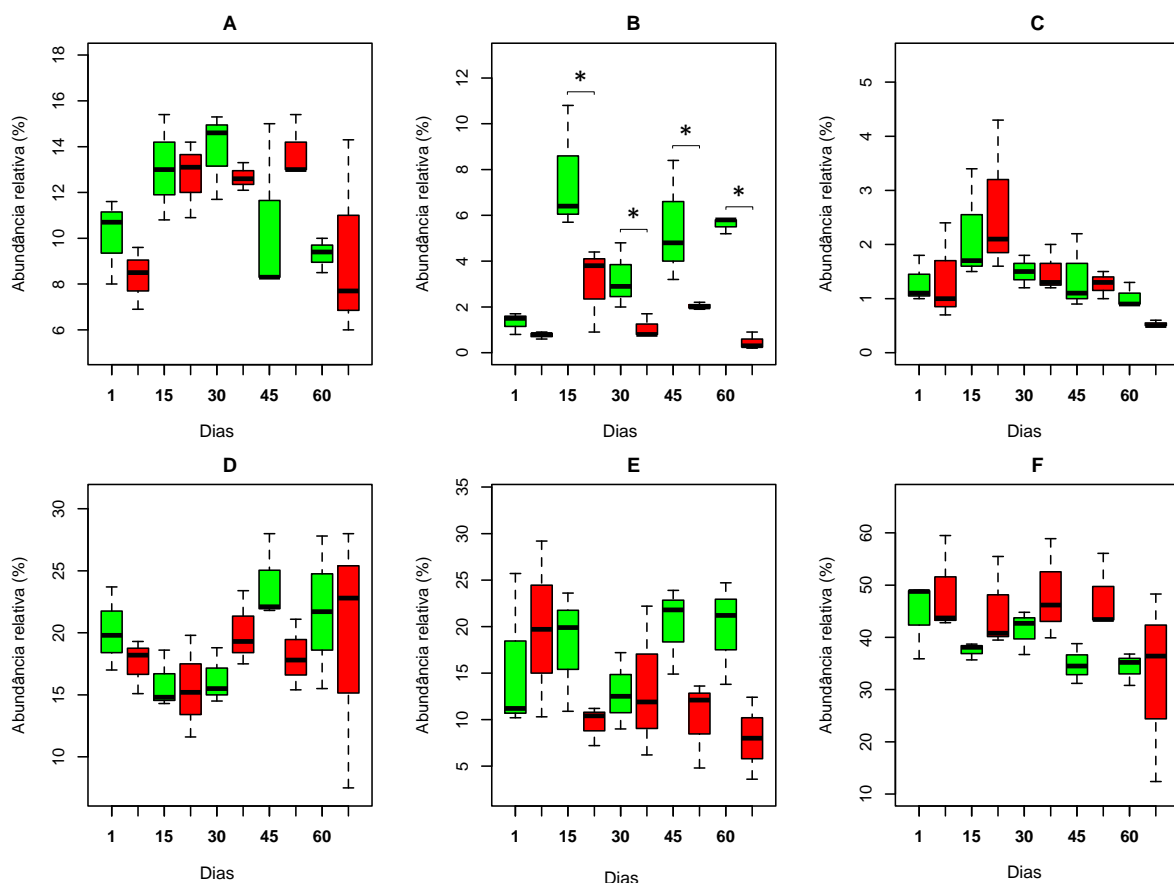


Figura 33 - Abundância relativa (%) a nível de gênero da região ITS2 fúngica encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A= *Anaeromyces*; B= *Caecomyces*; C= *Cyllamyces*; D= *Neocallimastix*; E= *Orpinomyces* e F= *Piromyces*. As amplitudes dos “boxes” vão do 25º ao 75º percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Asteriscos indicam diferenças significativas entre a dieta controle e bagaço dentro de cada coleta (* $P < 5\%$)

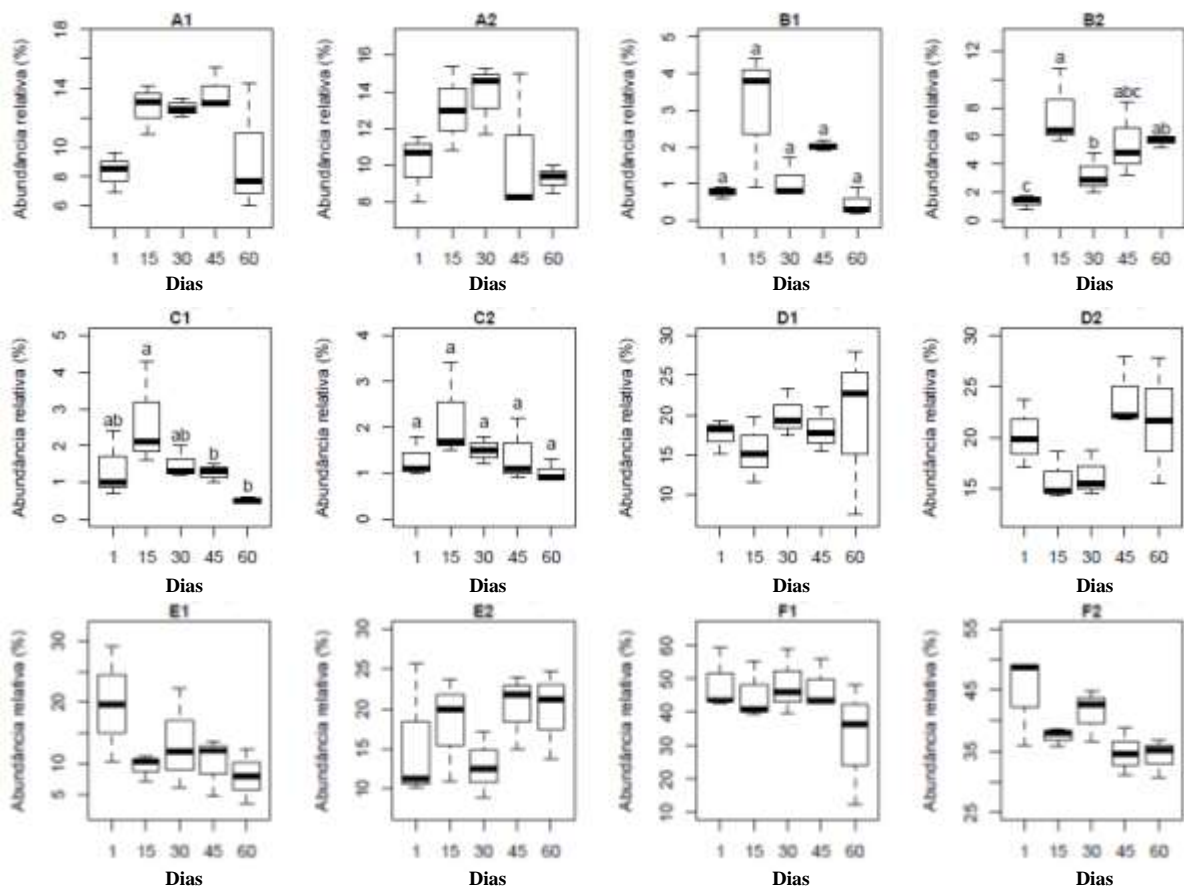


Figura 34 - Abundância relativa (%) a nível de gênero da região ITS2 fúngica encontrada na fibra ruminal de carneiros (*Ovis aries*) alimentados com dois tipos de dietas ao longo de 60 dias. A1= Anaeromyces (dieta controle); A2= Anaeromyces (dieta bagaço); B1= Caecomyces (dieta controle); B2= Caecomyces (dieta bagaço); C1= Cyllamyces (dieta controle); C2= Cyllamyces (dieta bagaço); D1= Neocallimastix (dieta controle); D2= Neocallimastix (dieta bagaço); E1= Orpinomyces (dieta controle); E2= Orpinomyces (dieta bagaço); F1= Piromyces (dieta controle) e F2= Piromyces (dieta bagaço). As amplitudes dos “boxes” vão do 25º ao 75º percentis sem “outliers” com a mediana indicada pela linha horizontal em negrito. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as variáveis de acordo com o teste não paramétrico de comparações múltiplas para efeitos relativos (contrastes do tipo Tukey, $P < 5\%$)

Tabela 12 - Composição do 'core' fúngico no microbioma ruminal de *O. aries*. Os gêneros listados são todos pertencentes à família Neocallimastigaceae do filo Neocallimastigomycota

UTO*	Gênero
483846	<i>Anaeromyces</i>
150190	<i>Orpinomyces</i>
782554	<i>Anaeromyces</i>
974103	<i>Piromyces</i>
974108	<i>Piromyces</i>
997064	<i>Neocallimastix</i>
101	<i>Cyllamyces</i>
105	<i>Neocallimastix</i>
104	<i>Piromyces</i>
1062	<i>Piromyces</i>
1063	<i>Piromyces</i>
1314	<i>Piromyces</i>
1313	<i>Piromyces</i>
143	<i>Neocallimastix</i>
1237	<i>Piromyces</i>
1074	<i>Cyllamyces</i>
1093	<i>Neocallimastix</i>
1011	<i>Orpinomyces</i>
1451	<i>Piromyces</i>
1204	<i>Piromyces</i>
1030	<i>Orpinomyces</i>
1032	<i>Orpinomyces</i>
1738	<i>Neocallimastix</i>
1193	<i>Piromyces</i>
1006	<i>Neocallimastix</i>
1132	<i>Piromyces</i>
1115	<i>Piromyces</i>
1293	<i>Piromyces</i>
1107	<i>Orpinomyces</i>
1254	<i>Piromyces</i>
1004	<i>Anaeromyces</i>
1003	<i>Orpinomyces</i>
1018	<i>Orpinomyces</i>
1016	<i>Piromyces</i>
1188	<i>Piromyces</i>

*OTUs encontradas em 100% das amostras analisadas

A análise de coordenadas principais utilizando as sequências da região ITS2 fúngica não mostrou separação clara entre os tratamentos avaliados (dieta controle vs. dieta bagaço) (Figura 31). Apenas aos 15 dias foi observada uma separação entre as dietas (Figura 31C). Usando a mesma abordagem aplicada à sequências de 16S rRNA, foram selecionadas as OTUs que contribuíram para a separação entre as dietas na fibra ruminal (Tabela 13). De acordo com a análise de Simper, 18 UTOs contribuíram com 25,73% da separação entre as dietas. Três OTUs foram classificadas pertencentes ao gênero *Neocallimastix* e três ao gênero *Orpinomyces*, duas UTOs do gênero *Anaeromyces*, cinco ao gênero *Piromyces* e os gêneros *Malassezia*, *Candida* e *Wallemia* apresentaram uma UTO cada (Tabela 10).

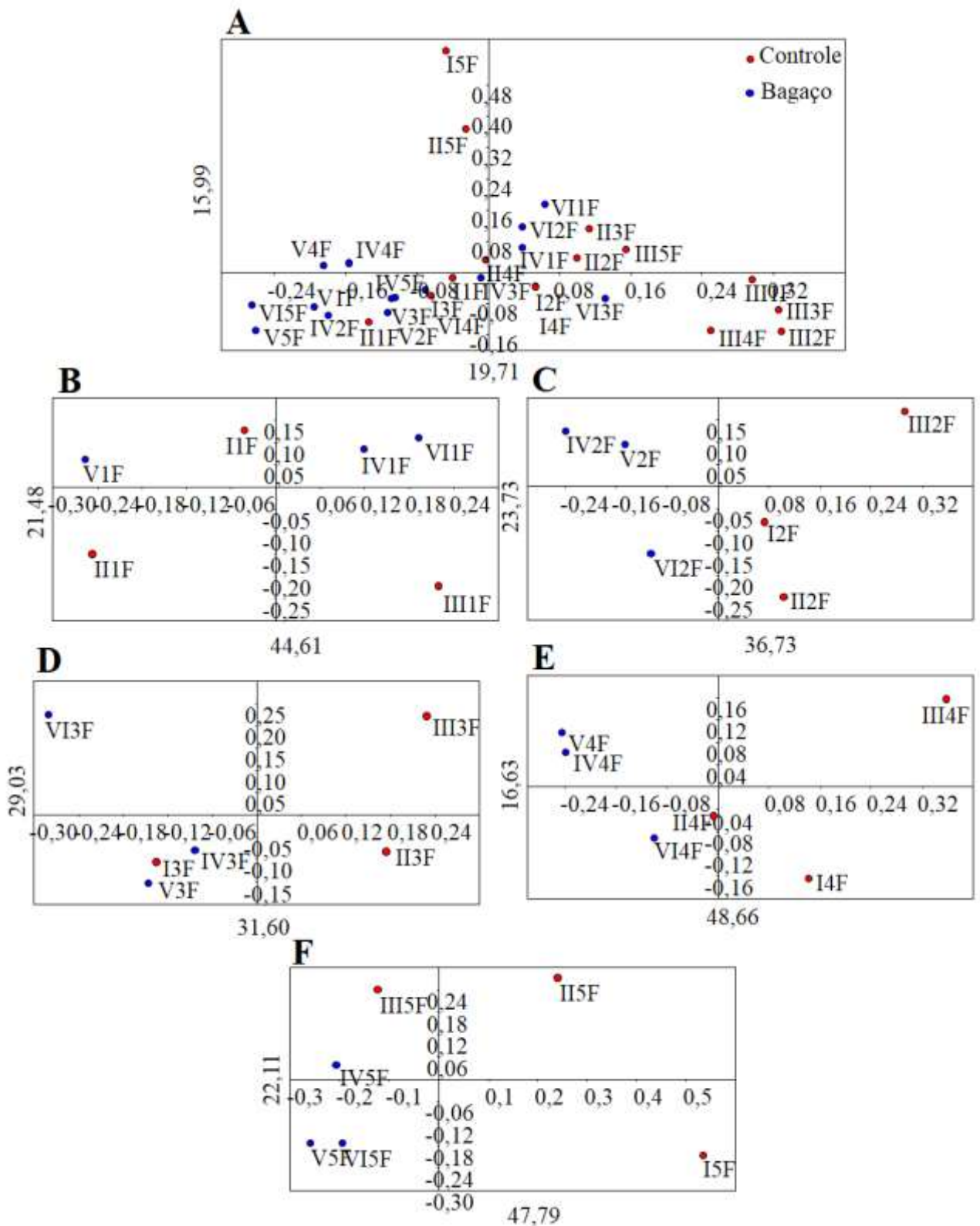


Figura 35 - Análise de coordenadas principais (PCoA) usando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis com as UTOs (3% de dissimilaridade) da região ITS2. (A) UTOs ao longo de 60 dias, analisando a estrutura da comunidade fúngica na fibra ruminal. (B) fibra ruminal no primeiro dia; (C) fibra ruminal aos 15 dias; (D) fibra ruminal aos 30 dias; (E) fibra ruminal aos 45 dias; (F) fibra ruminal aos 60 dias

Tabela 13 - Análise de dissimilaridade (Simper) da região ITS2 fúngica da fibra ruminal aos 60 dias*

UTO	I5F	II5F	III5F	IV5F	V5F	VI5F	Taxonomia	Contribuição%	Acumulativo%
997064	1380	4430	6110	5420	3530	4390	Neocallimastix	3,042	3,042
1761	10	120	0	690	2190	1750	Orpinomyces	2,547	5,589
782554	100	270	1900	1920	1970	1710	Anaeromyces	1,957	9,506
1591	0	190	10	890	1120	1210	Orpinomyces	1,709	11,22
782547	10	0	1740	1900	310	650	Neocallimastix	1,579	12,79
1193	390	1610	1060	430	340	170	Piromyces	1,215	14,01
1418	720	1770	0	360	290	390	Anaeromyces	1,213	15,22
743636	1800	0	0	20	0	0	Malassezia	1,023	16,25
974103	30	30	1050	750	560	1080	Piromyces	1,023	17,27
1001	0	0	1100	520	840	370	Piromyces	0,9491	19,2
1011	50	110	70	320	610	940	Orpinomyces	0,9283	20,13
727593	0	910	0	1180	110	0	Candida	0,8604	20,99
1263	490	1250	0	150	240	330	Piromyces	0,8491	21,84
1569	0	50	0	310	570	590	Neocallimastix	0,8038	22,64
4072	1070	330	20	0	0	60	Wallemia	0,7849	23,42
1645	80	40	1250	340	310	70	Piromyces	0,7792	24,2
1040	0	90	10	210	610	640	Piromyces	0,7698	24,97
1103	0	10	940	300	650	260	Piromyces	0,7547	25,73

*Dissimilaridade média global: 68

Neste estudo, o filo Neocallimastigomycota representou mais de 90% das sequências analisadas da região ITS2 fúngica. Membros deste filo são caracterizados como anaeróbicos obrigatórios e residentes no trato digestivo de herbívoros ruminantes (ORPIN, 1975). Existem cerca de 20 espécies relatadas (GRIFFITH et al., 2009; SIROHI et al., 2013). Contudo, a caracterização taxonômica de algumas destas espécies é ainda incerta (HIBBETT; BINDER; BISCHOFF, 2007).

Os seis gêneros caracterizados no rúmen de *O. aries* que estão agrupados no filo Neocallimastigomycota são divididos em dois grupos, baseados em padrões de crescimento: monocêntricos (*Neocallimastix*, *Piromyces* e *Caecomycetes*) ou policêntricos (*Orpinomyces*, *Anaeromyces* e *Cyllamyces*). Basicamente, as diferenças entre os gêneros acima, residem na natureza de crescimento dos zoósporos, rizóides, esporângios e talos, como descrito por HO e BARR (1995). Os gêneros *Neocallimastix* e *Orpinomyces* são formados por zoósporos com múltiplos flagelos. Membros dos gêneros *Cyllamyces* e *Caecomycetes* formam bulbos chamados “holdfasts” e os gêneros *Piromyces* e *Anaeromyces* são caracterizados pelos seus rizóides (FLIEGEROVA; HODROVA; VOIGT, 2004).

O isolamento dos gêneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces* e *Anaeromyces* tem sido descrito em ruminantes domésticos e selvagens (ORPIN, 1989). Os gêneros *Cyllamyces* e *Caecomycetes* têm sido descritos apenas em gado domesticado (OZKOSE et al., 2001). Lee et al. (2000) discutiram o quão os fungos no rúmen são importantes para a nutrição do hospedeiro, pelo seu papel na degradação do material lignocelulolítico vegetal. Os fungos

anaeróbicos ruminais possuem enzimas de ruptura física do material vegetal e nos últimos anos tem despertado interesse para o processamento de biocombustível e biogás (YOUSSEF et al., 2013; GRUNINGER et al., 2014). No presente estudo, o gênero *Caecomyces* foi significativamente mais abundante em animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar, possivelmente devido a seu rizóide bulboso que pode penetrar e expandir dentro da matriz celulolítica e, assim, hidrolisar facilmente os tecidos vegetais (JOBLIN et al., 2010).

Youssef et al. (2013) publicaram recentemente o genoma de uma linhagem C1A de *Orpinomyces* sp.. Eles encontraram uma ampla diversidade de enzimas ativas em carboidratos e muitas dessas enzimas podem ter sido adquiridas através de transferência horizontal de genes de bactérias. Os fungos anaeróbicos possuem uma maquinaria celulolítica de enzimas livres e um complexo multi enzimático extracelular chamado celulosoma (KRAUSE et al., 2003; JOBLIN et al., 2010).

4.3 Correlação entre a estrutura da comunidade bacteriana e parâmetros físico-químicos

Neste estudo, foram utilizadas duas estratégias para analisar a estrutura da comunidade bacteriana no rúmen de *O. aries* alimentados com dois tipos de dieta. A primeira estratégia foi a análise de componentes principais (PCA) ‘Constrained’, em que foi utilizada a abundância relativa a nível de família encontradas na fibra e líquido ruminal apenas aos 60 dias. A segunda estratégia foi a análise de redundância (RDA), no qual foram utilizadas as UTOs presentes apenas na fibra ruminal que contribuíram para a separação entre as dietas aos 60 dias.

Visando detalhar os parâmetros que regem a estrutura da comunidade bacteriana presentes na fibra e líquido ruminal de *O. aries* aos 60 dias, foi realizada uma correlação entre ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGCC), e os parâmetros de digestibilidade com a abundância relativa a nível de família por meio da análise de componentes principais (PCA) ‘Constrained’ (Figura 36), separadamente.

Considerando os AGCC da fibra e líquido ruminal, a resposta da estrutura da comunidade bacteriana entre as dietas foram distintas (Figura 36). Nas duas análises foram observadas separações entre as amostras de natureza amostral (fibra ou líquido ruminal), contudo, a somatória das porcentagens da relação entre os perfis da comunidade com os parâmetros avaliados foi distinta (84,59; 97,34, respectivamente). Em amostras de fibra ruminal, a família *Ruminococcaceae* mostrou interação com os valores de acetato (Figura

36A). No líquido ruminal, os grupos RF39 e Clostridiales mostraram interação com os valores de acetato. Além disso, a ordem Bacteroidales mostrou interação com os valores de isovalerina e valerina aos 60 dias (Figura 36B).

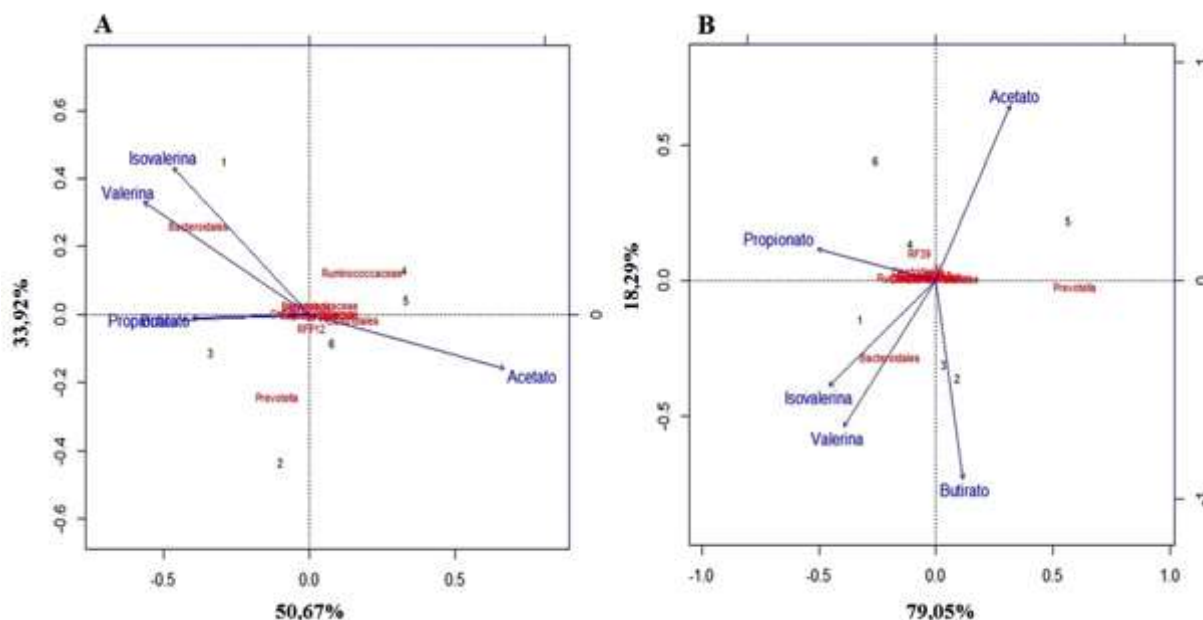


Figura 36 - Análise de componentes principais (PCA) “Constrained” correlacionando os parâmetros de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGCC) com as famílias de Bactéria da região V6 do gene 16S rRNA provenientes da (A) fibra e do (B) líquido ruminal aos 60 dias. As amostras 1, 2 e 3= I5F, II5F e III5F (dieta controle); 4, 5 e 6= IV5F, V5F e VI5F (dieta bagaço)

Numa análise similar, porém, considerando o parâmetro de digestibilidade, foi possível observar novamente a separação entre as dietas (Figura 37). Os valores de somatória das porcentagens da relação entre os perfis de comunidades com os parâmetros avaliados tiveram a mesma tendência de separação observada na análise anterior, sendo encontradas porcentagens explicadas de 81,59% e 81,86%, respectivamente (Figura 37).

Em amostras de fibra ruminal, os animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar foram distintos da dieta controle. A família Ruminococcaceae mostrou interação com os valores de consumo de matéria orgânica (MO) e consumo de hemicelulose (HEM) (Figura 37A). No líquido ruminal, as famílias Ruminococcaceae, Clostridiales e RF39 interagiram com o consumo de matéria orgânica, hemicelulose, fibra detergente ácido e fibra detergente neutro (Figura 37B).

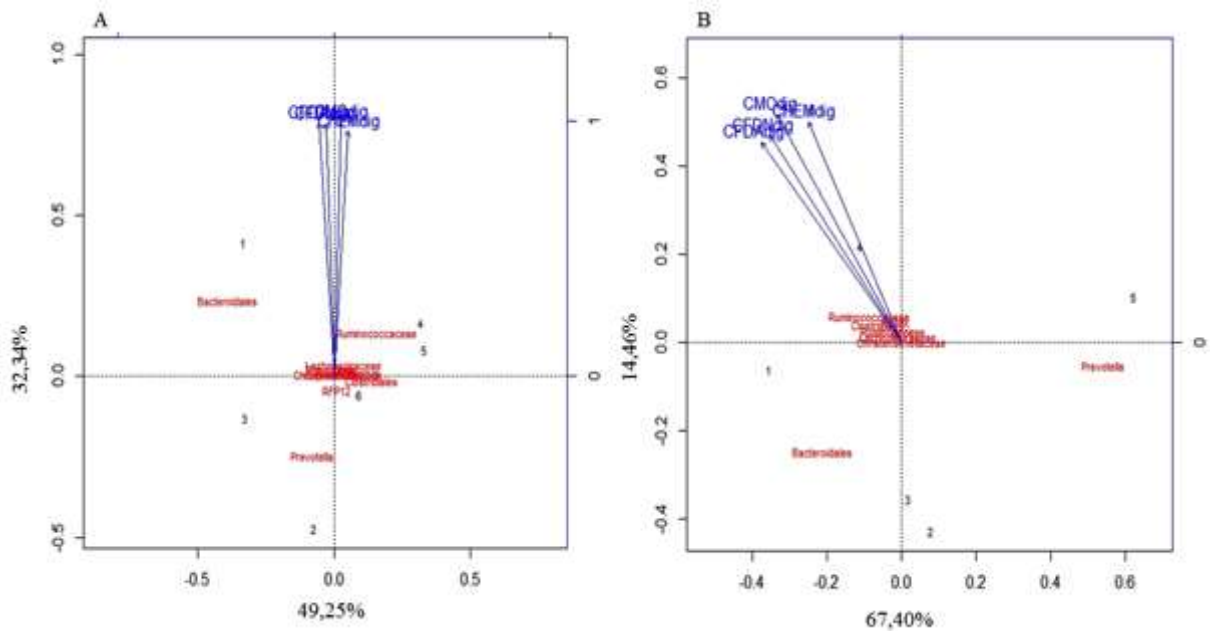


Figura 37 - Análise de componentes principais (PCA) “Constrained” correlacionando os parâmetros de digestibilidade com as famílias de Bactéria da região V6 do gene 16S rRNA provenientes da (A) fibra e (B) líquido ruminal aos 60 dias. As amostras 1, 2 e 3= I5F, II5F e III5F (dieta controle); 4, 5 e 6= IV5F, V5F e VI5F (dieta bagaço)

A segunda abordagem utilizada neste estudo, foi correlacionar os parâmetros de digestibilidade e ácidos graxos voláteis com as UTOs (97% de similaridade) selecionadas pela análise de SIMPER (Tabela 8), as quais contribuíram para a separação entre as dietas aos 60 dias.

A análise de DCCA gerou um valor menor que 3 (1,158) e, desta forma, foi utilizado a análise de redundância (RDA), um modelo matemático baseado na distribuição linear (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009). A análise de redundância mostrou a interação das UTOS 62123 pertencente ao gênero *Succiniclastium*, as UTOS 47940, 10158, 53498 da ordem Bacteroidetes, UTO 9481 ao gênero *Prevotella* e a UTO 71199 do gênero *Clostridium* (Tabela 8) com acetato e pH (Figura 38). Apenas a UTO 112362 pertencente a família Ruminococcaceae apresentou interação com a hemicelulose. As variáveis ruminais explicam 87,9% e apenas o eixo 1 explica 71,8%. O teste de permutação de Monte Carlo apontou os atributos usados no teste e que não foram significativos (Tabela 14). As UTOS 1123, 13102 e 55852 pertencentes a ordem Bacteroidetes mostraram interação com o isobutirato (Figura 38).

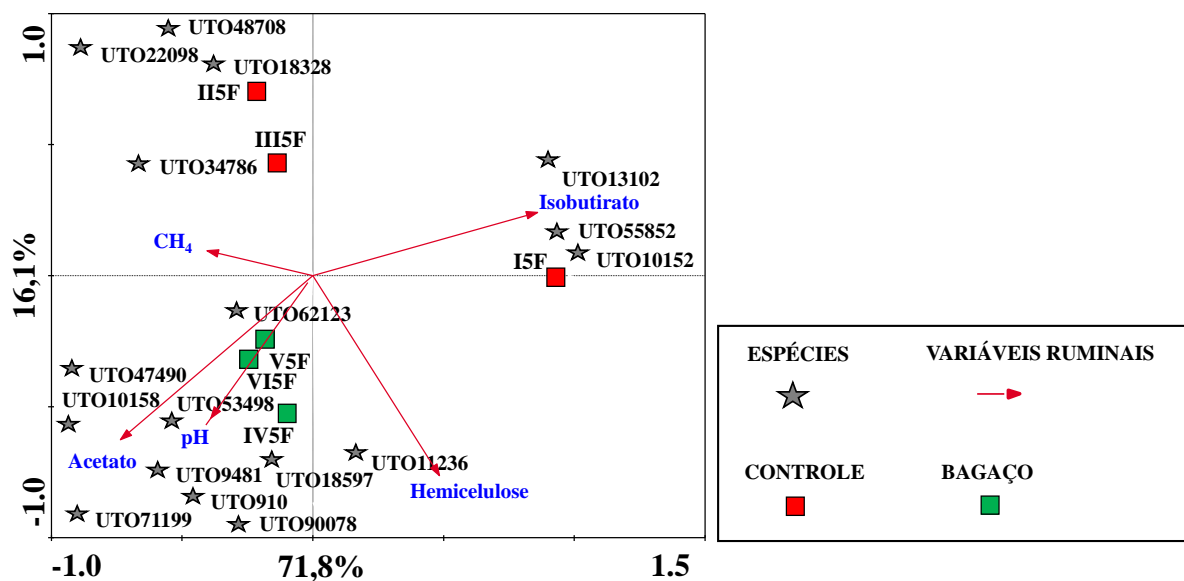


Figura 38 - Análise de redundância (RDA) baseado nas UTOS (97% de similaridade) da região V6-V7 do gene 16S rRNA selecionadas pela análise de SIMPER correlacionando os parâmetros de digestibilidade provenientes da fibra ruminal aos 60 dias. Os animais I5F, II5F e III5F= dieta controle; IV5F, V5F e VI5F= dieta bagaço. Os valores nos eixos 1e 2 indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

Tabela 14 - Valores do teste de Monte Carlo das variáveis ruminais

Variáveis	Var.N	LambdaA	P	F
Isobutirato	15	0.55	0.010	4.90
Hemicelulose	7	0.21	0.188	2.52
CH ₄	18	0.10	0.292	1.56
pH	16	0.09	0.364	1.77
Acetato	10	0.05	1.000	0.00

Para a comunidade fúngica foi utilizada a mesma abordagem feita para a comunidade bacteriana, correlacionando os parâmetros de digestibilidade e ácidos graxos voláteis com as UTOS (97% de similaridade) selecionadas pela análise de SIMPER (Tabela 10), as quais contribuíram para a separação entre as dietas aos 60 dias (Figura 39).

A análise de DCCA gerou um valor menor que 3 (0,860) e desta forma foi utilizado a análise de redundância (RDA), o mesmo usado na região V6 do gene 16S rRNA. A análise de redundância mostrou a interação das UTOS 1761 e 1591, pertencentes ao gênero *Orpinomyces*, e as UTOS 1011, 1569 e 1040, pertencentes ao gênero *Piromyces*, com produção de acetato. As UTOS 782554, 1001 e 1103, pertencem ao gênero *Piromyces*, e outra UTO 974103, classificada no gênero *Malassezia*, apresentaram correlação positiva com o pH (Figura 39). A UTO 727593, pertencente ao gênero *Candida* correlacionou-se com a produção de CH₄. As variáveis ruminais explicaram 81,5%, o eixo 1 explicou 56,3% e, o eixo, 2 25,2%. O teste de permutação de Monte Carlo mostrou que os atributos usados no teste não

foram significativos (Tabela 15). As UTOs 1263 e 1418, classificadas nos gêneros *Piromyces* e *Anaeromyces*, mostraram interação com a produção de isobutirato (Figura 39).

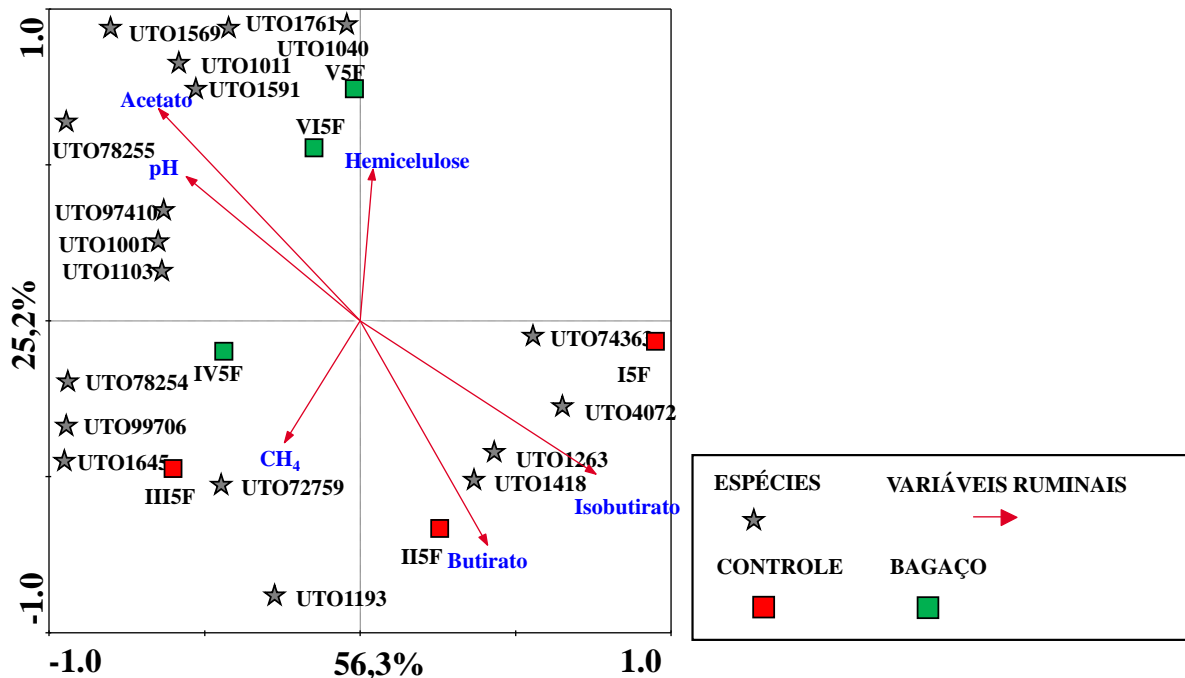


Figura 39 - Análise de redundância (RDA) baseado nas UTOS (97% de similaridade) da região ITS2 fúngica selecionadas pela análise de SIMPER correlacionando os parâmetros de digestibilidade provenientes da fibra ruminal aos 60 dias. Os animais I5F, II5F e III5F= dieta controle; IV5F, V5F e VI5F= dieta bagaço. Os valores nos eixos 1 e 2 indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

Tabela 15 - Valores do teste de Monte Carlo das variáveis ruminais

Variáveis	Var.N	LambdaA	P	F
Isobutirato	15	0.40	0.054	2.66
Hemicelulose	7	0.16	0.526	1.06
Acetato	10	0.09	0.572	0.51
CH4	18	0.09	0.678	0.36
Butirato	12	0.26	1.000	0.00

Em relação ao método empregado, inúmeros trabalhos têm usado esta sistemática para inferir sobre importantes parâmetros da estruturação de comunidades microbianas, principalmente sobre as comunidades microbianas e metabolitos associados ao rúmen, os quais são importantes para a compreensão da saúde e desempenho de animais ruminantes (LEE et al., 2012). Lopes et al. (2015) utilizaram este método para inferir sobre os principais fatores que afetam a estrutura da comunidade bacteriana no rúmen de *O. aries*. Eles observaram correlações positivas entre a abundância relativa da família Prevotellaceae com a degradabilidade da matéria orgânica.

A dieta é um fator chave para as variáveis que afetam o microbioma ruminal, como também espécies de ruminantes e a sua localização geográfica (HENDERSON et al., 2015). O efeito da dieta pode estar correlacionado com uma mudança nas proporções de volumoso:concentrado, o que pode resultar em alterações complexas na diversidade do microbioma ruminal (RUSSEL; RYCHLIK, 2001). Para avaliar corretamente um ecossistema microbiano é necessário integrar as influências de fatores abióticos e bióticos na estrutura da comunidade e biodiversidade. Para isso, a diversidade microbiana presente no rúmen de *O. aries* é influenciada diretamente pelo tipo de dieta, principalmente a suplementada com bagaço de cana-de-açúcar. A importância de se caracterizar os parâmetros de digestibilidade animal é a de entender quais fatores afetam a diversidade microbiana no rúmen e, conseqüentemente, ter uma visão mais clara da fermentação da parede celular vegetal pela comunidade microbiana.

4.4 Potencial funcional do microbioma do rúmen de ovinos

4.4.1 Micro-organismos do rúmen envolvidos na desconstrução de biomassa acessados via sequenciamento de DNA total

Para a identificação dos micro-organismos envolvidos na desconstrução da biomassa vegetal foram construídas seis bibliotecas a partir do DNA total obtido da fibra ruminal de seis animais alimentados com duas dietas distintas após 30 dias. A escolha deste tempo amostral foi feita considerando os resultados da região V3 e V6-7 do gene 16S rRNA bacteriano. O *output* do sequenciamento das seis bibliotecas foi depositado no MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) (Tabela 16). Após o controle de qualidade feito pelo servidor, o número de seqüências por biblioteca variou de 3.078.430 (amostra II3F) a 6.842.223 (amostra I3F) com o comprimento médio de 100 pares de bases (Tabela 16).

Foi gerado no MG RAST as curvas de rarefação das seqüências anotadas da dieta controle e bagaço (Figura 40). A abundância de espécies e o índice de diversidade em cada uma das seis amostras apresentaram valores próximos. O animal VI3F apresentou o maior índice de riqueza (número de espécies) entre as amostras analisadas no rúmen de carneiros (Figura 40). Todas as amostras apresentaram as curvas de rarefação íngremes a esquerda, apontando que o sequenciamento atingiu uma boa cobertura de espécies no microbioma ruminal de *O. aries*.

Tabela 16 - Valores dos dados do sequenciamento metagenômico das amostras de fibra ruminal aos 30 dias anotados pelo MG-RAST

Dado MG-RAST	Dieta controle			Dieta bagaço		
	I3F	II3F	III3F	IV3F	V3F	VI3F
Pré-Controle de qualidade						
Número bp	1.298.861.050	735.273.463	995.444.617	1.214.596.985	2.289.889.344	1.300.537.606
Número de sequências	12.350.843	6.209.421	8.725.412	9.404.062	17.123.962	10.815.426
Comprimento Médio (pb)	105±24	118 ± 31	114 ± 27	129 ± 37	133 ± 41	120 ± 31
Conteúdo médio CG (%)	44±11	37 ± 13	42 ± 11	44 ± 11	39 ± 12	44 ± 10
Pós-Controle de qualidade						
Número bp	667.085.562	302.653.189	478.336.203	512.131.092	877.898.817	608.608.066
Número de sequências	6.842.223	3.078.430	4.801.547	4.954.082	8.676.055	5.891.767
Comprimento Médio (pb)	97±21	98 ± 28	99 ± 26	103 ± 33	101 ± 35	103 ± 29
Conteúdo médio CG (%)	45±11	38 ± 13	42 ± 11	44 ± 11	40 ± 12	45 ± 10
Predição de proteínas	4.990.402	2.062.496	3.373.487	3.422.102	5.526.361	4.128.938
Proteínas identificadas	971.605	367.467	620.682	746.905	1.069.403	893.217
Categorias funcionais	497.558	190.817	308.195	383.283	540.504	446.774

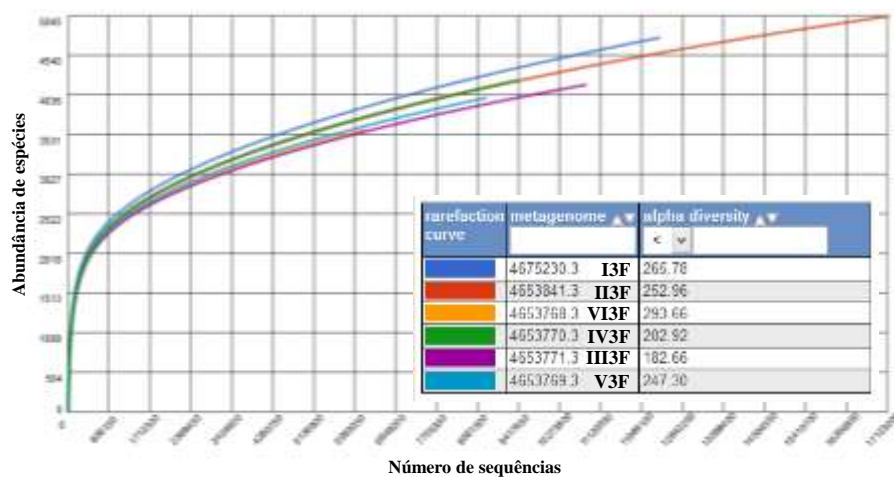


Figura 40 - Curva de rarefação das sequências anotadas no MG-RAST de amostras da dieta controle (I3F, II3F e III3F) e dieta bagaço (IV3F, V3F e VI3F)

A curva de rarefação da diversidade de espécies em cada animal aos 30 dias mostrou que não houve diferenças significativas entre as dietas (Figura 18, $P < 0,05$). O número de espécies no rúmen é enorme e com uma ampla capacidade fisiológica ao longo dos múltiplos grupos microbianos (WEIMER, 2015). Pitta et al. (2014) mostraram que dietas ricas em forragens possuem uma diversidade maior de micro-organismos do que as dietas ricas em

grãos, e isto se deve a complexidade de carboidratos estruturais encontrados na parede celular vegetal de forragens.

No presente estudo, foi realizada a anotação das sequências de genes para as funções metabólicas usando o banco de dados SEED no servidor MG-RAST. Foi gerado um ‘heatmap’ que apontou a disposição dos subsistemas funcionais do nível 1 e o metabolismo de carboidratos e subsistemas baseados em agrupamentos foram os mais abundantes, além disso, não houve o agrupamento das amostras por dieta (Figura 41).

A análise de coordenadas principais (PCA) das funções anotadas no banco de dados SEED Subsystems, apontou a heterogeneidade funcional das amostras de fibra ruminal (Figura 42). Contudo, no eixo 2 (18,7%) ocorreu a separação entre os tratamentos controle e bagaço (Figura 42).

O metabolismo do carboidrato foi encontrado por ser a mais significativa atividade metabólica no rúmen de *O. aries*. Foi realizada a busca de potenciais enzimas lignocelulolíticas para identificar sequências de genes putativos de carboidratos ativos em seis bibliotecas metagenômicas.

A maior parte da vida microbiana ainda não foi cultivada e nos dias de hoje é ainda um desafio devido as limitações das técnicas atuais disponíveis. Estima-se que apenas 1% da diversidade conhecida foi cultivada a partir de ambientes e esta proporção é ainda maior para o microbioma ruminal (DENMAN; McSWEENEY, 2015). Por isso, o uso de técnicas metagenômicas supera a necessidade de culturas e tornou-se uma ferramenta importante para a compreensão do potencial genômico que reside no microbioma ruminal. Esta técnica aliada ao desenvolvimento de algoritmos em bioinformáticas, tem mostrado substancial precisão e tem melhorado os estudos de uma única espécie microbiana (PATIL et al., 2011).

Brulc et al. (2009) foram os primeiros a realizarem um sequenciamento metagenômico comparando a variação entre a fração fibrosa e líquido ruminal. Eles observaram que o sistema de colonização inicial na parede celular vegetal pelos micro-organismos tem como alvo as cadeias laterais dos polissacarídeos e não diretamente a celulose (BRULC et al., 2009). O processo dinâmico entre os colonizadores iniciais que cancelam ou removem a hemicelulose é sincronizado pelos micro-organismos que se ligam e degradam as principais cadeias de celulose (BRULC et al., 2009). Hess et al. (2011) utilizaram o rúmen como um fermentador de celulose alimentados com gramíneas e mostraram que os micro-organismos ruminais colonizam e degradam rapidamente a biomassa vegetal. No mesmo estudo, foram identificados 27.755 genes putativos a carboidratos ativos que expressaram 90 proteínas

candidatas, dos quais 57% eram enzimas ativas contra substratos celulósicos e montaram 15 genomas microbianos, incluindo o genoma de uma única célula (HESS et al., 2011).

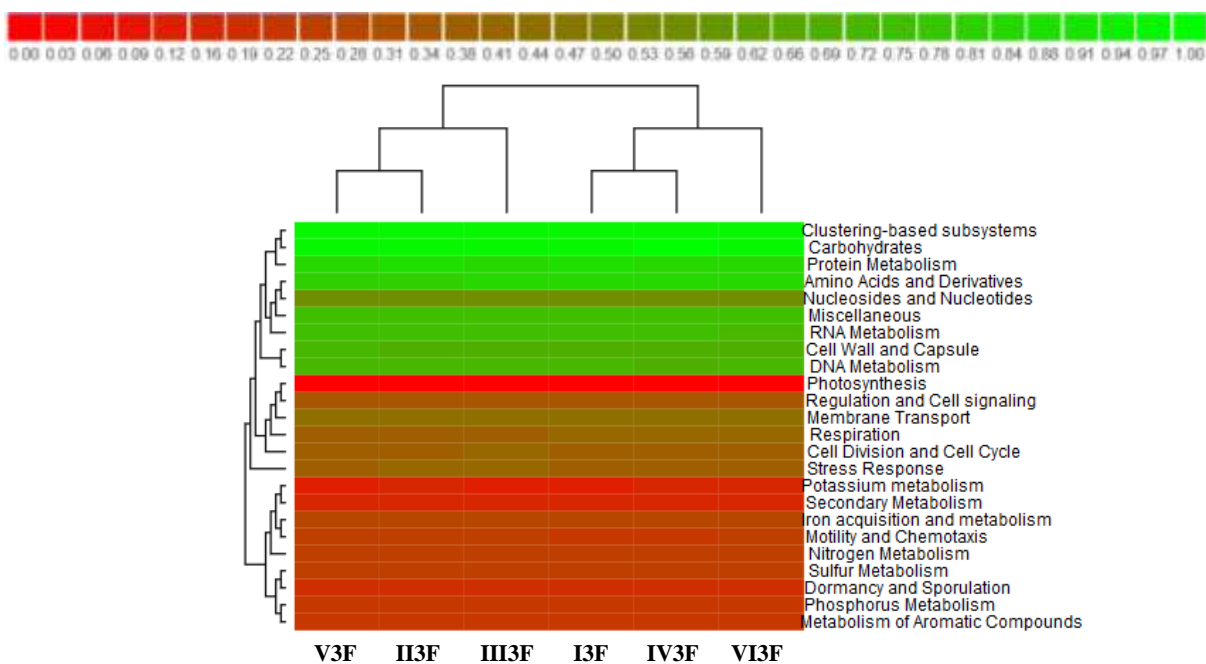


Figura 41 - Análise de agrupamento da classificação funcional usando o heatmap gerado no MG-RAST segundo o banco de dados SEED Subsystems, baseado na abundância de proteínas a nível 1. As amostras I3F, I13F e III3F são os animais que receberam a dieta controle; IV3F, V3F e VI3F são os animais que receberam a dieta bagaço

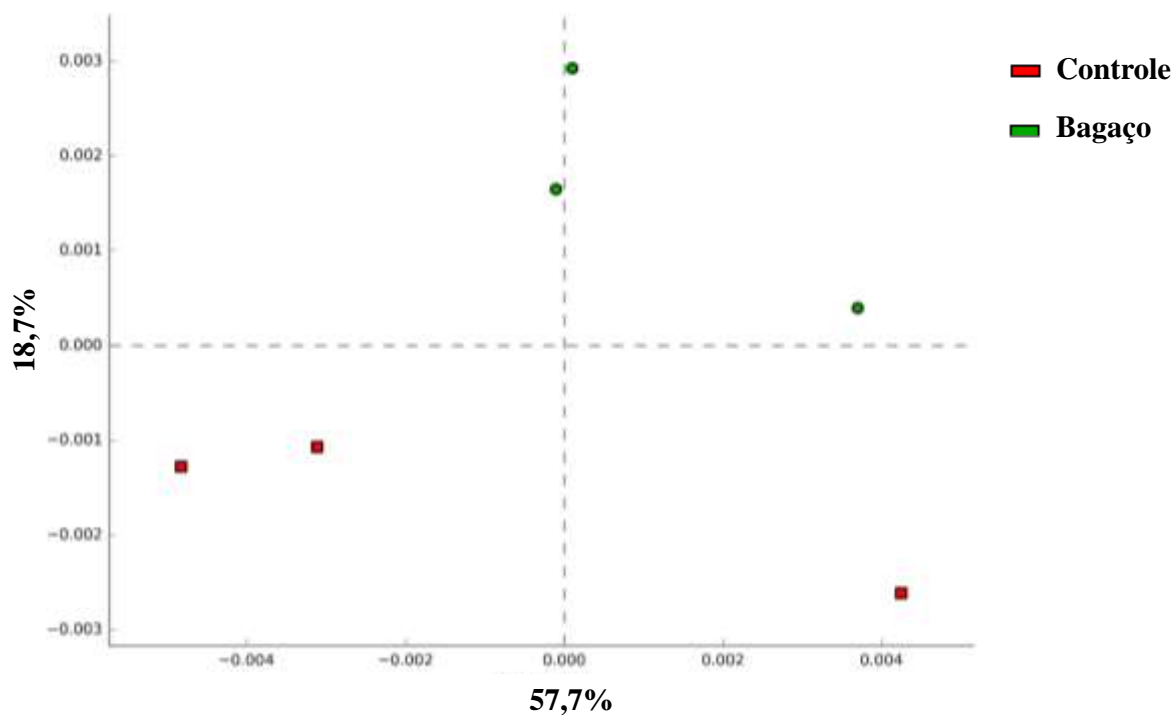


Figura 42 - Análise de Componentes Principais (PCA) das funções anotadas com o banco de dados *SEED Subsystems* nas amostras da fibra ruminal aos 30 dias

As principais enzimas envolvidas na despolimerização de carboidratos estruturais, tais como a celulose e hemicelulose, detectadas no rúmen de *O. aries* alimentados com uma dieta suplementada com bagaço de cana-de-açúcar, estão listadas na Tabela 17. Além disso, foi possível identificar uma família de módulos ligadas a carboidratos (CBM), classificada como CBM2 ligadas a celulose (Tabela 17). Também foram identificadas enzimas relacionadas a desramificação do glicogênio, dockerin e SusC (Tabela 17). Foi observado que a frequência de enzimas na fibra ruminal de animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar foi maior em relação ao controle. Principalmente, as enzimas envolvidas na despolimerização da celulose, como por exemplo a enzimas 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18) ($p= 0,034$), β -xilosidase (EC 3.2.1.37) ($p= 4,37e-4$), xilosidase isomerase (EC 5.3.1.5) ($p= 0,025$), celobiose fosforilase (EC2.4.1.-) ($p= 0,034$), α -galactosidase (EC 3.2.1.22) ($p= 0,047$), β -galactosidase (EC 3.2.1.23) ($p= 0,046$), endo 1,4 β -xilanasase (EC 3.2.1.8) ($p= 3,14e-4$) e a α -N-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ($p= 0,027$) (Tabela 17 e Figura 43).

A comunidade microbiana do rúmen de *O. aries* foi capaz de fermentar o bagaço de cana-de-açúcar, o qual foi observado pela alta proporção de sequência anotadas para enzimas que participam de estágios iniciais da despolimerização da hemicelulose e celulose em animais que receberam a dieta bagaço. Mhuantong et al. (2015) descreveram um imenso repertório de enzimas lignocelulolíticas de comunidades microbianas de bagaço de cana-de-açúcar e com 72 hits de famílias glicosil hidrolases (GH), 18 módulos de ligação ao carboidrato (CBM) e sete famílias de enzimas de atividades auxiliares (AA).

Tabela 17 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de *Ovis aries* (continua)

Código	Enzima	Anotadas no MG-RAST (SEED)							Total Bagaço
		I5F	II5F	III5F	Total Controle	IV5F	V5F	VI5F	
EC 3.2.1.4	Celulase	48	17	21	86	27	56	37	120
EC 3.2.1.6	β -1,3(4)-glucanase			1	1	1	2	3	6
EC 3.2.1.8	Endo-1,4- β -xilanasase	670	237	449	1.356	680	988	810	2.478
EC 3.2.1.14	Chitinase	29	11	10	50	33	44	30	107
EC 3.2.1.21	β -glucosidase	788	240	380	1.408	544	777	728	2.049
EC 3.2.1.25	β -mannosidase	158	45	76	279	96	172	137	405
EC 3.2.1.35	Hialuronoglicosaminidase	1			1		2		2
EC:3.2.1.39	Glucan endo-1,3- β -D-glucosidase		1		1	4	2	4	10
EC:3.2.1.45	Glucosilceramidase			1	1	2	2	2	6
EC 3.2.1.73	Lichenase	8	3	5	16	4	14	17	35
EC:3.2.1.74	Glucan 1,4- β -glucosidase	16	16	20	52	30	35	27	92
EC:3.2.1.75	Glucan endo-1,6- β -glucosidase					1	1		2
EC 3.2.1.78	Mannan endo-1,4- β -mannosidase	33	25	31	89	52	107	75	234
EC 3.2.1.81	β -agarase							1	1
EC 3.2.1.91	Celulose 1,4- β -celobiosidase	1		2	3		4		4
EC 3.2.1.15	Poligalacturonase	121	54	15	190	83	129	106	318
EC 3.2.1.23	β -galactosidase	2.330	729	1.392	4.451	2.026	2.626	2.299	6.951
EC 3.2.1.40	α -L-rhamnosidase	360	146	208	714	361	359	309	1029
EC 3.2.1.51	α -L-fucosidase	608	237	375	1.220	531	705	664	1.900

EC 3.2.1.31	β -glucuronidase	91	40	100	231	120	180	123	423
EC 3.2.1.67	Galacturan 1,4- α -galacturonidase	2			2	2		1	3
EC 3.2.1.82	Exo-poli- α -D-galacturonosidase	5	2	4	11	8		3	11

Tabela 18 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de *Ovis aries* (conclusão)

EC 3.2.1.89	Arabinogalactana endo-1,4- β -galactosidase	48	15	20	83	39	37	38	114
EC 3.2.1.37	β -xilosidase	316	98	170	584	290	407	335	1.032
EC 3.2.1.55	α -L-arabinofuranosidase	22	5	10	37	9	16	55	80
EC 3.2.1.-	Celobiose fosforilase	964	363	578	1.905	845	1271	940	3.056
EC 3.2.1.139	α -glucuronidase	53	23	37	113	31	65	60	156
EC 3.2.1.85	6-fosfo- β -galactosidase	2	1	1	4	1	3	1	5
EC 3.2.1.86	6-fosfo- β -glucosidase	83	19	34	136	46	76	38	160
EC:3.2.1.52	β -acetilhexosaminidase	13	5	5	23	5	6	4	15
EC 3.2.1.20	α -glucosidase	301	87	160	548	210	319	291	820
EC 3.2.1.22	α -galactosidase	531	160	313	1.004	424	598	504	1.526
EC 3.2.1.24	α -mannosidase	26	9	18	53	18	29	13	60
EC 3.2.1.114	α -mannosidase II	1	3		4	1			1
EC 3.2.1.28	Trehalase	12	7	17	36	10	19	8	37
EC 3.2.1.37	β -xilosidase	178	61	98	337	163	224		387
EC 2.4.1.18	1,4- α -glucan branching	108	33	53	194	105	120	113	338
EC 2.4.1.25	4- α -glucanotransferase	429	159	224	812	304	421	316	1.041
EC 3.2.1.106	Mannosyl-oligosacarideo glucosidase	1	1		2		1		1
EC 2.4.1.230	Kojibiose fosforilase	8	3	2	13	5	5	5	15
EC 2.4.1.216	Trehalose 6-fosfato fosforilase	2			2		2		2
EC 3.2.1.70	Glucan 1,6- α -glucosidase	11	70	8	89	9	14	12	35
EC 2.4.1.4	Amilosucrose	1	1	1	3		1		1
EC 5.4.99.16	Trehalose sintase	14	7	7	28	10	10	16	36
EC 3.2.1.141	Malto-oligosiltrehalose trehalohidrolase			1	1				0
EC 3.2.1.152	Mannosilglycoprotein endo- β -mannosidase				0		5		5
Amilases									
EC 2.4.1.8	Maltose fosforilase	1			1		1		1
EC 2.4.1.64	Trehalose fosforilase				0		1		1
EC 2.4.1.20	Celobiose fosforilase	740	296	469	1.505	679	979	745	2.403
EC 3.2.1.122	Maltose-6-fosfato	3		4	7	2	6	2	10
EC 3.2.1.41	Pullulanase	175	40	58	273	98	122	127	347
EC 3.2.1.93	Trehalose-6-fosfato	54	19	21	94	26	57	20	103
EC 3.2.1.135	Neopullulanase	168	53	108	329	139	169	155	463
EC 2.4.1.49	Celodextrin-fosforilase	21	2	10	33	12	21	24	57
3.2.1.113	α -1,2 mannosidase	695	226	373	1.294	643	762	717	2.122
	Dockerin	6	2		8	2	14	4	20
	Glicogen debranching	163	70	85	318	130	181	160	471
	Celulose (CBM), família II	9	4	12	25	5	12	11	28

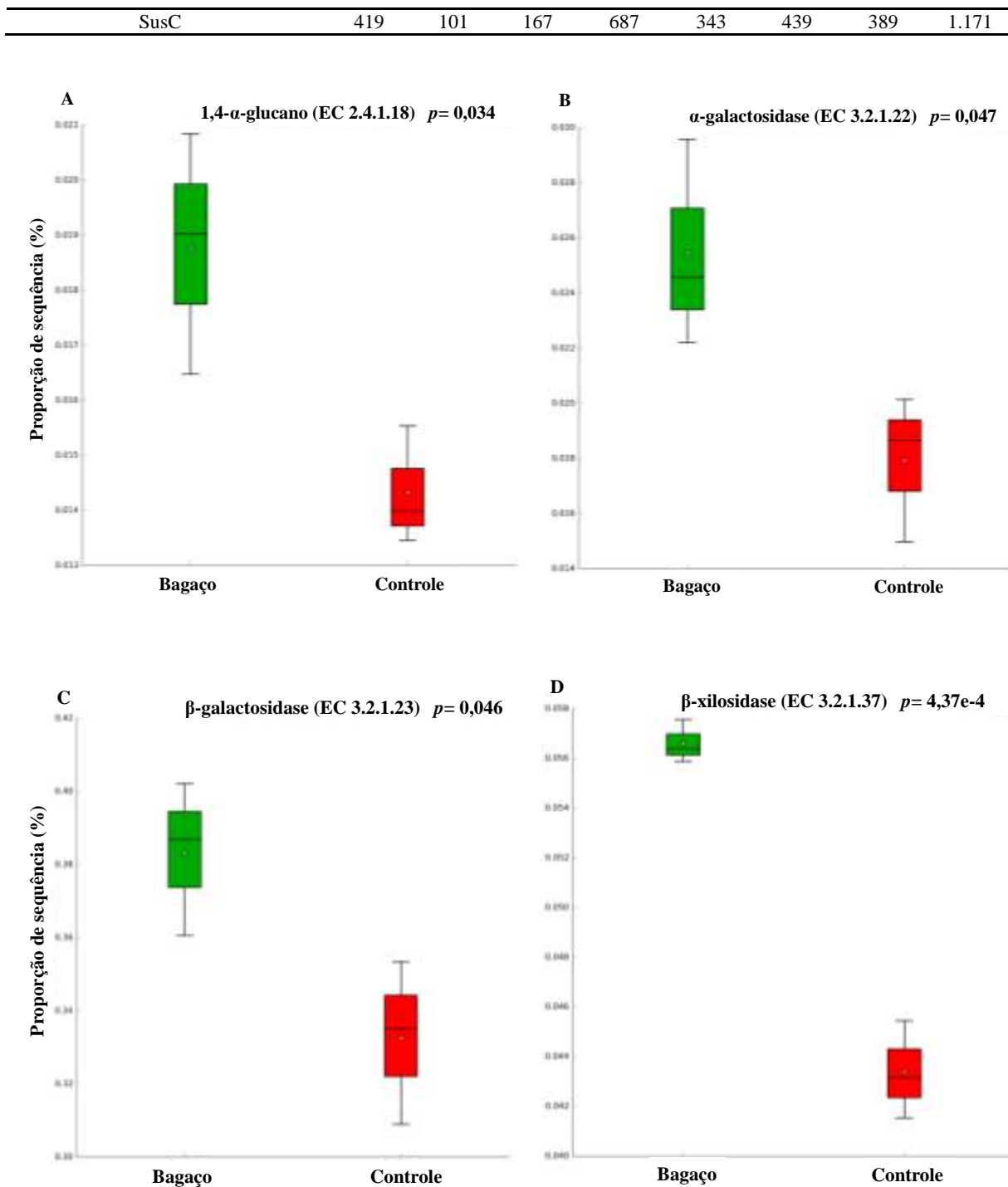


Figura 43 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de *Ovis aries*. Anotadas a nível de função pelo banco de dados SEED, enzimas selecionadas nos estágios iniciais da despolimerização da parede celular vegetal. A= 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18); B= α -galactosidase (EC3.2.1.22); C= β -galactosidase (EC 3.2.1.23); D= β -xilosidase (EC 3.2.1.37); E= Endo 1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8); F= xilose isomerase (EC 5.3.1.5); G= Celobiose fosforilase (EC 2.4.1.-); H= α -N-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) (continua)

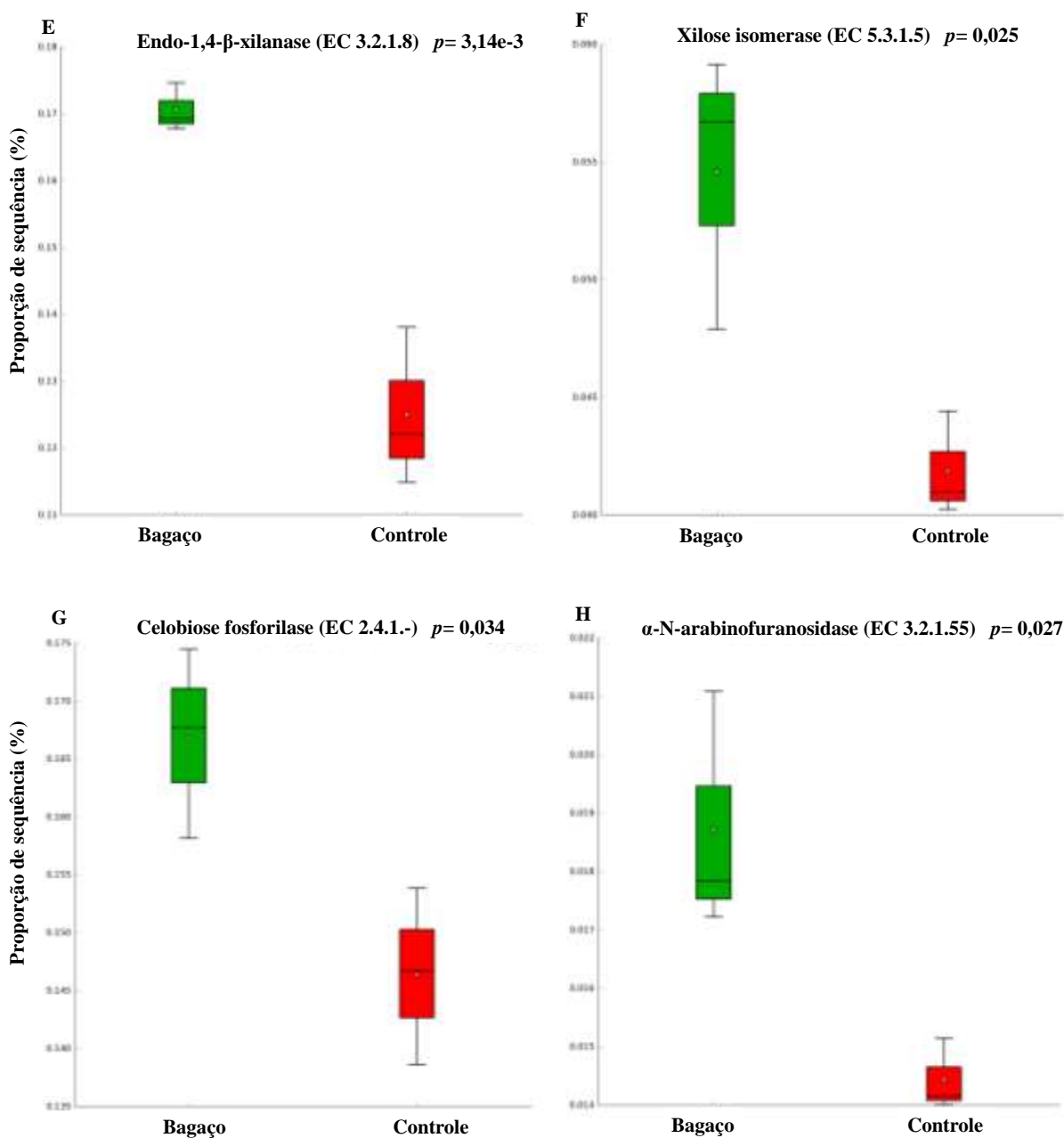


Figura 44 - Enzimas ativas em carboidratos identificadas no rúmen de *Ovis aries*. Anotadas a nível de função pelo banco de dados SEED, enzimas selecionadas nos estágios iniciais da despolimerização da parede celular vegetal. A= 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18); B= α -galactosidase (EC3.2.1.22); C= β -galactosidase (EC 3.2.1.23); D= β -xilosidase (EC 3.2.1.37); E= Endo 1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8); F= xilose isomerase (EC 5.3.1.5); G= Celobiose fosforilase (EC 2.4.1.-); H= α -N-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) (conclusão)

As enzimas responsáveis pela degradação da celulose são pertencentes às famílias 5 e 9 das glicosil hidrolases (GH), incluindo as endoglucanases, exoglucanases e beta-glucanase (VOCADLO; DAVIES, 2008). A exo-celobiohidrolases estão envolvidas no ataque inicial da celulose em frações cristalinas e regiões amorfas. As celo-oligosacarídeos e celobiose são processadas pelas beta-glicosidases pertencentes as famílias GH1, 2 e 3 (GAO et al., 2013).

A hemicelulose é composta de uma maior variedade de carboidratos, sendo que para sua despolimerização é requerida uma ampla gama de enzimas, incluindo as endo-1,4- β -xilanase (GH10) para a hidrólise da xilana. No bagaço de cana-de-açúcar a xilana é o mais abundante componente da hemicelulose, seguido por mananas e galactanas que sofrem o ataque das endo-1,4- β -mannosidase (GH26) e endo-1,4- β -galactosidase (GH16), respectivamente (MHUANTONG et al., 2015). O bagaço de cana-de-açúcar é um dos resíduos agrícolas mais abundantes do mundo, os quais são oriundos da produção de açúcar e etanol, com uma produção global de 250 milhões de toneladas por ano (KANOKRATANA et al., 2013). Este resíduo agrícola é basicamente constituído de celulose, hemicelulose e lignina. A despolimerização da lignocelulose requer múltiplas enzimas que são produzidas por micro-organismo, que agem em conjunto e atacam a complexa estrutura vegetal (LYND et al., 2002; VAN DYK; PLETSCHKE, 2013).

No rúmen de *O. aries* foram encontradas as principais enzimas responsáveis pela despolimerização da celulose e hemicelulose, e estas enzimas foram mais abundantes na fibra ruminal de animais alimentados com a dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. As enzimas endo 1,4- β -xilanase, β -glucosidase, β -mannosidase, Manna endo 1,4- β -celobiosidase, β -galactosidase, α -L-fucosidase e α -galactosidase são as enzimas encontradas com maior abundância no bagaço (KANOKRATANA et al., 2013). Mhuantong et al. (2015) sequenciaram bibliotecas de fosmídeos de bagaço de cana-de-açúcar e observaram um grande número de famílias GH15 (glico-amilases), GH17 (glico endo-1,3- β -glicosidase) GH65 (maltose fosforilase, realose fosforilase), além das GH115 (xilan alfa-1,2-glucuronidase).

Neste estudo, foram encontradas as proteínas SusC, sendo que ~40% delas foram mais abundantes na dieta bagaço. As SusC são proteínas de membrana responsáveis por importar oligossacarídeos para o periplasma celular do micro-organismo durante o processo de fermentação (SCHAUER; RODIONOV; DE REUSE, 2008). Dai et al. (2012) encontraram estas proteínas no rúmen de Iaque e 50% delas foram derivadas de contigs classificados no filo Bacteroidetes. Além disso, no intestino de humanos, as linhagens de *Bacteroides* utilizam este sistema protéico para a captura do amido (MARTENS et al., 2009). Contudo, outros micro-organismos pertencentes ao filo Bacteroidetes tem sido encontrado, por possuírem este sistema protéico (Sus), como, por exemplo, em *Cytophaga hutchinsonii* (XIE et al., 2007) e *Flavobacterium johnsoniae* (McBRIDE et al., 2009). Este sistema protéico de transporte de moléculas lignocelulolíticas tem sido proposto por (McBRIDE et al., 2009; DODD; MACKIE; CANN, 2011). Dodd, Mackie e Cann (2011) sugeriram que vários membros de

Bacteroidetes xilanolíticos possuem genes *Sus* e que eles possivelmente estejam envolvidos na utilização de xilana no intestino humano.

Os avanços em tecnologias moleculares vem oferecendo a oportunidade de compreender os aspectos fundamentais da evolução e formação da comunidade microbiana, permitindo a exploração dos micro-organismos não cultivados para processos biotecnológicos (SOGIN et al., 2006). Por exemplo, uma abordagem utilizada atualmente é o sequenciamento dos genomas de comunidades microbianas (metagenômica) que permite uma visão sem precedentes para o potencial metabólico dos micro-organismos (QIN et al., 2010). Esta técnica oferece informações sobre a comunidade microbiana ambiental sem a necessidade de cultivo (COWAN et al., 2005). Isto fornece subsídios biotecnológicos e permite a exploração do vasto potencial metabólico dos micro-organismos não cultivados, a fim de descobrir novos genes responsáveis pela codificação de proteínas com sequências específicas (CHISTOSERDOVA, 2010).

A abordagem metagenômica foi utilizada com sucesso na descoberta de genes degradadores de biomassa na comunidade microbiana associada ao rúmen de bovinos, o que trouxe novas perspectivas para a descoberta de novos genes e enzimas para serem utilizados na degradação da biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis (HESS et al., 2011). Neste estudo, o DNA metagenômico de micro-organismos aderidos ao substrato fibroso incubado por 72 horas no rúmen foi analisado e permitiu a identificação de 27755 genes putativos carboidrato-ativos e 90 proteínas candidatas, das quais 57% foram ativas em substratos celulósicos. Este estudo expandiu substancialmente o catálogo de genes e genomas que participam na destruição celulósica da biomassa. Em outros estudos, Wang et al. (2011), durante análises proteômicas e transcriptômicas do rúmen, descobriram que o fungo *Neocallimastix patriciarum* W5 produziu um grande número de celulasas diferentes, incluindo 48 famílias, das quais nove não são encontrados em quaisquer outros fungos.

O sucesso de proteínas engenheiradas para o aumento da degradação de lignocelulose existentes tem sido limitado (WEN; NAIR; ZHAO, 2009). Porém, a recuperação de enzimas a partir de comunidades microbianas evoluídas naturalmente em ambiente de degradação de biomassa oferece uma estratégia promissora para a identificação de novas enzimas lignocelulósicas com potencial de melhor atividade (RUBIN, 2008). O avanço no sequenciamento de genomas microbianos tem alterado substancialmente nosso conhecimento das capacidades metabólicas dos micro-organismos. Análises de bioinformática de genomas microbianos têm revelado um grande número dos chamados genes clusters órfãos, ou seja,

loci biosintéticos para os quais as correspondentes vias metabólicas e compostos ainda são desconhecidos (GROSS, 2007). Análises de genomas de várias bactérias conhecidas têm indicado que um número de vias metabólicas de genes órfãos é muito maior que o número de compostos conhecidos atualmente para estas bactérias (GROSS, 2007; ZERIKLY; CHALLIS, 2009). O uso da metagenômica tem provado ser uma poderosa ferramenta para a descoberta de novas biomoléculas (SIMON; DANIEL, 2009) e, neste contexto, a utilização desta abordagem tende a aumentar a capacidade da exploração da biodiversidade microbiana na busca de moléculas inéditas para aplicação biotecnológica e uso industrial.

4.5 Potencial metabólico e funcional do rúmen de *Ovis aries* revelado pela abordagem metatranscriptoma

Os seis animais de ambos os tratamentos da amostragem de 60 dias foram selecionados para o sequenciamento metatranscriptômico, devido a clara separação da estrutura da comunidade bacteriana entre as duas dietas testadas, como apresentado pelas regiões V3 e V6-7 do gene 16S rRNA (Figuras 21 e 26). Essa diferença entre a estruturação da comunidade bacteriana foi claramente vista na fibra ruminal e, por isso, seis bibliotecas de metatranscriptoma foram construídas e anotadas usando o banco de dados SEED no servidor MG-RAST (Tabela 20).

No intuito de observar quais funções foram mais abundantes em ambos os grupos de animais, foi realizado um ‘heatmap’ com as categorias funcionais ao nível 1 do subsistema. O metabolismo de carboidratos representou mais de 90% das sequências anotadas, seguida por pelo metabolismo do RNA, proteínas, derivados e aminoácidos e finalmente subsistemas baseados em agrupamento, como observado nos seis metagenomas analisados no tópico anterior, não foi observado o agrupamento das amostras por dieta (Figura 44).

Tabela 19 - Valores dos dados do sequenciamento metatranscriptoma das amostras de fibra ruminal do aos 60 dias anotados pelo MG-RAST

Dado MG-RAST	Dieta controle			Dieta bagaço		
	I5F	II5F	III5F	IV5F	V5F	VI5F
Pré-Controle de qualidade						
Número bp	39.168.391	39.089.041	41.096.584	35.681.383	40.706.329	46.949.804
Número de sequências	230.392	235.137	254.362	208.958	228.389	243.92
*Comp. médio (pb)	170 ± 52	166 ± 48	161 ± 45	170 ± 45	178 ± 5	192 ± 54
**Cont. médio CG (%)	52 ± 5	52 ± 5	52 ± 5	52 ± 5	52 ± 5	52 ± 4
Pós-Controle de qualidade						
Número bp	23.109.241	22.481.726	24.908.939	21.779.696	25.690.456	29.218.239
Número de sequências	138.661	138.032	157.417	129.656	146.534	152.382
*Comp. médio (pb)	166 ± 43	162 ± 39	158 ± 37	167 ± 38	175 ± 43	191 ± 49
**Cont. médio CG (%)	52 ± 5	52 ± 5	52 ± 5	52 ± 5	52 ± 4	52 ± 4
Predição de proteínas	24.154	25.098	30.709	23.113	29.551	27.016
Proteínas identificadas	2.990	3.126	3.938	2.814	3.702	3.063
Categorias funcionais	947	1.032	1.457	855	1.164	733

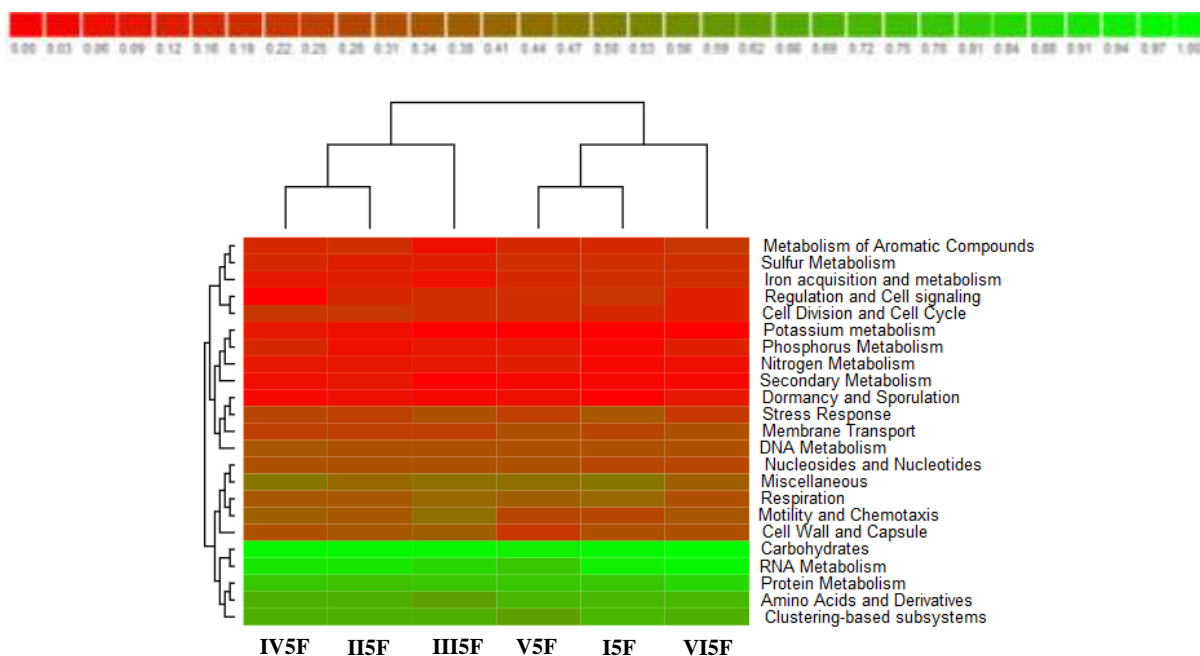


Figura 45 - Análise de agrupamento da classificação funcional usando o heatmap gerado no MG-RAST segundo o banco de dados SEED Subsystems, baseado na abundância de proteínas a nível 1. As amostras I3F, II3F e III3F são os animais que receberam a dieta controle; IV3F, V3F e VI3F são os animais que receberam a dieta bagaço

Para o RNA mensageiro (RNAm), foi realizada a busca por enzimas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, principalmente enzimas envolvidas nos estágios iniciais de despolimerização da celulose e hemicelulose (Tabela 21). A enzima α -galactosidase (EC 3.2.1.22) foi encontrada em praticamente todas as amostras estudadas, exceto na amostra II5F (Tabela 21). Além disso, nove sequências foram anotadas para a enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) nos animais IV5F e V5F (Tabela 21).

Esta abordagem metatranscriptômica permite uma análise mais aprofundada das contribuições e ações coordenadas de genes de interesse, principalmente os envolvidos nos estágios iniciais da despolimerização da hemicelulose e celulose (DAI et al., 2015). Genes que codificam as famílias 5, 9 e 10 glicosil hidrolases (GH) são os mais estudados, pelo fato de incluírem as celulasas e hemicelulasas (BRULC et al., 2009; HESS et al., 2011; DAI et al., 2012; POPE et al., 2012) e serem ativamente transcritos no rúmen. Dai et al. (2015) identificaram números expressivos de transcrições para GH48 (POPE et al., 2012).

Tabela 20 - A lista de enzimas preditas para carboidratos ativos identificados no rúmen de *Ovis aries*

Anotadas no MG-RAST (SEED)							
Código	Enzima	I5F	II5F	III5F	IV5F	V5F	VI5F
EC 3.2.1.4	Endo-1,4- β -glucanase	2	2		1		
EC 3.2.1.8	Endo-1,4- β -xilânase				1	2	
EC 3.2.1.10	Oligo-1,6-glucosidase		1	1			
EC 3.2.1.14	Chitinase	1					
EC 3.2.1.15	Poligalacturonase	1					
EC 3.2.1.20	α -glucosidase			1			2
EC 3.2.1.21	β -glucosidase	1	2	1	1	2	
EC 3.2.1.22	α -galactosidase	1		2	1	1	1
EC 3.2.1.23	β -galactosidase	1			5	4	
EC 3.2.1.41	Pullulanase	1		1	1		
EC 3.2.1.37	β -xilosidase	1					
EC 3.2.1.51	α -L-fucosidase	1	3				
EC 3.2.1.55	α -N-arabinofuranosidase	1	4			1	
EC 3.2.1.73	β -glucanase precursor	1					
EC 3.2.1.78	Mannan endo-1,4- β -mannosidase						1
EC 3.2.1.86	6-fosfo- β -glucosidase	1	1			1	
EC 3.2.1.93	Trehalose-6-fosfato-hidrolase			2			
EC 3.2.1.135	Neopullulanase			1			
EC 2.4.1.25	4- α -glucanotransferase	2		2			
EC 2.7.1.76	Deoxiadenosine kinase	1					
EC 2.7.1.2	Glucokinase			1			
EC 2.4.1.49	Celodextrina-fosforilase	1					
	SusC					1	1

4.6 Efeito da manipulação da dieta no microbioma do rúmen de carneiros

Este estudo demonstrou a possibilidade de manipular a dieta de carneiros, por meio da simples substituição parcial da fração volumosa da dieta. Buscando-se enriquecer grupos microbianos degradadores de biomassa e o aumento da ocorrência de enzimas degradadoras de biomassa no rúmen de *O. aries* foi observado no tratamento com bagaço de cana-de-açúcar. O microbioma ruminal responde rapidamente a mudanças na dieta, idade, uso de antibióticos, localização geográfica, estações do ano, regime de dieta e na saúde do animal hospedeiro (KOCHERGINSKAYA; AMINOV; WHITE, 2001). Henderson et al. (2015) mostraram que o microbioma ruminal é dominado por um *core* de micro-organismos mal caracterizados, especialmente as bactérias (HENDERSON et al., 2015). Vários estudos apontam a inferência genética do hospedeiro no microbioma ruminal (LI; ZHU, 2009). O microbioma ruminal é caracterizado por fortes interações metabólicas entre os micro-organismos que facilitam a fermentação do material vegetal a produtos úteis para o hospedeiro (RUSSEL; RYCHLIK, 2001).

A manipulação nutricional pode afetar substancialmente a saúde e produção de leite em bovinos (WHITAKER et al., 1993). O tipo de dieta e sua composição é um fator chave, podendo mudar a fermentação ruminal e direcionar vias metabólicas visando grupos de micro-organismos específicos (HART et al., 2008). No presente estudo, buscamos grupos de micro-organismos associadas a fibra ruminal e, principalmente, micro-organismos aderidos ao bagaço de cana-de-açúcar buscando indentificar enzimas envolvidas na despolimerização da parede celular vegetal do bagaço de cana-de-açúcar. Os filos Bacteroidetes e Firmicutes representaram ~80% da comunidade bacteriana total no rúmen de *O. aries*. Estes dois filos possuem espécies especialistas na fermentação de parede celular vegetal, com uma complexa matrix composta por celulose, hemicelulose e lignina (VAN SOEST, 1994). No caso da lignina, essencialmente indigesta em condições anaeróbicas, os micro-organismos ruminais não possuem enzimas capazes de degradá-la (MCALLISTER et al., 1994). Sua principal função é servir de barreira física a planta, limitando o ataque microbiano. Contudo, a fermentação pode ocorrer através de pre-tratamentos os quais atuam na remoção da lignina ou interrompem a ligação química com a hemicelulose (VAN SOEST, 1994). Nos ruminantes, a mastigação e ruminação auxiliam na quebra física da lignina e, com isso, aumentam a

digestibilidade da fibra vegetal através do aumento de superfície de contato para o ataque microbiano (VAN SOEST, 1994).

Neste estudo, foram analisadas as três fases do conteúdo ruminal, em que foram focados os micro-organismos no líquido e os aderidos na fibra ruminal. Tanto no líquido quanto na fibra ruminal, os filos Bacteroidetes e Firmicutes foram os mais abundantes, independentemente da natureza amostral, dieta, tempo e animal. Em Bacteroidetes, o gênero *Prevotella* representou 20% da comunidade bacteriana total no rúmen de *O. aries*. *Prevotella* é descrito como o gênero mais abundante no rúmen (STEVENSON; WEIMER, 2007) e é caracterizado como hemicelulolítico (PURUSHE; FOUTS; MORRISON, 2010). A alta abundância de *Prevotella* se faz essencial pelo fato de a parede celular vegetal ser composta de uma matriz contendo fibras de hemicelulose que protegem os feixes de celulose, dificultando o ataque de micro-organismos celulolíticos (STEVENSON; WEIMER, 2007).

Em Firmicutes, o gênero *Ruminococcus* representou 3% e foi o maior representante nas amostras analisadas no rúmen de *O. aries*, principalmente na fibra ruminal. *Ruminococcus* são micro-organismos fibrolíticos (CHRISTOPHERSON et al., 2014). A capacidade fibrolítica de muitos rumonococci torna-os jogadores chaves na dinâmica da comunidade microbiana no rúmen e na saúde do trato gastro intestinal humano (BLAUT, 2011; CHRISTOPHERSON et al., 2014).

Os gêneros *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Fibrobacter* e *Succiniclaticium* foram encontrados em 100% das amostras no rúmen de *O. aries*. Este grupo de bactérias são micro-organismos caracterizados como o ‘core’ microbiano. Como no trato gastrointestinal humano (GIH), o microbioma ruminal possui um “core” microbiano (JAMI; MIZRAHI, 2012). Estes micro-organismos são categorizados como espécies chaves, espécies com ampla influencia no ecossistema ruminal e cujo desaparecimento colocaria em perigo o funcionamento do ecossistema ruminal como um todo (WEIMER et al., 2015).

A estruturação da comunidade bacteriana foi mais clara aos 60 dias entre as dietas controle e bagaço na fibra ruminal. A estrutura da comunidade bacteriana presente no rúmen de um bezerro é composta pelos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes e a colonização ocorre quase que imediatamente após o nascimento (JAMI et al., 2013). Estudos recentes (YÁÑEZ- RUIZ et al., 2015) sugeriram a manipulação da dieta de bezerros até a fase adulta, no intuito de levar a adaptação e programar a estrutura da comunidade microbiana para a promoção de diferentes populações no microbioma ruminal.

Em relação a comunidade fúngica no rúmen de *O. aries*, o filo Neocallimastigomycota foi o maior representante encontrado na fibra ruminal ao longo dos 60 dias. Este filo possui seis gêneros bem descritos na literatura (GRUNINGER et al., 2014), e são eles, *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces* (GRIFFITH et al., 2009). *Caecomyces* mostrou ser significativamente mais abundante em animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar.

Caecomyces foi o gênero que apontou diferenças entre as dietas e além de ser significativamente mais abundante em animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar. Kumar et al. (2015) utilizaram dois tipos de dietas, uma delas composta de 80% de forragem e 20% de concentrado (D1) e a segunda composta de 50% de forragem e 50% de concentrado (D2), observaram que a abundância de *Caecomyces* foi maior na dieta chamada de D1, rica em fibra. Enquanto, que na dieta D2 o gênero *Caecomyces* foi completamente substituído por *Orpinomyces* e outros gêneros (KUMAR et al., 2015). No presente estudo, o gênero *Caecomyces* foi maior em animais que receberam a dieta com bagaço, este aumento em sua abundância relativa pode estar relacionado pela alta disponibilidade de celulose no rúmen. Este gênero é caracterizado por seus rizoides bulbosos e facilmente penetráveis no interior da matrix celulolítica e hidrolisar os tecidos vegetais (JOBLIN et al., 2010).

Foi observado que os gêneros *Orpinomyces*, *Piromyces* se correlacionaram com a produção de acetato, os gêneros *Piromyces*, *Malassezia*, apresentaram correlação positiva com o pH. Apenas o gênero *Candida* correlacionou-se com a produção de CH₄. E por fim, os gêneros *Piromyces* e *Anaeromyces* mostraram interação com a produção de isobutirato. Neste estudo, o fator dieta foi um dos fatores que influenciaram diretamente a estrutura e função da comunidade microbiana ruminal (SADET et al., 2007). A natureza da alimentação e as alterações físico-químicas induzidas pelo processo fermentativo são conhecidas por favorecer o desenvolvimento de certas populações microbianas, tanto na fase líquida quanto na fase fibrosa do conteúdo ruminal (KIM; MORRISON; YU, 2011).

Visando o entendimento do processo de despolimerização inicial da parede celular vegetal, foi feita a anotação de sequências de seis bibliotecas de amostras da fibra ruminal aos 30 dias. Foi observado que as enzimas endo-1,4- β -xilânase (EC 3.2.1.8), β -galactosidase, 1,4- α -glucano (EC 2.4.1.18), β -xilosidase (EC 3.2.1.37), xilosidase isomerase (EC 5.3.1.5), celobiose fosforilase (EC2.4.1.-) e a α -N-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) foram significativamente mais abundantes em animais que receberam a dieta com bagaço de cana-de-açúcar. Este conjunto enzimático participa do ataque inicial e ordenado em cadeias de

celuloses (BRULC et al., 2009). Hess et al. (2011) validaram um subconjunto de famílias de enzimas ativos em carboidratos e um repertório de 27.755 genes envolvidos na desconstrução de biomassa vegetal.

Este trabalho foi o primeiro estudo que analisou a estruturação e a funcionalidade da comunidade bacteriana ruminal de *Ovis aries* alimentado com uma dieta suplementada com bagaço de cana-de-açúcar e os principais resultados obtidos neste estudo foram apresentados na Tabela 22.

Tabela 21 - Alterações no desempenho animal e microbioma do rúmen causadas pela introdução de bagaço de cana-de-açúcar em carneiros

Parâmetro	Alteração	Resultado
pH	Aumento em animais que receberam a dieta bagaço aos 45 dias	Figura 5 e 6
Contagem de protozoários	Aumento em animais que receberam a dieta bagaço aos 30 dias	Figura 12
Produção de ácidos graxos voláteis	Aumento de acetato no líquido ruminal em animais que receberam a dieta bagaço aos 60 dias	Figuras 11A
Ocorrência de Bacteroidetes	A abundância relativa (%) foi significativamente menor na fibra ruminal e na dieta com bagaço aos 15 dias	Figura 28
Ocorrência de <i>Prevotella</i>	Representou aproximadamente 20% da comunidade bacteriana	Tabela 6 e 9
Ocorrência de Firmicutes	A abundância relativa (%) foi significativamente maior na fibra ruminal e na dieta com bagaço aos 15 dias	Figura 28
Estrutura da comunidade bacteriana	Na fibra ruminal, foi distinta entre as dietas aos 60 dias	Figura 30
Ocorrência de <i>Caecomyces</i>	Aumento na abundância relativa em animais que receberam a dieta bagaço aos 15, 30, 45 e 60 dias	Figura 33B
Frequência de Genes degradadores de biomassa (DNA total)	Aumento da frequência de endo-1,4- β -xilanase, β -galactosidase, 1,4- α -glucan, β -xilosidase, xilosidase isomerase, celobiose fosforilase e a α -N-arabinofuranosidase aos 30 dias	Figura 43
Frequência de Genes degradadores de biomassa (RNA)	Aumento da frequência da enzima β -galactosidase aos 60 dias	Tabela 19

5 CONCLUSÕES GERAIS

A substituição parcial da dieta por uma fração de bagaço de cana-de-açúcar foi capaz de impactar a estruturação da comunidade bacteriana e fúngica no rúmen de *Ovis aries* selecionando grupos especializados na degradação de biomassa vegetal, em especial, o gênero *Caecomyces*, que foi significativamente mais abundante na fibra ruminal de animais que se alimentaram de bagaço de cana-de-açúcar. Nos mesmos animais foi observado que a porcentagem de acetato foi significativamente maior aos 60 dias. As frações líquida e fibrosa do conteúdo ruminal de *O. aries* revelaram uma comunidade bacteriana dominada principalmente por Bacteroidetes e Firmicutes independentemente do tipo de dieta, tempo e animal, mostrando que ambos os filos produzem uma imensa variedade de enzimas hidrolíticas envolvidas na despolimerização de polissacarídeos complexos. Dois gêneros, *Prevotella* e *Ruminococcus* representaram 20% e 4% da comunidade bacteriana ruminal, respectivamente. Para a comunidade fúngica o filo Neocallimastigomycota representou 91% das sequências e os principais gêneros deste filo foram *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces* aderidos a fibra ruminal. Foi observado também um aumento significativo na frequência de enzimas como, por exemplo, 1,4- α -glucano, α -galactosidase, endo 1,4- β -xilânase, β -xilósidase, xilose isomerase, celobiose fosforilase e α -N-arabinofuranosidase no tratamento com bagaço de cana-de-açúcar.

Este estudo demonstrou a possibilidade de manipular a dieta de carneiros, por meio da simples substituição parcial da fração volumosa da dieta, com o objetivo de enriquecer grupos microbianos degradadores de biomassa, bem como aumentar a ocorrência de enzimas degradadoras de biomassa no rúmen. Considerando que a recuperação de enzimas a partir de comunidades microbianas naturalmente selecionadas para a degradação de biomassa é uma estratégia promissora para superar a atual ineficiência da ação enzimática na produção industrial de biocombustíveis, os resultados deste trabalho representam a possibilidade de aumentar a capacidade de recuperação ou descoberta de enzimas a partir de ruminantes, ou ainda, a possibilidade de manipular a estrutura do microbioma do rúmen para usá-lo com fonte de inóculo enriquecido em processos industriais de degradação de biomassa.

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K.; NILSSON, RH.; LARSSON, KH.; ALEXANDER, IJ.; EBERHARDT, U.; ERLAND, S.; HØILAND, K.; KJØLLER, R.; LARSSON, E.; PENNANEN, T.; SEM, R.; TAYLOR, AFS.; TEDERSOO, L.; URSING, BM.; VRÅLSTAD, T.; LIIMATAINEN, K.; PEINTNER, U.; KÕLJALG, U. The UNITE database for molecular identification of fungi recent updates and future perspectives. **New Phytologist**, Hoboken, v. 186, p. 1447-1452, 2010.
- ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S.M.A.; BUENO, I.C.S.; TSAI, S.M.; FIGUEIRA, A.V.O. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburg, v. 44, p. 953-964, 2012.
- AKIN, D.E.; BORNEMAN, W.S.; WINDHAM, W.R. Rumen fungi: morphological types from Georgia cattle and the attack on forage cell walls. **Biosystems**, Kidlington, v. 21, p. 385-391, 1988.
- AN, D.; CAI, S.; DONG, X. *Actinomyces ruminicola* sp. nov., isolated from cattle rumen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 56, p. 2043-2048, 2006.
- ANDERSON, K.L. Biochemical analysis of starch degradation by *Ruminobacter amylophilus* 70. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1488-1491, 1995.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.K.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.
- ASPINALL, G.O. Polysaccharides. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 57, p. 461-477, 1970.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1997. v. 2, 850 p.
- BALDWIN, R.L.; ALLISON, M.J. Rumen metabolism. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 57, p. 461-477, 1983.
- BANNINK, A.; FRANCE, J.; LOPEZ, S. GERRITS, W.J.J.; KEBREAB, E.; TAMMINGA, S.; DIJKSTRA, J. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 143, p. 3-26, 2008.
- BANNINK, A.; GERRITS, W.J.J.; FRANCE, J.; DIJKSTRA, J. Variation in rumen fermentation and the rumen wall during the transition period in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 172, p. 80-94, 2012.
- BARRAS, D.R.; MOORE, E.A.; STONE, B.A. Enzyme-substrate relations among β -glucan hydrolases. **Advances Chemistry Series**, Washington, v. 95, p. 105-138, 1969.

BAYER, E.A.; BELAICH, J.P.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 521-554, 2004.

BAZOOYAR, G.; MOMANY, F.A.; BOLTON, K. Validating empirical force fields for molecularlevel simulation of cellulose dissolution. **Computational and Theoretical Chemistry**, Amsterdam, v. 984, p. 119-127, 2012.

BHATTA, R.; ENISHI, O.; KURIHARA, M.; Measurement of methane production from ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 20, n. 8, p. 1305-1318, 2007.

BENSON, A.K.; KELLY, S.A.; LEGGE, R.; MA, F.; LOW, S.J.; KIM, J.; ZHANG, M.; OH, P.L.; NEHRENBURG, D.; HUA, K.; KACHMAN, S.D.; MORIYAMA, E.N.; WALTER, J.; PETERSON, D.A.; POMP, D. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 18933-18938, 2010.

BERG MILLER, M.E.; ANTONOPOULOS, D.A.; RINCON, M.T.; BAND, M.; BARI, A.; AKRAIKO, T. Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 4, p. e6650, 2009.

BERGMAN, E.N. Energy contribution of VFA from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, Norwich, v. 70, p. 567-590, 1990.

BLAUT, M. Ecology and physiology of the intestinal tract. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 358, p. 247-272, 2011.

BONHOMME, A. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 30, p. 203-266, 1990.

BRYANT, M.P.; SMALL, N.; BOUMA, C.; CHU, H. *Bacteroides ruminicola* n. sp. and *Succinimonas amylolytica*; the new genus and species; species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 76, p. 15-23, 1958.

BRUL, S.; STUMM, C.K. Symbionts and organelles in anaerobic protozoa and fungi. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 9, p. 319-324, 1994.

BRULC, J.M.; ANTONOPOULOS, D.A.; MILLER, M.E. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 1948-1953, 2009.

BRUMM, P.; MEAD, D.; BOYUM, J.; DRINKWATER, C.; GOWDA, K.; STEVENSON, D.; WEIMER, P.J. Functional annotation of *Fibrobacter succinogenes* S85 carbohydrate active enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 163, p. 649-657, 2011.

BRYANT, M.P.; BURKEY, L.A. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 36, p. 205-217, 1953.

BULLE, M.L.M.; RIBEIRO, F.G.; LEME, P.R. Performance of young bulls fed high concentrate diets with sugarcane bagasse as roughage source. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 444-450, 2002.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análise de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135 p.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.M.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.L.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 38, p. 1467-1475, 2011.

CANNAS, A.; TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; PELL, A.N.; VAN SOEST, P.J. A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. **Journal Animal Science**. Champaign, v. 82, n. 1, p. 149-69, 2004.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, p. 335-336, 2010.

CARBERRY, C.A.; KENNY, D.A.; HAN, S.; MCCABE, M.S.; WATERS, S.M. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 14, p. 4949-4958, 2012.

CASSIDA, K.A.; TURNER, K.E.; FOSTER, J.G.; HESTERMAN, O.B. Comparison of detergent fiber analysis methods for forages high in pectin. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 135, p. 283-295, 2007.

CHALUPA, W. Manipulating rumen fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 45, p. 585, 1977.

CHANEY A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 8, p. 130-132, 1962.

CHASSARD, C.; DELMAS, E.; LAWSON, P.A.; BERNALIER-DONADILLE, A. *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 58, p. 1008-1013, 2008.

CHASSARD, C.; GOUMY, V.; LECLERC, M.; DEL'HOMME, C.; BERNALIER-DONADILLE, A. Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 61, p. 121-131, 2007.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; CHEVAUX, E.; MARTIN, C.; FORANO, E. Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In: RIGOBELLO, E.C. (Ed.). **Probiotic in animals**. Rijeka: Croatia InTech, 2012. p. 119-162.

CHESSON, A. Mechanistic model of forage cell wall degradation. In: JUNG, H.G.; BUXTON, D.R.; HATFIELD, R.D.; RALPH, J. (Ed.). **Rorage cell wall structure and digestibility**. Madison:ASA; CSSA; SSSA, 1993. p. 347-376.

CHESSON, A.; FORSBERG, C.W. Polysaccharide degradation by rumen microorganism. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London:Blackie, 1997. p. 329-381.

CHISTOSERDOVA, L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, p. 1351–1359, 2010.

CHO, S.J.; CHO, K.M.; SHIN, E.C.; LIM, W.J.; HONG, S.Y.; CHOI, B.R.; KANG, J.M.; LEE, S.M.; KIM, Y.H.; KIM, H.; YUN, H.D. 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 16, p. 92-101, 2006.

CHRISTOPHERSON, M.R.; SUEN, G.; BRAMHACHARYA, S.; JEWELL, K.A.; AYLWARD, F.O.; MEAD, D.; BRUMM, P.J. The genome sequences of *Cellulomonas fimi* and *Cellvibrio gilvus* reveal the cellulolytic strategies of two facultative anaerobes, transfer of *Cellvibrio gilvus* to the genus *Cellulomonas*, and proposal of *Cellulomonas gilvus* sp. nov. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, p e53954, 2013.

CHRISTOPHERSON, M.R.; DAWSON, J.A.; STEVENSON, D.M.; CUNNINGHAM, A.C.; BRAMHACHARYA, S.; WEIMER, P.J.; KENDZIORSKI, C.; GARRET, S. Unique aspects of fiber degradation by the ruminal ethanologen *Ruminococcus albus* 7 revealed by physiological and transcriptomic analysis. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 1066, 2014.

CLARKE, K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Austral Ecology**, Malden, v. 18, n. 1, p. 117-143, 1993.

COEN, J.A.; DEHORITY, B.A. Degradation and utilisation of hemicelluloses from intact forage by pure culture of rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 20, p. 362-368, 1970.

COTTA, M.A.; WHITEHEAD, T.R. Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 189-196, 1993.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTEWER, P. Metagenomic gene discovery: past, present and future. **Trends in Biotechnology**, London, v. 23, n. 6, p. 321–329, 2005.

CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various soluble carbohydrates by rumen micro-organisms with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 23, p. 925-937, 1969.

DAI, X.; TIAN, Y.; LI, J.; SU, X.; WANG, X.; ZHAO, S.; LIU, L.; LUO, Y.; LIU, D.; ZHENG, H.; WANG, J.; DONG, Z.; HU, S.; HUANG, L. Metatranscriptomic analyses of plant cell wall polysaccharide degradation by microorganisms in the cow rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1375-1386, 2015.

DAI, X.; ZHU, Y.; LUO, Y.; SONG, L.; LIU, D.; LIU, L.; CHEN, F.; WANG, M.; LI, J.; ZENG, X.; DONG, Z.; HU, S.; LI, L.; XU, J.; HUANG, L.; DONG, X. Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e40430, 2012.

DASSA, B.; BOROVOK, I.; RUIMY-ISRAELI, V.; LAMED, R.; FLINT, H.J.; DUNCAN, S.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.; MORRISON, M.; MOSONI, P.; YEOMAN, C.L.; WHITE, B.A.; BAYER, E.A. Rumen cellulosomes: divergent fiber-degrading strategies revealed by comparative genome-wide analysis of six ruminococcal strains. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e99221, 2014.

DEHORITY, B.A. Characterization of several bovine rumen bacteria isolated with a xylan medium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 91, p. 1724, 1966.

_____. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Hoboken, v. 52, p. 339-342, 2005.

DEHORITY, B.A.; DAMRON, W.S.; McLAREN, J.B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattle (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1394-1397, 1983.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 33, p. 14691-14696, 2010.

De MENEZES, A.B.; LEWIS, E.; O'DONOVAN, M.; O'NEILL, B.; CLIPSON, N.; DOYLE, E.M. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed rations. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 78, p. 256-265, 2011.

DEMEYER, D.; FIEVEZ, V. Ruminants et environnement: la méthanogénèse. **Annales of Zootechnie**, Les Ulis, v. 49, p. 95-112, 2000.

DENMAN, S.E.; McSWEENEY, C.S. The early impact of genomics and metagenomics on ruminal microbiology. **Annual Review of Animal Biosciences**, Palo Alto, v. 3, p. 447-465, 2015.

DIAS, A.C.F.; DINI-ANDREOTE, F.; TAKETANI, R.G.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; ANDREOTE, F.D. Archaeal communities in three contrasting mangrove sediments. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 11, p. 1466-1476, 2011.

DIJKSTRA, J. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. **British Journal of Nutrition**, Shaftesbury, v. 72, p. 679-699, 1994.

DODD, D.; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O. Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 79, p. 292–304, 2011.

DOI, R.H.; KOSUGI, A. Cellulosomes: plant cell wall degrading enzyme complexes. **Natures Reviews**, London, v. 2, p. 541-551, 2004.

EASTRIDGE, M.L. Major advances in applied dairy cattle nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 1311-1323, 2006.

EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; HEINZE, T. **Hemicellulose**. Polysaccharides 1: structure, characterization and use. Berlin: Springer-Verlag, 2005. 67 p.

ECKBURG, P.B.; BIK, E.M.; BERNSTEIN, C.N.; PURDOM, E.; DETHLEFSEN, L.; SARGENT, M.; GILL, S.R.; NELSON, K.E.; RELMAN, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, Washington, v. 308, p. 1635-1638, 2005.

EMBLEY, T.M.; HORNER, D.A.; HIRT, R.P. Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria? **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 12, p. 437-441, 1997.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

FIELD; C.J.; BLEWETT, H.H.; PROCTOR, S.; VINE, D. Human health benefits of vaccenic acid. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, Ottawa, v. 34, p. 979-991, 2009.

FINDLEY, S.D.; MORMILE, M.R.; SOMMER-HURLEY, A.; ZHANG, X.C.; TIPTON, P.; ARNETT, K.; PORTER, J.H.; KERLEY, M.; STACEY, G. Activity-based metagenomic screening and biochemical characterization of bovine ruminal protozoan glycoside hydrolases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 8106-8113, 2011.

FLIEGEROVA, K.; HODROVA, B.; VOIGT, K. Classical and molecular approaches as a powerful tool for the characterization of rumen polycentric fungi. **Folia Microbiologica**, New York, v. 49, p. 157-164, 2004.

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**, London, v. 6, n. 2, p. 121-131, 2008.

FRANCE, J., DIJKSTRA, J. Volatile fatty acid production. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J.; FRANCE, J.M. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2005. p. 157-175.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 2803-2809, 1996.

GAO, A.W.; WANG, H.R.; YANG, J.L.; SHI, C.X. The effects of elimination of fungi on microbial population and fiber degradation in sheep rumen. **Applied Mechanics and Materials**, New York, v. 295, p. 224-231, 2013.

GRADEL, C.M.; DEHORITY, B.A. Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 2, p. 332-340, 1972.

GRIFFITH, G.W.; OZKOSE, E.; THEODOROU, M.K.; DAVIES, D.R. Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. **Fungal Ecology**, Kidlington, v. 2, p. 87-97, 2009.

GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 75, n. 2, p. 267-277, 2007.

GRUNINGER, R.J.; SENSEN, C.W.; McALLISTER, T.A.; FORSTER, R.J. Diversity of rumen bacteria in canadian cervids. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2 p. e89682, 2014.

HACKMANN, T.J.; SPAIN, J.N. Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 1320-1334, 2010.

HACKSTEIN, J.H.P.; AKHMANOVA, A.; VONCKEN, F.; van HOEK, A.; van ALLEN, T.; BOXMA, B.; YEO MOON-van der STAAY, S.Y.; van der STAAY, G.; LEUNISSEN, J.; HUYNEN, M.; ROSENBERG, J.; VEENHUIS, M. Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments. **Zoology**, Jena, v. 104, p. 290-302, 2001.

HALL, M.B.; HEREJK, C. Differences in yields of microbial crude protein from in vitro fermentation of carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 2486-2493, 2001.

HART, K.J.; YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; DUVAL, S.M.; MCEWAN, N.R.; ANDNEWBOLD, C.J. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, p. 8-35, 2008.

HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. Effects of fatty acid supplements on feed intake, and feeding and chewing behavior of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 1104-1112, 2006.

HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; JANSSEN, P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, London, v. 5, p. 1-15, 2015.

HENDERSON, G.; COX, F.; KITTELMANN, S.; MIRI, V.H.; ZETHOF, M.; NOEL, S.J.; WAGHORN, G.C.; JANSSEN, P.H. Effect of DNA Extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e74787, 2013.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; TAE-WAN KIM, T.W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D.S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R.I.; PENNACCHIO, L.A.; TRINGE, S.G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E.M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, Washington, v. 331, n. 6016, p. 463, 2011.

HESPELL, R.B. Microbial digestion of hemicelluloses in the rumen. **Microbiological Sciences**, Oxford, v. 5, p. 362-365, 1988.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 509-547, 2007

HILDEBRANDT, M.A.; HOFFMAN, C.; SHERRILL-MIX, S.A.; KEILBAUGH, S.A.; HAMADY, M.; CHEN, Y.Y.; KNIGHT, R.; AHIMA, R.S.; BUSHMAN, F.; WU, G.D. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 137, p. 1716-1724, 2009.

HO, Y.W.; BARR, D.J.S. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. **Mycologia**, Lawrence, v. 87, p. 655-677, 1995.

HOBSON, P.N. **The rumen microbial eco-system**. Wallingford: Elsevier Applied Science, 1989. p. 105-135.

HOFMANN, R.R. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. **Oecologia**, New York, v. 78, p. 443-457, 1989.

HUNGATE, R.E. Studies on cellulose fermentation: III. The culture and isolation of cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 53, p. 631-645, 1947.

_____. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. **Bacteriology Reviews**, Pullman, v. 14, p. 1-49, 1950.

HUNGATE, R.E. **The Rumen and its Microbes**. Academic Press, New York, p. 533-535, 1966.

HUNGATE, R.E.; SMITH, W.; BAUCHOP, T.; YU, I.; RABINOWITZ, J.C. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 102, n. 2, p. 389-397, 1970.

HUNTINGTON, G. B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: Influence of physiological state and nutrition. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 30, p. 35, 1990.

HUSE, S.M.; DETHLEFSEN, L.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; RELMAN, A.D.; SOGIN, M.L. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **Plos Genetics**, San Francisco, v. 4, n. 11, p. e1000255-e1000255, 2008.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 7, p. e33306, 2012.

JAMI, E.; WHITE, B. A.; MIZRAHI, I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 9, p. e85423, 2014.

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A.; MIZRAHI, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **ISME Journal**, New York, v. 7, p. 1069-1079, 2013.

JANSSEN, P.H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 3619-3625, 2008.

JEWEL, K.A.; MCCORMICK, C.A.; ODT, C.L.; WEIMER, P. J.; SUEN, G. Ruminal bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 14, p. 4697-710, 2015.

JIAO, J.; HUANG, J.; ZHOU, C.; TANA, Z. Taxonomic identification of ruminal epithelial bacterial diversity during rumen development in goats. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 10, p. 3502-3509, 2015.

JOHNSON, D. E.; JOHNSON, K.A.; WARD, G.M.; BRANINE, M.E. **Ruminants and other animals**. In: KHALIL, M.A.K. (Ed.), **Atmospheric methane: its role in the global environment**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2000. p. 112-133.

JOBLIN, K.; NAYLOR, G.; ODONGO, N.; GARCIA, M.; VILJOEN, G. Ruminal fungi for increasing forage intake and animal productivity. In: FAO. **Sustainable improvement of animal production and health**. Rome, 2010. p. 129-136.

JOUANY, J.P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 126, p. 1335S-1346, 1996.

JUNG, H.J.G. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. **Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 127, p. 810S-813S, 1997.

KABEL, M.A.; YEOMAN, C.J.; HAN, Y.; DODD, D.; ABBAS, C.A.; de BONT, J.A.; MORRISON, M.; CANN, I.K.; MACKIE, R.I. Biochemical characterization and relative expression levels of multiple carbohydrate esterases of the xylanolytic rumen bacterium *Prevotella ruminicola* 23 grown on an ester-enriched substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 5671-5681, 2011.

KANOKRATANA, P.; MHUANTONG, W.; LAOTHANACHAREON, T.; TANGPHATSORNRUANG, S.; EURWILAICHITR, L.Y.; POOTANAKIT, K.; CHAMPREDA, V. Phylogenetic analysis and metabolic potential of microbial communities in an industrial bagasse collection site. **Microbial Ecology**, New York, v. 66, n. 2, p. 322-334, 2013.

KASAI, C.; SUGIMOTO, K.; MORITANI, I.; TANAKA, J.; OYA, Y.; INOUE, H.; TAKEI, Y. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. **BMC gastroenterology**, London, v. 15, n. 1, p. 100, 2015.

KASPEROWICZ, A.; STAN-GLASEK, K.; GUCZYNSKA, W.; PIKNOVÁ, M.; PRISTAS, P.; NIGUTOVÁ, K.; JAVORSKÝ, P.; MICHALOWSKI, T. Fructanolytic and saccharolytic enzymes of the rumen bacterium *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain 3—preliminary study. **Folia Microbiologica**, Dordrecht, v. 55, n. 4, p. 329-331, 2010.

KIM, M.; MORRISON, M.; YU, Z. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 76, p. 49-63, 2011.

KITTELMANN, S.; PINARES-PATIÑO, C.S.; SEEDORF, H.; KIRK, M.R.; GANESH, S.; MCEWAN, J.C.; JANSSEN, P.H. Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 9, p. e103171, 2014.

KOBAYASHI, Y.; SHINKAI, T.; KOIKE, S. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion-review. **Folia Microbiologica**, Dordrecht, v. 53, p. 195-200, 2008.

KOCHERGINSKAYA, S.A.; AMINOV, R.I.; WHITE, B.A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. **Anaerobe**, Kidlington, v. 7, p. 119-134, 2001.

KOHO, N.; MAIJALA, V.; NORBERG, H.; NIEMINEN, M.; POSO, A.R. Expression of MCT1, MCT2 and MCT4 in the rumen, small intestine and liver of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L). **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 141, p. 29-34, 2005.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 204, p. 361-366, 2001.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. **Asian Australian Journal Animal Science**, Collingwood, v. 22, p. 131-138, 2009.

KÕLJALG, U.; LARSSON, KH.; ABARENKOV, K.; NILSSON, RH.; ALEXANDER, II.; EBERHARDT, U.; ERLAND, S.; HOILAND, K.; KJOLLER, R.; LARSSON, E.; PENNANEN, T.; SEM, R.; TAYLOR, AF.; TEDERSOO, L.; VRALSTAD, T.; URSING, BM. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Hoboken, v. 166, p. 1063-1068, 2005.

KONIETSCHKE, F.; LIBIGER, O.; HOTHORN, L.A. Nonparametric Evaluation of Quantitative Traits in Population-Based Association Studies when the Genetic Model is Unknown. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 7, n. 2, p. e31242, 2012.

KRAUSE, D.O.; DENMAN, S.E.; MACKIE, R.I.; MORRISON, M.; RAE, A.L.; ATTWOOD, G.T.; MCSWEENEY, C.S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 27, p. 663-693, 2003.

KUMAR, S.; INDUGU, N.; VECCHIARELLI, B.; PITTA, DW. Associative patterns among anaerobic fungi, methanogenic archaea, and bacterial communities in response to changes in diet and age in the rumen of dairy cows. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 6, p. 1-10, 2015.

LAMED, R.; SETTER, E.; KENIG, R.; BAYER, E.A. The cellulosome-a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. **Biotechnology and Bioengineering Symposium Journal**, New York, v. 13, p. 163-181, 1983.

LARUE, R.; YU, Z.; PARISI, V.A.; EGAN, A.R.; MORRISON, M. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 7, p. 530-543, 2005.

LAY, C.; DORÉ, J.; RIGOTTIER-GOIS, L. Separation of bacteria of the *Clostridium leptum* subgroup from the human colonic microbiota by fluorescence-activated cell sorting or group-specific PCR using 16S rRNA gene oligonucleotides. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 60, p. 513-520, 2007.

LEE, H.J.; JUNG, J.Y.; OH, Y.K.; LEE, S.S.; MADSEN, E.L.; JEONA, C.O. Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups, using barcoded pyrosequencing and 1h nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 17, p. 5983-5993, 2012.

LEE, S.S.; HA, J.K.; CHENG, K.J. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3807-3813, 2000.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger's principles of biochemistry**. 5th.ed. New York: W.H. Freeman, 2011. 244 p.

LEME, P.R.; SILVA, S.L.; PEREIRA, A.S.C.; PUTRINO, S.M.; LANNA, D.P.D.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar em dietas com elevada proporção de concentrados para novilhos nelore em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1786-1791, 2003

LENG, R.A. Quantitative ruminant nutrition: a green science. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 44, p. 363-380, 1993.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, London, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

- LI, R.; ZHU, H.; RUAN, J.; QIAN, W.; FANG, X.; SHI, Z.; LI, Y.; LI, S.; SHAN, G.; KRISTIANSEN, K.; LI, S.; YANG, H.; WANG, J.; WANG, J. De novo assembly of the human genomes with massively parallel short read sequencing. **Genome Research**, New York, v. 20, p. 265-272, 2009.
- LI, R.W.; CONNOR, E.E.; LI, C.; BALDWIN, R.L.; SPARKS, M.E. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 14, n. 1, p. 129-139, 2012.
- LIGGENSTOFFER, A.S.; YOUSSEF, N.H.; MB COUGER, M.B.; ELSHAHED, M.S. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and non-ruminant herbivores. **ISME Journal**, London, v. 4, p. 1225-1235, 2010.
- LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Hoboken, v. 1125, p. 171-189, 2008.
- LOPES, F.C.F. Efeitos da defaunação em ovinos alimentados com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) adicionada de ureia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, p. 180, 2002.
- LOPES, L.D.; LIMA, A.O.S.; TAKETANI, R.T.; DARIAS, P.; SILVA, L.R.F.; ROMAGNOLI, E.M.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; MENDES, R. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrateactive enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 108, n. 1, p. 15-30, 2015.
- LYND, L.R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 15, p. 777-793, 1999.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, p. 506-577, 2002.
- MACKIE, R.; RYCYK, M.; REUMMLER, R.; AMINOV, R.; WIKELSKI, M. Biochemical and microbiological evidence for fermentative digestion in free-living land iguanas and marine iguanas on the Galapagos archipelago. **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 77, p. 127-138, 2004.
- MARCHESSAULT, R.H.; SUNDARARAJAN, P.R. Cellulose. In: ASPINALL, G.O. (Ed.). **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1993. v. 2, p. 11-95.
- MAROUNEK, M.; DUŠKOVÁ, D. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 29, p. 429-433, 1999.
- MARTENS, E.C.; KOROPATKIN, N. M.; SMITH, T. J.; GORDON, J. I. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes Sus- like paradigm. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 284, p. 24673-24677, 2009.

MARTIN, S.A.; RUSSEL, J.B. Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2388-2393, 1987.

MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, Shaftesbury, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010.

MATSUI, H.; OGATA, K.; TAJIMA, K.; NAKAMURA, M.; NAGAMINE, T.; AMINOV, R.I.; BENNO, Y. Phenotypic characterization of polysaccharidases produced by four *Prevotella* type strains. **Current Microbiology**, New York, v. 41, p. 45-49, 2000.

McALLISTER, T.A.; 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.

McBRIDE, M.J.; XIE, G.; MARTENS, E.C.; LAPIDUS, A.; HENRISSAT, B.; RHODES, R.G.; GOLTSMAN, E.; WANG, W.; XU, J.; HUNNICUTT, D.W.; STAROSCIK, A.M.; HOOVER, T.R.; CHENG, Y.Q.; STEIN, J.L. Novel features of the polysaccharide-digesting gliding bacterium *Flavobacterium johnsoniae* as revealed by genome sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 6864-6875, 2009.

McCANN, J.C.; WICKERSHAM, T.A.; LOOR, J.J. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. **Bioinformatics and Biology Insights**, Auckland, v. 8, p. 109-125, 2014.

MERTENS, D.R. Nonstructural and structural carbohydrates. In: VAN HORN H.H.; WILCOX, C.J. (Ed.). **Large dairy herd management**. Champaign: The American Dairy Science Association, 1992. p. 219-235.

_____. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 1463-1481, 1997.

_____. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MESEL, I.D.; DERYCKE, S.; MOENS, T.; VAN DER GUCHT, K.; VINCX, M.; SWINGS, J. Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 6, n. 7, p. 733-744, 2004.

MESSANA, J.D.; BERCHIELLI, T.T.; ARCURI, P.B.; REIS, R.A.; MALHEIROS, E.B.; RIVERA, A.R.; QUEIROZ, M.F.S. Effects of dry sugar cane yeast on the diet intake, digestibility and bovine rumen microbial populations. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, p. 208-212, 2010.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server: a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, p. 386, 2008.

- MHUANTONG, W.; CHAROENSAWAN, V.; KANOKRATANA, P.; TANGPHATSORNRUANG, S.; CHAMPREDA, V. Comparative analysis of sugarcane bagasse metagenome reveals unique and conserved biomass-degrading enzymes among lignocellulolytic microbial communities. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, n. 16, p. 1-17, 2015.
- MIRON, J.; BENGHEDALIA, D. Digestion of structural polysaccharides of Panicum and vetch hays by the rumen bacterial strain *Fibrobacter succinogenes* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 756-759, 1993.
- MIRON, J.; JACOBOVITCH, J.; BAYER, E.A.; LAMED, R.; MORRISON, M.; BENGHEDALIA, D. Subcellular distribution of glycanases and related components in *Ruminococcus albus* SY3 and their role in cell adhesion to cellulose. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 91, n. 4, p. 677-685, 2001.
- MITSUMORI, M.; SUN, W. Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 21, p. 144-154, 2008.
- MOHAMMED, R.; BRINK, G.E.; STEVENSON, D.M.; NEUMANN, A.P.; BEAUCHEMIN, K. A.; SUEN, G. Bacterial communities and volatile fatty acid profiles in the rumen of Holstein heifers fed or chard grass pasture or hay. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 689, 2014.
- MONTGOMERY, L.; FLESHER, B.; STAHL, D. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen-nov as *Fibrobacter succinogenes* comb nov and description of *Fibrobacter intestinalis* sp-nov. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 38, p. 430-435, 1988.
- MOON, Y.H.; IAKIVIAK, M.; BAUER, S.; MACKIE, R.; CANN, I.K.O. Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen Bacterium *Ruminococcus albus* 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 15, p. 5157-5169, 2011.
- MOORE, K.J.; JUNG, H.G. Lignin and fiber digestion. **Journal and Range Management**, Tucson, v. 54, n. 4, p. 420-430, 2001.
- MORGAVI, D.; FORANO, E.; MARTIN, C.; NEWBOLD, C. Microbial ecosystem and 635 methanogenesis in ruminants. **Animal**, Shaftesbury, v. 4, p. 1024-1036, 2010.
- MORRISON, M.; MIRON, J. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins? **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 185, p. 109-115, 2000.
- MOSONI, P.; MARTIN, C.; FORANO, E.; MORGAVI, D.P. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 783-791, 2011.

MULLER, M.; MENDEL, M.; VAN HELLEMOND, J.J.; HENZE, K.; WOEHLER, C.; GOULD, S.B.; YU, R.Y.; VAN DER GIEZEN, M.; TIELENS, A.G.; MARTIN, W.F. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 76, p. 444-495, 2012.

NAGARAJA, T. G.; TOWNE, G.; BEHARKA, A.A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a highgrain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2410-2414, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants**. Washington: National Academic Press, 2007. p. 160.

NEWBOLD, C.J.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 21, p. 230-234, 1995.

NIWIŃSKA, B.; BILIK, K.; ANDRZEJEWSKI, M. Factors influencing rumenic acid and vaccenic acid content in cow's milk fat. **Annals of Animal Science**, Poland, v. 11, p. 3-16, 2011.

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**, Champaign, v. 71, p. 2070-2107, 1988.

NOCEK, J.E.; HART, S.P.; POLAN, C.E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, p. 601-607, 1987.

NOGUCHI, K.; GEL, Y.R.; BRUNNER, E.; KONIETSCHKE, F. nparLD: An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 50, n. 12, p. 1-23, 2012.

NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. 6th ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 1999. v. 2, p. 125-140.

OLESEN, J.E.; SCHELDE, K.; WEISKE, A.; WEISBJERG, M.R.; ASMAN, W.A.H.; DJURHUUS, J. Modelling greenhouse gas emissions from european conventional and organic dairy farms. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Zurich, v. 112, p. 207-220, 2006.

ORPIN, C.G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 91, p. 249-262, 1975.

ORPIN, C.G. Ecology of rumen anaerobic fungi in relation to the nutrition of the host animal: the roles of protozoa and fungi in ruminant digestion In: NOLAN, J.V.; LENG, R.A.; DEMEYER, D.I. (Ed). The rumen microbial ecosystem. Armidale: Penambul Books, 1989. p. 29-37.

OZKOSE, E.; THOMAS, B.J.; DAVIES, D.R.; GRIFFITH, G.W.; THEODOROU, M.K. *Cyllamyces aberensis* gen.nov. sp.nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p. 666-673, 2001.

PALMIQUIST, D.L.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 54, p. 1025-1033, 1971.

PALMONARI, A.; STEVENSON, D.M.; MERTENS, D.R.; CRUYWAGEN, C.W.; WEIMER, P. J. pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 279-287, 2010.

PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, London, v. 26, p. 715-721, 2010.

PATIL, K.R.; HAIDER, P.; POPE, P.B.; TURNBAUGH, P.J.; MORRISON, M.; SCHEFFER, T.; MCHARDY, A.C. Taxonomic metagenome sequence assignment with structured output models. **Nature Methods**, London, v. 8, p. 191-92, 2011.

PEREIRA, R.A.N.; FERREIRA, W.M.; GARCIA, S.K. Digestibility of sugar cane bagasse after a NaOH treatment in growing rabbit diets. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 573-577, 2008.

PIGDEN, W.J.; HEANEY, D.P. Lignocellulose in ruminant nutrition. **Advances in Chemistry**, Washington, v. 95, p. 245-261, 1969.

PINTO, A.P.; PEREIRA, E.S.; MIZUBUTI, I.Y. Características nutricionais e formas de utilização da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 73-84, 2003.

PITTA, D.W.; KUMAR, S.; VECCHIARELLI, B.; SHIRLEY, D.J.; BITTINGER, K.; BAKER, L.D.; FERGUSON, J.D.; THOMSEN, N. Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, p. 4014-4022, 2014.

POPE, P.B.; DENMAN, S.E.; JONES, M.; TRINGE, S.G.; BARRY, K.; MALFATTI, S.A.; MCHARDY, A.C.; CHENG, J.F.; HUGENHOLTZ, P.; MCSWEENEY, C.S.; MORRISON, M. Adaptation to herbivory by the Tammar wallaby includes bacterial and glycoside hydrolase profiles different from other herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 14793-14798, 2010.

POPE, P.B.; MACKENZIE, A.K.; GREGOR, I.; SMITH, W.; SUNDSET, M.A.; MCHARDY, A.C.; MORRISON, M.; EIJSINK, V.G.H. Metagenomics of the Svalbard Reindeer rumen microbiome reveals abundance of polysaccharide utilization Loci. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, p. e38571, 2012.

PROCKNOR, C. Subprodutos: o bagaço. **STAB, Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 18, n. 4, p. 14, 2000.

PURUSHE, J.; FOUTS, D.E.; MORRISON, M.; WHITE, B.A.; MACKIE, R.I. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: insights into their environmental niche. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 721-729, 2010.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; CHAYSAVANH MANICHANH⁵, TRINE NIELSEN⁴, NICOLAS PONS⁶, LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D.R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.M.; HANSEN, T.; PASLIER, D.L.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H.B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORE, J.; GUARNER, F.; KRISTIANSEN, K.; PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; BORK, P.; EHRLICH, S.D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. p. 1-15.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 62, n. 2, p. 142-160, 2007.

RANSOM-JONES, E.; JONES, D.L.; MCCARTHY, A.J.; MCDONALD, J.E. The Fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. **Microbial Ecology**, New York, v. 63, p. 267-281, 2012.

RINCON, M.T.; EPELJNIK, T.C.; MARTIN, J.C.; LAMED, R.; BARAK, Y.; BAYER, E.A.; FLINT, H.J. Unconventional Mode of Attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* Cellulosome to the Cell Surface. *Journal of Bacteriology*, v. 187, p. 7569-7578, 2005.

RITZENTHALER, K.L.; MCGUIRE M.K.; FALEN R.; SHULTZ T.D.; DASGUPTA, N.; MCGUIRE, M.A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. **Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 131, p. 1548-1554, 2001.

ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. The detergent system of analysis. In: JAMES, W.P.T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fibre in food**. New York: Marcel Dekker, 1981. chap. 9, p. 123-158.

ROCHA, G.J.M.; MARTIN, C.; SOARES, I.B.; SOUTO-MAIOR, A.M.; BAUDEL, H.M.; MORAES, C. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for the ethanol production. **Biomass & Bioenergy**, Kidlington, v. 35, p. 663-670, 2011.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, London, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

RUSSELL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, Washington, v. 292, p. 1119-1222, 2001.

RUSSEL, J.B.; WILSON, D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 1503-1509, 1996.

- RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J.; MARTIN, S.A. Strategies of nutrient transport by ruminal bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 2996-3012, 1990.
- SADET, S; MARTIN, C.; MEUNIER, B.; MORGAVI, D.P. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 7, p. 939-944, 2007.
- SAMPAIO, C.B.; DETMANN, E.; LAZZARINI, I.; SOUZA, M.A.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 3, p. 560-569, 2009.
- SCHÄDEL, C.; RICHTER, A.; BLÖCHL, A.; HOCH, G. Hemicellulose concentration and composition in plant cell walls under extreme carbon source–sink imbalances. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 139, p. 241-255, 2010.
- SCHAUER, K.; RODIONOV, D.A.; de REUSE, H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the ‘tip of the iceberg’? **Trends in Biochemical Sciences**, London, v. 33, p. 330-338, 2008.
- SCHNORR, S.L.; CANDELA, M.; RAMPELLI, S.; CENTANNI, M.; CONSOLANDI, C.; BASAGLIA, G.; TURRONI, S.; BIAGI, E.; PEANO, C.; SEVERGNINI, M.; FIORI, J.; GOTTI, R.; BELLIS, G.; LUISELLI, D.; BRIGIDI, P.; MABULLA, A.; MARLOWE, F.; HENRY, A.G.; CRITTENDEN, A.N. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. **Nature Communications**, London, v. 5, n. 3654, p. 1-12, 2014.
- SHINKAI, T.; KOBAYASHI, Y. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 1646-1652, 2007.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2002. 235 p.
- SIMON, C.; DANIEL, R. Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 85, n. 2, p. 265-276, 2009.
- SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13-18, 2009.
- SIROHI, S.; CHOUDHURY, P.; PUNIYA, A.; SINGH, D.; DAGAR, S.; SINGH, N. Ribosomal ITS1 sequence-based diversity analysis of anaerobic rumen fungi in cattle fed on high fiber diet. **Annals of Microbiology**, New York, v. 63, p. 1571-1577, 2013.
- SKILLMAN, L.C.; TOOVEY, A.F.; WILLIAMS, A.J.; WRIGHT, A.D.G. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between Entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 200-206, 2006.

SLYTER, L.L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.43, p. 910-929, 1976.

SMITH, D. The nonstructural carbohydrates. In: BUTLER, G.W.; BAILEY, R.W. (Ed). **Chemistry and biochemistry of herbage**. London: Academic Press, 1973. p. 105-155.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSEL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3562-3577, 1992.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; MARK WELCH, D.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored rare biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P.J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 75, p. 165-174, 2007.

STEWART, C.S.; FLINT, H.J.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 140-195.

STROBEL, H.J.; RUSSELL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein syntheses by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 10, p. 2947-2959, 1986.

SUEN, G.; WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; AYLWARD, F.O.; BOYUM, J.; DENEKE, J.; DRINKWATER, C.; IVANOVA, N.N.; MIKHAILOVA, N.; CHERTKOV, O.; GOODWIN, L.A.; CURRIE, C.R.; MEAD, D.; BRUMM, P.J. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, p. e18814, 2011a.

SUEN, G.; STEVENSON, D.M.; BRUCE, D.C.; CHERTKOV, O.; COPELAND, A.; CHENG, J.F.; DETTER, C.; DETTER, J.C.; GOODWIN, L.A.; HAN, C.S.; HAUSER, L.J.; IVANOVA, N.N.; KYRPIDES, N.C.; LAND, M.L.; LAPIDUS, A.; LUCAS, S.; OVCHINNIKOVA, G.; PITLUCK, S.; TAPIA, R.; WOYKE, T.; BOYUM, J.; MEAD, D.; WEIMER, P.J. Complete genome of the cellulolytic ruminal bacterium *ruminococcus albus* 7. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 193, n. 19, p. 5574-5575, 2011b.

SYLVESTER, J.T.; KARNATI, S.K.R.; YU, Z.T.; MORRISON, M.; ANDFIRKINS, J.L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 134, p. 3378-3384, 2004.

THEODOROU, M.K.; MENNIM, G.; DAVIES, D.R.; ZHU, W.Y.; TRINCI, A.P.; BROOKMAN, J.L. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. **Proceedings of the Nutrition Society**, Lengerich, v. 55, p. 913-926, 1996.

- THOMAS, F.; HEHEMANN, J.H.; REBUFFET, E.; CZJZEK, M.; MICHEL, G. Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 2, n. 93, p. 1-16, 2011.
- THORPE, A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. **Climate Change**, London, v. 93, p. 407-431, 2009.
- TYMENSEN, L.D.; BEAUCHEMIN, K.A.; McALLISTER, T.A. Structures of free-living and protozoa-associated methanogen communities in the bovine rumen differ according to comparative analysis of 16S rRNA and mcrA genes. **Microbiology**, New York, v. 158, p. 1808-1817, 2012.
- UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA, A.; KURIHARA, M.; KAMAGATA, Y. An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. **Anaerobe**, Kidlington, v. 16, p. 27-33, 2010.
- VAN DER GIEZEN, M. Strange fungi with even stranger insides. **Mycologist**, London, v. 16, p. 129-131, 2002.
- VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, Kidlington, v. 30, n. 6, p. 1458-80, 2012.
- YANG, J.Y.; SEO, J.; KIM, H.J.; SEO, S.; HÁ, J.K. Nutrient Synchrony: Is it a suitable strategy to improve nitrogen utilization and animal performance? Asian-Aust. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 23, p. 972-979, 2010.
- YÁNEZ-RUIZ, D.R.; ABECIA, L.; NEWBOLD, C.J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 6, p. 1-12, 2015.
- YOUSSEF, N.H.; COUGER, M.B.; STRUCHTEMEYER, C.G.; LIGGENSTOFFER, A.S.; PRADE, R.A.; NAJAR, F.Z.; ATIYEH, H.K.; WILKINS, M.R.; ELSHAHED, M.S. The genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, p. 4620-4634, 2013.
- _____. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, Arlington, v. 46, p. 825-829, 1963.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Orvallis: O & B Books, 1983. 374 p.
- _____. **Nutritional ecology of the ruminant**. New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.D.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3583- 3597, 1991.
- VAN VUREN, D., COBLENTZ, B.E. Some ecological effects of feral sheep on Santa Cruz Island, California, USA. **Biological Conservation**, Kidlington, v. 41, p. 253-268, 1987.
- VAN WIEREN, S.E. **Digestive strategies in ruminants and nonruminants**. Wageningen: Wageningen University, 1996. p. 132-150.
- VAN ZIJDERVELD, S.M.; GERRITS, W.J.J.; APAJALAHTI, J.A.; NEWBOLD, J. R.; DIJKSTRA, J.; LENG, R.A.; PERDOK, H.B. Nitrate and sulfate: effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 5856-5866, 2010.
- VOCADLO, D.J.; DAVIES, G.J. Mechanistic insights into glycosidase chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 12, p. 539-555, 2008.
- VONCKEN, F.; BOXMA, B.; TJADEN, J.; AKHMANOVA, A.; HUYNEN, M.; VERBEEK, F.; TIELENS, A.G.M.; HAFERKAMP, I.; NEUHAUS, H.E.; VOGELS, G.; VEENHUIS, M.; HACKSTEIN, J.H.P. Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. **Molecular Microbiology**, Hoboken, v. 44, p. 1441-1454, 2002.
- WANG, T.Y.; CHEN, H.L.; LU, M.Y.L.; CHEN, Y.C.; SUNG, H.M.; MAO, C.T.; CHO, H.Y.; KE, H.M.; HWA, T.Y.; RUAN, S.K.; HUNG, K.Y.; CHEN, C.K.; LI, J.Y.; WU, Y.C.; CHEN, Y.H.; CHOU, S.P.; TSAI, Y.W.; CHU, T.C.; SHIH, C.C.A.; LI, W.H.; SHIH, M.C. Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 24, p. 1-16, 2011.
- WANG, Y.; QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLOs ONE**, San Francisco, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.
- WEBER, S.; STUBNER, S.; CONRAD, R. Bacterial populations colonizing and degrading rices trawin anoxic paddy soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1318-1327, 2001
- WEIMER, P.J. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 1496-1502, 1996.
- _____. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 6, n. 296, p. 1-16, 2015.
- WEIMER, P.J.; RUSSELL, J.B.; MUCK, R.E. Lessons from the cow: What the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Kidlington, v. 100, p. 5323-5331, 2009.

WEIMER, P.J.; WAGHORN, G.C.; ODT, C.L.; MERTENS, D.R. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 122-134, 1999.

WEIMER, P.J.; PRICE, N.P.J.; KROUKAMP, O.; JOUBERT, L.M.; WOLFAARDT, G.M.; WILLEM, H.V.Z. Studies of the extracellular glycocalyx of the anaerobic cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* 7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7559-7566, 2006.

WEN, F.; NAIR, N.U.; ZHAO, H. Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 4, p. 412-419, 2009.

WHITAKER, D.A.; SMITH, E.J.; ROSA, G.O.D.; KELLY, J.M. Some effects of nutrition and management on the fertility of dairy cattle. **Veterinary Record**, London, v. 133, p. 61-64, 1993.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. (Ed.). **PCR protocols**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILLIAMS, A.G.; ORPIN, C.G. Polysaccharide degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 418-426, 1987.

WILSON, C.A.; WOOD, T.M. The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 37, p. 125-129, 1992.

WILSON, D.B. Evidence for a novel mechanism of microbial cellulose degradation. **Cellulose**, Dordrecht, v. 16, p. 723-727, 2009.

WOJCIECHOWICZ, M.; HEINRICHOVA, K.; ZIOLECKI, A. An exopectate lyase of *Butyrivibrio fibrisolvens* from the bovine rumen. **Journal of General Microbiology**, London, v. 128, p. 2661-2665, 1982.

WONGWILAIWALIN, S.; LAOTHANACHAREON, T.; MHUANTONG, W.; TANGPHATSORNRUANG, S.; EURWILAICHITR, L.; IGARASHI, Y. Comparative metagenomic analysis of microcosm structures and lignocellulolytic enzyme systems of symbiotic biomass-degrading consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 97, n. 20, p. 8941-54, 2013.

WU, G.D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.Y.; KEILBAUGH, S.A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W.A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.; GUPTA, K.; BALDASSANO, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F.D.; LEWIS, J.D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, Washington, v.334, n. 6052, p. 105-108, 2011.

XIE, G.; BRUCE, D.C.; CHALLACOMBE, J.F.; CHERTKOV, O.; DETTER, J.C.; GILNA, P.; HAN, C.S.; LUCAS, S.; MISRA, M.; MYERS, G.L.; RICHARDSON, P.; TAPIA, R.; THAYER, N.; THOMPSON, L.S.; BRETTIN, T.S.; HENRISSAT, B.; WILSON, D.B.; MCBRIDE, M.J. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3536-3546, 2007.

ZEDER, M.A.; HESSE, B. The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros mountains 10,000 years ago. **Science**, Washington, v. 287, p. 2254-2257, 2000.

ZEDER, M.A. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, p. 11597-11604, 2008.

ZENED, A.; COMBES, S.; CAUQUIL, L.; MARIETTE, J.; KLOPP, C.; BOUCHEZ, O.; TROEGELER-MEYNADIER, A.; ENJALBERT, F. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 83, p. 504-514, 2013.

ZERIKLY, M.; CHALLIS, G.L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **Journal of Chemistry and Biochemistry**, San Diego, v. 10, n. 4, p. 625-633, 2009.

ZIOLECKI, A.; BRIGGS, C.A. The microflora of the rumen of young calf: II. Source, nature and development. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v. 24, p. 148-163, 1961.

ANEXOS

Anexo A - Nomenclatura utilizada para a identificação das amostras de animais que receberam duas dietas distintas e foram coletadas em cinco tempos diferentes

Animal	Dieta *	Tempo	Natureza da amostra **	Nomenclatura ***
I	Controle	1 d	Fibra: F; líquido: L	I1F ou L
II	Controle	1 d	Fibra: F; líquido: L	II1F ou L
III	Controle	1 d	Fibra: F; líquido: L	III1F ou L
IV	Bagaço	1 d	Fibra: F; líquido: L	IV1F ou L
V	Bagaço	1 d	Fibra: F; líquido: L	V1F ou L
VI	Bagaço	1 d	Fibra: F; líquido: L	VI1F ou L
I	Controle	15 d	Fibra: F; líquido: L	I2F ou L
II	Controle	15 d	Fibra: F; líquido: L	II2F ou L
III	Controle	15 d	Fibra: F; líquido: L	III2F ou L
IV	Bagaço	15 d	Fibra: F; líquido: L	IV2F ou L
V	Bagaço	15 d	Fibra: F; líquido: L	V2F ou L
VI	Bagaço	15 d	Fibra: F; líquido: L	VI2F ou L
I	Controle	30 d	Fibra: F; líquido: L	I3F ou L
II	Controle	30 d	Fibra: F; líquido: L	II3F ou L
III	Controle	30 d	Fibra: F; líquido: L	III3F ou L
IV	Bagaço	30 d	Fibra: F; líquido: L	IV3F ou L
V	Bagaço	30 d	Fibra: F; líquido: L	V3F ou L
VI	Bagaço	30 d	Fibra: F; líquido: L	VI3F ou L
I	Controle	45 d	Fibra: F; líquido: L	I4F ou L
II	Controle	45 d	Fibra: F; líquido: L	II4F ou L
III	Controle	45 d	Fibra: F; líquido: L	III4F ou L
IV	Bagaço	45 d	Fibra: F; líquido: L	IV4F ou L
V	Bagaço	45 d	Fibra: F; líquido: L	V4F ou L
VI	Bagaço	45 d	Fibra: F; líquido: L	VI4F ou L
I	Controle	60 d	Fibra: F; líquido: L	I5F ou L
II	Controle	60 d	Fibra: F; líquido: L	II5F ou L
III	Controle	60 d	Fibra: F; líquido: L	III5F ou L
IV	Bagaço	60 d	Fibra: F; líquido: L	IV5F ou L
V	Bagaço	60 d	Fibra: F; líquido: L	V5F ou L
VI	Bagaço	60 d	Fibra: F; líquido: L	VI5F ou L

* Três animais receberam a dieta controle e os outros três animais receberam a dieta contendo bagaço;

** Foram amostradas as duas fases do conteúdo ruminal, a fibra e o líquido para extração de DNA;

*** Descrição utilizada em ao longo do texto

Anexo B – Concentração de ácidos graxos voláteis no rúmen do *Ovis aries* ao longo de 5 tempos amostrados no decorrer de 60 dias

Amostra	Acetato	Propionato	Butirato	Isovalerina	Valerina	Isobutirato
I1L	71,6	14,9	10,1	1,7	1,0	0,7
II1L	70,3	16,3	10,5	1,4	0,9	0,6
III1L	69,4	18,0	9,9	1,2	1,1	0,4
IV1L	70,9	14,4	11,1	1,8	0,9	0,9
V1L	70,1	14,9	11,2	1,9	1,0	0,9
VI1L	72,5	14,5	9,5	1,8	0,8	0,9
I2L	77,0	13,0	7,7	1,1	0,7	0,5
II2L	75,0	14,5	8,3	1,1	0,7	0,4
III2L	66,7	17,8	11,8	1,6	1,2	0,8
IV2L	81,1	11,8	5,4	0,7	0,6	0,3
V2L	76,5	13,9	7,1	1,2	0,9	0,4
VI2L	72,8	17,5	7,4	1,2	0,7	0,4
I3L	66,6	17,2	11,5	2,1	1,5	1,0
II3L	67,5	14,0	13,5	2,5	1,2	1,2
III3L	66,9	19,2	10,1	1,9	1,2	0,7
IV3L	66,8	15,9	12,3	2,5	1,3	1,3
V3L	67,3	17,1	11,1	2,3	1,2	1,0
VI3L	69,1	16,2	9,5	2,7	1,1	1,3
I4L	68,4	16,1	10,5	2,5	1,5	1,1
II4L	67,8	14,9	13,2	2,2	1,0	1,0
III4L	66,1	17,6	11,8	2,3	1,2	1,0
IV4L	68,9	15,4	11,5	2,0	1,1	1,0
V4L	69,2	15,4	11,1	2,3	1,1	1,0
VI4L	68,3	16,3	10,4	2,7	1,1	1,3
I5L	66,7	15,9	10,8	3,4	1,6	1,6
II5L	68,8	15,1	11,2	2,5	1,2	1,2
III5L	69,6	16,0	10,1	2,2	1,1	1,0
IV5L	72,2	14,4	9,0	2,3	1,0	1,1
V5L	73,0	14,4	9,1	1,9	0,8	0,8
VI5L	73,0	17,1	6,3	2,0	0,8	0,9
Média	70,3	15,6	10,1	2,0	1,1	0,9

*I, II, III= animais que receberam a dieta controle;

**IV, V, VI= animias que receberam a dieta bagaço;

***1= primeiro dia de coleta, 2= 15 dias, 3= 30 dias, 4= 45 dias e 5= 60 dias após o início do experimento;

****L= líquido ruminal

Anexo C – Estimativa de diversidade de sequências da região V3 do gene 16S rRNA no rúmen de *O. aries*_a
(continua)

Amostras	Total de sequência*	Ace	Chao	OTUs**	Simpson	Shannon	Fisher
I1F	19.900	3.008	2.640	1.022	9,14	0,245	732
II1F	18.011	3.501	3.114	1.044	9,12	0,217	766
III1F	35.306	2.843	2.422	954	8,88	0,195	632
IV1F	24.742	2.974	2.890	1.050	9,28	0,283	776
V1F	18.789	3.339	3.094	1.035	9,13	0,227	752
VI1F	13.338	2.740	2.579	997	8,98	0,181	694
I2F	30.534	3.434	3.187	1.079	9,17	0,195	825
II2F	25.148	3.682	3.398	1.125	9,30	0,226	908
III2F	36.226	3.666	3.786	1089	9,30	0,273	843
IV2F	99.178	3.781	3.709	1118	9,38	0,285	895
V2F	20.560	4.551	4.113	1.216	9,54	0,268	1.098
VI2F	23.822	3.799	3.484	1.074	9,20	0,231	816
I3F	25.705	4.292	3.926	1.166	9,46	0,285	989
II3F	35.052	3.537	3.106	1.161	9,46	0,279	979
III3F	2.227	3.316	3.013	1.086	9,33	0,271	837
IV3F	19.487	4.013	3.794	1.162	9,44	0,260	981
V3F	20.433	4.394	4.298	1.194	9,55	0,320	1.049
VI3F	19.220	3.514	3.403	1.058	9,21	0,246	789
I4F	43.321	3.955	3.537	1.191	9,54	0,295	1.042
II4F	38.044	4.009	3.297	1.117	9,35	0,275	893
III4F	39.278	4.031	3.603	1.144	9,35	0,239	945
IV4F	30.010	3.822	3.595	1.187	9,56	0,318	1.033
V4F	22.187	4.228	3.890	1.147	9,33	0,229	951
VI4F	14.976	4.056	3.968	1.129	9,31	0,242	916
I5F	38377	3.936	3.774	1.147	9,22	0,118	951
II5F	14.568	4.080	3.545	1.239	9,69	0,360	1.152
III5F	32.703	4.043	3.690	1222	9,64	0,348	1.112
IV5F	22.172	4.156	3.571	1.210	9,62	0,330	1.084
V5F	13.299	4.324	3.846	1.270	9,73	0,353	1.229
VI5F	13.198	4.245	3.817	1.228	9,60	0,304	1.125
I1L	14.973	3.926	3.628	1.157	9,44	0,279	971
II1L	20.988	4.471	4.450	1.209	9,46	0,223	1.082
III1L	21.585	4.361	4.082	1.166	9,39	0,237	989
IV1L	21.365	4.794	4.260	1.213	9,52	0,269	1.091
V1L	24.978	4.046	3.920	1.165	9,40	0,226	987
VI1L	23.610	4.947	4.935	1.239	9,53	0,246	1.152
I2L	34.678	4.683	4.238	1.234	9,57	0,282	1.140
II2L	37.329	5.042	4.647	1.256	9,67	0,340	1.193
III2L	31.772	4.534	4.036	1.225	9,50	0,241	1.118
IV2L	27.781	4.597	4.151	1.233	9,59	0,299	1.137
V2L	16.752	5.028	4.787	1.291	9,69	0,306	1.284
VI2L	21.551	4.443	4.092	1.215	9,52	0,264	1.095
I3L	32.427	4.502	4.126	1.226	9,54	0,258	1.121
II3L	28.669	4.722	4.113	1.220	9,52	0,258	1.107
III3L	43.155	4.515	4.310	1.236	9,58	0,263	1.144
IV3L	25.057	4.534	3.989	1.242	9,56	0,260	1.159
V3L	24.178	5.134	4.462	1.287	9,70	0,300	1.273
VI3L	22.090	5.247	4.626	1.259	9,64	0,303	1.201
I4L	24.177	4.807	3.900	1.247	9,58	0,270	1.171
II4L	29.935	4.954	4.275	1.254	9,58	0,267	1.188

Anexo C – Estimativa de diversidade de sequências da região V3 do gene 16S rRNA no rúmen de *O. aries*_a
(conclusão)

III4L	28.408	4.893	4.584	1.252	9,62	0,277	1.183
IV4L	22.229	4.545	4.169	1.222	9,52	0,255	1.112
V4L	23.295	4.738	4.330	1.229	9,52	0,258	1.128
VI4L	65.030	4.292	3.754	1.117	9,26	0,218	893
I5L	29.269	4.692	4.230	1.214	9,46	0,227	1.093
II5L	36.831	4.880	4.517	1.231	9,54	0,271	1.133
III5L	37.780	4.583	3.906	1.220	9,58	0,295	1.107
IV5L	23.095	5.116	4.318	1.247	9,58	0,263	1.171
V5L	27.222	4.544	4.084	1.204	9,53	0,282	1.071
VI5L	47.579	3.922	3.382	1.195	9,57	0,311	1.051

O experimento segue a seguinte nomenclatura: I, II e III animais que receberam a dieta controle; IV, V e VI receberam a dieta com bagaço; os números 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos períodos de coleta, os quais são 3 h, 15, 30, 45 e 60 d após a oferta da dieta, respectivamente; F= fibra e L= líquido ruminal;

*Comprimento da sequência foi ~160 pares de bases;

**UTOs: unidades taxonômicas operacionais;

_aFoi feita a rarefação por 2225 sequências e feito o cálculo de índice de riqueza e diversidades

Anexo D – Estimativa de diversidade de sequências da região V6-7 do gene 16S rRNA no rúmen de *O. aries*,
(continua)

Amostras	Total de sequência*	Ace	Chao	OTUs**	Simpson	Shannon	Fisher
I1F	20.183	5.453	5.109	2.651	0,168	10,15	1.279
II1F	30.247	8.004	7.229	3.125	0,094	10,23	1.717
III1F	18.824	5.369	5.085	2.494	0,106	9,77	1.152
IV1F	16.445	4.769	4.633	2.458	0,141	10,03	1.124
V1F	19.657	6.009	5.565	2.665	0,106	9,98	1.291
VI1F	14.511	4.275	4.023	2.211	0,061	9,45	943
I2F	17.859	7.243	6.424	2.960	0,145	10,30	1.554
II2F	16.544	7.395	6.339	3.165	0,146	10,43	1.758
III2F	26.653	7.788	7.056	3.046	0,163	10,33	1.637
IV2F	22.777	7.079	6.462	3.008	0,161	10,38	1.600
V2F	18.692	6.095	5.533	2.735	0,143	10,13	1.350
VI2F	21.453	6.769	6.447	3.001	0,183	10,43	1.594
I3F	16.961	5.951	5.500	2.658	0,149	10,08	1.285
II3F	21.253	5.950	5.391	2.805	0,106	10,12	1.412
III3F	19.758	7.526	6.746	3.150	0,146	10,40	1.742
IV3F	22.352	8.060	7.404	3.274	0,154	10,55	1.873
V3F	18.587	8.037	6.921	3.218	0,142	10,44	1.810
VI3F	22.279	7.149	6.649	2.963	0,103	10,18	1.557
I4F	19.843	5.661	5.383	2.731	0,118	10,15	1.347
II4F	17.491	7.055	6.492	2.953	0,102	10,11	1.548
III4F	18.537	5.763	5.359	2.696	0,122	10,04	1.317
IV4F	18.378	5.903	5.698	2.669	0,147	10,11	1.294
V4F	20.189	5.903	5.450	2.722	0,086	10,01	1.339
VI4F	19.438	5.992	5.559	2.729	0,115	10,03	1.345
I5F	10.981	5.073	4.872	2.529	0,047	9,73	1.180
II5F	19.939	7.279	6.433	3.049	0,113	10,25	1.640
III5F	23.167	6.806	6.392	2.783	0,139	10,09	1.392
IV5F	17.312	5.425	5.130	2.607	0,118	10,01	1.240
V5F	15.616	7.792	6.881	3.288	0,156	10,56	1.888
VI5F	19.865	7.951	7.215	3.157	0,127	10,36	1.749
I1L	16.136	4.506	4.177	1.993	0,083	9,08	799
II1L	21.202	4.765	4.558	2.241	0,069	9,42	964
III1L	14.699	3.965	3.632	1.832	0,035	8,67	700
IV1L	14.994	4.415	4.072	1.978	0,063	9,05	789
V1L	13.199	5.234	4.930	2.403	0,150	9,82	1.082
VI1L	9.349	4.079	3.781	2.085	0,084	9,35	858
I2L	17.097	5.558	5.029	2.086	0,035	8,70	859
II2L	30.063	6.494	6.538	2.277	0,070	9,21	990
III2L	14.504	5.127	4.710	2.267	0,077	9,37	983
IV2L	15.970	4.596	4.322	2.086	0,048	9,01	859
V2L	12.992	4.318	4.227	2.009	0,069	9,07	809
VI2L	18.798	4.607	4.437	1.944	0,049	8,77	768
I3L	20.446	7.045	6.495	2.869	0,105	10,03	1.469
II3L	21.370	5.947	5.407	2.538	0,073	9,55	1.187
III3L	23.998	5.789	5.424	2.496	0,070	9,64	1.154
IV3L	20.676	5.533	5.209	2.524	0,062	9,64	1.176
V3L	20.526	6.139	5.646	2.596	0,117	9,85	1.234
VI3L	17.927	5.439	5.099	2.438	0,117	9,77	1.109
I4L	22.735	5.571	5.041	2.278	0,052	9,15	991
II4L	13.061	5.144	4.780	2.311	0,078	9,35	1.014
III4L	14.507	5.183	4.755	2.141	0,076	9,18	895
IV4L	16.299	4.559	4.348	2.017	0,030	8,84	814

Anexo D – Estimativa de diversidade de sequências da região V6-7 do gene 16S rRNA no rúmen de *O. aries*_a
(conclusão)

V4L	10.782	4.631	4.247	2.153	0,084	9,35	903
VI4L	15.522	4.413	4.087	2.092	0,078	9,27	863
I5L	23.317	5.159	4.951	2.281	0,064	9,39	993
II5L	11.124	4.689	4.245	2.141	0,038	8,95	895
III5L	14.842	5.026	4.703	2.234	0,092	937	959
IV5L	12.817	5.228	5.142	2.501	0,104	9,81	1.158
V5L	14.403	5.213	4.803	2.280	0,092	9,42	992
VI5L	16.676	5.922	5.648	2.601	0,127	9,95	1.238

O experimento segue a seguinte nomenclatura: I, II e III animais que receberam a dieta controle; IV, V e VI receberam a dieta com bagaço; os números 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos períodos de coleta, os quais são 3 h, 15, 30, 45 e 60 d após a oferta da dieta, respectivamente; F= fibra e L= líquido ruminal;

*Comprimento da sequência foi ~160 pares de bases;

**UTOs: unidades taxonômicas operacionais= UTOs observadas;

_aFoi feita a rarefação por 8880 sequências e feito o cálculo de índice de riqueza e diversidades

Anexo E – Estimativa de diversidade de sequências da região ITS2 fúngica no rúmen de *O. aries*_a

Amostra	Total de sequência	Ace _a	Chao1	UTOs	Simpson	Shannon	Fisher
I1F	8.307	2.741	2.547	1.060	0,043	7,93	447,7
II1F	18.304	2.465	2.410	886	0,045	7,36	337,1
III1F	6.560	2.074	1.951	844	0,041	7,22	312,9
IV1F	42.973	2.597	2.374	1.035	0,043	7,81	430,7
V1F	16.957	2.482	2.285	1.011	0,058	7,94	41,4
VI1F	12.042	2.397	2.315	939	0,038	7,55	369
I2F	13.738	2.506	2.346	981	0,046	7,72	390
II2F	11.051	2.596	2.248	1.022	0,044	7,72	422,1
III2F	14.651	2.266	2.076	881	0,036	7,18	334,2
IV2F	22.862	2.820	2.697	1.074	0,061	8,03	457,3
V2F	27.972	2.581	2.408	981	0,052	7,78	390
VI2F	32.740	2.314	2.141	937	0,050	7,68	367,8
I3F	20.502	2.472	2.427	992	0,052	7,82	402,5
II3F	24.435	2.299	2.097	927	0,035	7,40	361,7
III3F	26.141	2.039	1.931	784	0,036	6,94	279,8
IV3F	47.288	2.649	2.421	1.071	0,058	8,06	455,2
V3F	9.072	2.565	2.552	1.019	0,057	7,98	420,1
VI3F	115.593	2.994	2.866	1.156	0,078	8,42	516,1
I4F	13.508	2.632	2.545	997	0,053	7,86	405,7
II4F	10.184	2.611	2.460	1.009	0,042	7,75	413,5
III4F	14.222	2.301	2.119	905	0,035	7,20	348,4
IV4F	18.859	2.605	2.518	999	0,045	7,80	407
V4F	7.999	2.551	2.300	1.034	0,036	7,81	430
VI4F	9.654	2.699	2.435	1.019	0,044	7,79	420,1
I5F	4.331	1.276	1.201	684	0,098	7,48	228,5
II5F	5.509	1.834	1.821	790	0,062	7,43	283
III5F	5.016	2.005	1.678	780	0,043	7,17	277,6
IV5F	7.230	2.286	2.078	920	0,045	7,64	357,4
V5F	11.728	2.355	2.366	941	0,066	7,88	370,3
VI5F	10.814	2.237	2.252	955	0,055	7,80	379

O experimento segue a seguinte nomenclatura: I, II e III animais que receberam a dieta controle; IV, V e VI receberam a dieta com bagaço; os números 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos períodos de coleta, os quais são 3 h, 15, 30, 45 e 60 d após a oferta da dieta, respectivamente; F= fibra ruminal;

*Comprimento da sequência foi ~160 pares de bases;

**UTOs: unidades taxonômicas operacionais;

_aFoi feita a rarefação por 4330 sequências e feito o cálculo de índice de riqueza e diversidades