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

**Metagenoma do microbioma do rúmen de ovinos e prospecção de
genes degradadores de biomassa vegetal**

Maria Carolina Pezzo Kmit

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

**Piracicaba
2018**

Maria Carolina Pezzo Kmit
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

**Metagenoma do microbioma do rúmen de ovinos e prospecção de genes degradadores
de biomassa vegetal**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RODRIGO MENDES**
Co-Orientador:
Prof. Dr. **ANDRÉ OLIVEIRA DE SOUZA LIMA**

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

Piracicaba
2018

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

Kmit, Maria Carolina Pezzo

Metagenoma do microbioma do rúmen de ovinos e prospecção de genes degradadores de biomassa vegetal / Maria Carolina Pezzo Kmit. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018. 109 p.

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

1. Enzimas lignogelulolíticas 2. Biotecnologia 3. Enzimas ativas em carboidrato 4. Sequenciamento metagenômico 5. Ecologia microbiana I. Título

Aos meus pais, irmão, minhas queridas avós e principalmente ao meu filho Luca, por todo amor, apoio, incentivo, e acima de tudo por sempre acreditarem em mim...

Dedico.

Ao meu namorado e amigos, os quais fizeram parte dessa conquista...

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Luiz Carlos Kmit, minha mãe Vania Ap. Pezzo Kmit, meu irmão Arthur H. Pezzo Kmit e ao meu filho Luca Kmit M. de Almeida Prado, pessoas com extrema importância, as quais constituem minha família estando sempre ao meu lado e acreditando em mim em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Mendes, pelos ensinamentos, orientação, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima, da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, pelos ensinamentos, contribuição e por toda orientação concedida durante a realização desse projeto.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e a Embrapa Meio Ambiente, pela qualidade de ensino e estrutura oferecida durante o desenvolvimento dos experimentos e oportunidade de realizar o doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa e suporte financeiro e a Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro (2012/03848-8).

Ao aluno Robert Cardoso pelo apoio e contribuição indispensável na etapa de análise de bioinformática e montagem dos genes.

À doutoranda Josiane Barros Chiaramonte pelos ensinamentos e atenção especial a mim concedida nas etapas de análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, Prof. Itamar Soares, Emiliana, Maíke, Josi, Stalin, Ana Paula, Liliam, Miriam, Juliana, Fábio, Danilo, Leonardo, Suiki, Wallace, Marta, Laura, João, Gustavo, Rafael, Lucas, Harold, Jorge, Erica, Andressa, Diego, pela conviência, conversas ensinamentos e por todos os ótimos momentos compartilhados ao longo desses quatro anos.

Aos técnicos de laboratório Ana Maria, João, Tatiana, Márcia, Elke, Roseli e Juliana pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Rafael Azevedo, pelo amor e amizade, pelas conversas, incentivo, compreensão e por participar de maneira afetiva das minhas conquistas

A todos aqueles que de forma direta ou indireta tenham contribuído para a realização deste trabalho.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. HIPÓTESE E OBJETIVOS	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. ASPECTOS ECOLÓGICOS DO MICROBIOMA DO RÚMEN	19
2.1. CO-EVOLUÇÃO ENTRE RUMINANTES E OS MICRORGANISMOS	21
2.2. O MICROBIOMA DO RÚMEN	23
2.3. ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA NO RÚMEN.....	25
2.4. ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE ARQUEIAS NO RÚMEN	27
2.5. O PAPEL DOS PROTOZOÁRIOS NO RÚMEN	29
2.6. O PAPEL DOS FUNGOS ANAERÓBICOS.....	30
2.7. OS BACTERIÓFAGOS PRESENTES NO RÚMEN	32
2.8. PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS DO MICROBIOMA DO RÚMEN.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	37
3.2. ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DO DNA METAGENÔMICO	39
3.3. ANOTAÇÃO TAXONÔMICA.....	39
3.4. ANOTAÇÃO FUNCIONAL E ANOTAÇÃO DE ENZIMAS ATIVAS EM CARBOIDRATO	40
3.5. MONTAGEM DOS <i>CONTIGS</i> PARA A PROSPECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL.....	41
3.6. ANOTAÇÃO E SELEÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL	42
3.7. DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES SELECIONADOS.....	42
3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. SEQUÊNCIAS OBTIDAS DO MICROBIOMA DO RÚMEN	45
4.1. COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DO RÚMEN COM BASE NO DNA METAGENÔMICO	47
4.2. FUNÇÕES DO MICROBIOMA DO RÚMEN	53
4.3. MONTAGEM <i>DE NOVO</i> DOS <i>CONTIGS</i> PARA RECUPERAÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL	62
4.4. ANOTAÇÃO DOS <i>CONTIGS</i> , SELEÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR	66
5. DISCUSSÃO.....	71
5.1. EFICIÊNCIA DO SEQUENCIAMENTO E QUALIDADE DOS DADOS.....	71
5.2. ANÁLISE TAXONÔMICA DOS DADOS DO SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO DO RÚMEN DE OVINOS	73
5.3. ANÁLISE FUNCIONAL DOS DADOS DO SEQUENCIAMENTO METAGENÔMICO DO RÚMEN DE OVINOS	77
5.4. EFEITO DA ALTERAÇÃO DA DIETA NO MICROBIOMA DO RÚMEN DE OVINOS.....	80
5.5. PROSPECÇÃO DE GENES CODIFICADORES DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA BIOMASSA VEGETAL A PARTIR DO METAGENOMA DO RÚMEN DE OVINOS.....	82
6. CONCLUSÃO	85
7. CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS.....	88

RESUMO

Metagenoma do microbioma do rúmen de ovinos e prospecção de genes degradadores de biomassa vegetal

O material lignocelulósico, presente na biomassa vegetal, representa uma importante fonte de energia, entretanto necessita da ação das enzimas lignocelulolíticas para sua degradação. A busca por novas enzimas que atuam na quebra da parede celular da planta em comunidades microbianas evoluídas naturalmente em um ambiente de degradação de biomassa como o rúmen oferece uma estratégia promissora para a prospecção de genes. Com isso, o projeto teve como objetivo a identificação de genes degradadores de biomassa vegetal em microrganismos do rúmen de ovinos usando a abordagem metagenômica. Para tanto, foram coletadas amostras da fase sólida do rúmen de 6 animais fistulados (*Ovis aries*) divididos em dois grupos e submetidos a duas dietas por 60 dias: tratamento controle e tratamento com dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. O DNA metagenômico total das amostras foi extraído e sequenciado na plataforma *MiSeq Personal Sequencer* (Illumina®). A análise dos dados para a anotação taxonômica e funcional foi realizada no software MG-RAST. A caracterização dos genes degradadores de biomassa vegetal foi feita na plataforma *CLC Genomic Workbench* v.5.5.1 (CLC Bio, Denmark) e a anotação de 4,68 gigabases de dados foi feita no banco de dados CAZy. A análise taxonômica mostrou uma predominância do domínio Bacteria compondo mais de 96% de todas as amostras, sendo os filos mais abundantes Bacteroidetes, Firmicutes, seguido de Proteobacteria. Entre todos os filos anotados, cinco tiveram a abundância aumentada no tratamento com adição de bagaço de cana-de-açúcar na dieta, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes e Verrucomicrobia, e dois filos foram mais abundantes no tratamento controle, Bacteroidetes e Synergistetes. De modo geral, a análise de ordenação não mostrou correlação entre a composição do microbioma e o tipo de dieta, porém, na análise funcional, essa correlação foi observada uma vez que houve separação entre os tratamentos. A abundância relativa das famílias de enzimas relacionadas à degradação de carboidratos segue um padrão similar em todas as amostras metagenômicas. O módulo catalítico da família de *Glycoside Hydrolases* (GH), o qual foi anotado em 129 subfamílias diferentes, foi o mais abundante em todas as amostras (45,5%), seguido da família GT (*Glicosyl Transferase*), anotada em 97 subfamílias diferentes e CBM (*Carbohydrate-Binding Module*), em 78 subfamílias. A montagem do metagenoma resultou em aproximadamente 110.000 *contigs* e possibilitou a identificação de 15 diferentes genes completos codificados nas subfamílias GH1, GH2, GH3, GH16, GH20, GH25, GH32, GH97 e GH127. A análise comparativa dos diferentes tratamentos mostrou uma maior abundância dessas enzimas no rúmen dos animais alimentados com a dieta enriquecida com bagaço de cana-de-açúcar. Em conclusão, a manipulação da dieta de ovinos por meio da substituição de parte da fração fibrosa da dieta por bagaço de cana-de-açúcar promove o enriquecimento de enzimas que degradam a biomassa vegetal no rúmen, favorecendo a prospecção e identificação de genes ativos em carboidratos.

Palavras-chave: Enzimas lignocelulolíticas; Biotecnologia; Enzimas ativas em carboidrato; Sequenciamento metagenômico; Ecologia microbiana

ABSTRACT

Metagenome of the sheep rumen microbiome and prospection of plant biomass degrading genes

The lignocellulose present in the plant biomass is a promising source of energy generation. However, the breakdown of plant biomass into simple sugars for bioethanol production is still inefficient and costly due to the recalcitrant nature of the plant fiber. The sheep rumen microbiome is specialized in degradation of plant material, but most members of this complex community are uncultured in the laboratory. Therefore, the search for new lignocellulolytic enzymes in microbial communities naturally evolved in biomass degradation environments, such as the rumen, using the exploration of the metagenome, is a promising strategy for identifying new genes. In this context, this study aimed to prospect plant biomass-degrading genes, selected from the sheep rumen microorganisms. The rumen samples were collected from 6 fistulated animals (*Ovis aries*), divided into two groups and subjected to two diets: control treatment and a treatment with a diet amended with sugarcane bagasse. The animals were fed for 60 days before sampling. To characterize the composition and functions of the rumen microbiome followed by the search of biomass-degrading genes, the metagenomic DNA was extracted from the solid contents of rumen and sequenced in MiSeq Personal Sequencer platform (Illumina®). The taxonomic and functional data were performed using MG-RAST software. For the characterization of the plant biomass degrading genes, they were analyzed on the CLC platform Genomic Workbench v.5.5.1 (CLC Bio, Denmark) and 4.68 gigabases of data was annotated against the CAZy database. The taxonomic analysis showed a predominance of the Bacteria domain composing more than 96% of all the samples, being the most abundant phyla Bacteroidetes, Firmiutes, followed by Proteobacteria. Five bacterial phyla were significantly more abundant in the treatment where sugarcane bagasse was added, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes and Verrucomicrobia, and two phyla were more abundant in the control treatment, Bacteroidetes and Synergistetes. In general, the ordination analysis did not show correlation between diet type and rumen microbiota, but in the functional analysis, this correlation was observed since there was separation between the treatments. The relative abundance of enzyme families related to carbohydrate degradation follows a similar pattern of abundance across all metagenomic samples. The catalytic module of the GH (Glycoside Hydrolases) family, which was annotated in 129 different subfamilies, was the most abundant in all samples (45.5%), followed by the GT family (Glycosyltransferase), annotated in 97 different subfamilies and CBM (Carbohydrate-Binding Module) in 78 sub-families. Metagenome assembly resulted in ~110,000 contigs enabled the retrieval of 15 complete different genes encoded in the subfamilies GH1, GH2, GH3, GH16, GH20, GH25, GH32, GH97 and GH127. A comparative analysis between the groups of animals in the different treatments showed a greater abundance of enzymes, with no metagenome of the fiber proven from the group of animals fed a diet enriched with sugarcane bagasse. These results show the sheep rumen microbiome as an untapped source of potential new fibrolytic enzymes. Using a diet amended with sugarcane bagasse increases the abundance of CAE and provide a substantially expanded catalog of genes participating in the deconstruction of plant biomass.

Keywords: Lignocellulolytic enzymes; Biotechnology; Carbohydrate-Active enzymes; Shotgun metagenomics sequencing; Microbial ecology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Compartimentos do sistema digestivo dos ruminantes (traduzido de Romagnoli <i>et al.</i> , 2017).	19
Figura 2- Influência da composição da dieta na estrutura do microbioma do rúmen (Dados obtidos de: Kim e Morrison, 2011; Jami e Mizrahi, 2012; Petri <i>et al.</i> , 2013; Jami <i>et al.</i> , 2013; Jami <i>et al.</i> 2014; Sirohi <i>et al.</i> 2012; Lima <i>et al.</i> 2014; McCann <i>et al.</i> 2014; Kumar <i>et al.</i> , 2015; Weimer, 2015; Henderson <i>et al.</i> , 2015), a qual afeta as funções microbianas e consequentemente a degradação da biomassa, resultando em liberação de metano (CH ₄) e dióxido de carbono (CO ₂) através de eructação e ácidos graxos voláteis que são absorvidos pelo epitélio (traduzido de Romagnoli <i>et al.</i> , 2017).	20
Figura 3- Composição total do microbioma do rúmen. Dados obtidos de Mann 2005; Ross <i>et al.</i> , 2013; Petri <i>et al.</i> , 2013; Jami <i>et al.</i> , 2013; Jami <i>et al.</i> , 2014; Yáñez-Ruiz <i>et al.</i> , 2015; Henderson <i>et al.</i> , 2015 (modificado de Romagnoli <i>et al.</i> , 2017).	24
Figura 4- Nichos ocupados pelos microrganismos presentes no rúmen (Traduzida de Romagnoli <i>et al.</i> , 2017).	25
Figura 5: Fluxograma metodológico do presente trabalho.	37
Figura 6 – Figura demonstrativa da posição dos <i>primer</i> internos e externos, identificação dos sítios de restrição e região codificadora do gene. As setas em vermelho indicam as posições dos <i>primers</i> externos à região codificadora do gene. As setas em amarelo indicam os <i>primers</i> internos desenhados nas regiões do start códon e do <i>stop códon</i> do gene. E a seta azul representa a região codificadora do gene assim como sua orientação.	43
Figura 7- <i>Score</i> de qualidade por posição no <i>read</i> do sequenciamento metagenômico do rúmen de ovinos, proveniente de amostras de DNA dos seis animais (3 animais alimentados com a dieta 1: IF5; IIF5 e IIIF5, 3 animais do alimentados com a dieta 2: IVF5; VF5 e VIF5) extraídos da plataforma <i>Galaxy</i>	46
Figura 8 - Curva de rarefação extraída do servidor MG-RAST, mostrando a disposição dos <i>reads</i> do sequenciamento metagenômico entre os 6 animais. Diversidade alfa calculada a partir do índice de diversidade de Shannon, sendo os animais da dieta 1, Animal I =270.60, Animal II: 270.38; Animal III: 218.80 e os animais da dieta 2, Animal IV: 286.83, Animal V: 240.58 e Animal VI: 240.58.	47
Figura 9 - Anotação taxonômica pelo MG-RAST. Os gráficos de barra apresentam as informações sobre domínios taxonômicos dos dois grupos de animais separados de acordo com a dieta oferecida (Dieta 1 contém os animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 contém os animais IV5F, V5F e VI5F) obtidas através da anotação contra o banco de dado SEED.	48
Figura 10 - Frequência relativa da estrutura da comunidade bacteriana, em nível de filo, baseada no sequenciamento metagenômico entre os seis animais alimentados com duas dietas diferentes (Dieta 1 animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 animais IV5F, V5F e VI5F) obtidas através da anotação contra o banco de dado SEED.	49

Figura 11 - Comparação da abundância relativa dos filos bacterianos entre os dois grupos de animais realizada no software STAMP. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$ (*). As barras em azul representam os animais alimentados com a Dieta1 (controle) e as barras em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar). 50

Figura 12 - Gráfico de Krona da distribuição dos domínios taxonômicos indicando a porcentagem de *reads* preditos em cada classe anotada para os animais submetidos à dieta controle, Dieta 1 (A) e à dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar, Dieta 2 (B). Os dados foram anotados contra o banco de dados SEED no MG-RAST..... 51

Figura 13 – Diferenças significativas em nível de classe na comunidade bacteriana entre os dois grupos de animais alimentados com duas dietas diferentes. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. As barras em azul representam os animais alimentados com a Dieta1 (controle) e as barras em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar). As classes Liliopsida e Aconoidasida não pertencem ao domínio Bacteria. 52

Figura 14 - Análise de Componentes Principais (PCA) da anotação taxonômica, em nível de classe, usando o banco de dados SEED pelo MG-RAST das sequências das 6 amostras do microbioma do rúmen de ovinos. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$ (*). Os pontos em azul representam os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e os pontos em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar). 53

Figura 15 - Perfil funcional do microbioma do rúmen de ovinos (SEED nível 1) predito através do MG-RAST utilizando dados do sequenciamento metagenômico total. Na denominação das amostras os números romanos I, II ou III, representam os animais conduzidos com a dieta 1 e IV, V e VI animais conduzidos com a dieta 2. 54

Figura 16 - Diferenças significantes na anotação funcional de nível 1 com base no banco de dados de subsistemas do SEED na comunidade microbiana entre os dois grupos de animais alimentados com duas dietas diferentes. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. As barras em azul representam os animais alimentados com a Dieta1 (controle) e as barras em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar). 55

Figura 17 – Análises estatísticas das categorias funcionais em nível 2 baseada nos dois grupos funcionais mais abundantes do nível 1 com base no banco de dados de subsistemas do SEED na comunidade microbiana entre os dois grupos de animais alimentados com duas dietas diferentes. (A) *Scater plot* baseado nas categorias de nível 2 provenientes do Metabolismo de proteínas. (B) *Scater plot* baseado nas categorias de nível 2 provenientes de Carboidratos. (C) Diferenças significantes na anotação funcional de nível 2 com base na categoria de Carboidratos do nível 1. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. As barras e pontos em azul representam os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e as barras e pontos em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar)..... 56

Figura 18 - Análise de Componentes Principais (PCA) das sequências das metagenômica do microbioma do rúmen de ovinos. Os dados foram anotados automaticamente utilizando o MG-

RAST e o banco de dados SEED para os níveis Funcionais. Diferentes cores representam as réplicas para cada grupo de animais nas duas dietas, sendo a cor azul representando os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e a cor laranja representando os animais alimentados com a Dieta 2 (bagaço)..... 57

Figura 19 - Abundância relativa das famílias de CAZymes nos dados do metagenoma do rúmen de ovinos em cada um dos animais. Na denominação das amostras os números romanos I, II ou III, representam os animais conduzidos com a dieta 1 e IV, V e VI animais conduzidos com a dieta 2 e as siglas significam *Glycoside Hydrolases* (GH), *Glycosyl Transferases* (GT), *Carbohydrate-Binding Modules* (CBM), *Auxiliary Activities* (AA), *Carbohydrate Esterases* (CE), *Polysaccharide Lyases* (PLs) e *S-layer homology domain* (SLH). 58

Figura 20 - Abundância de *bits* nas diferentes famílias de CAZymes entre os tratamentos Dieta 1 e Dieta 2. A significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. Siglas significam *Glycoside Hydrolases* (GH), *Glycosyl Transferases* (GT), *Carbohydrate-Binding Modules* (CBM), *Auxiliary Activities* (AA), *Carbohydrate Esterases* (CE), *Polysaccharide Lyases* (PLs) e *S-layer homology domain* (SLH). 59

Figura 21 - Análise de Componentes Principais (PCA) das sequências do microbioma do rúmen de ovinos. (A) PCA considerando o total de CAZy anotadas em cada um dos tratamentos, (B) PCA baseada anotação nas GH (*Glycoside Hydrolase*), (C) PCA baseada anotação nas CBM (*Carbohydrate-Binding Modules*), (D) PCA baseada anotação nas GT (*Glycosyl Transferases*), (E) PCA baseada anotação da soma dos demais grupos do CAZy (*Auxiliary Activities* - AA, *Carbohydrate Esterases* - CE, *Polysaccharide Lyases* - PLs e *S-layer homology domain* - SLH). Os dados foram anotados utilizando o banco de dados do CAZy. Diferentes cores representam as réplicas para cada grupo de animais nas duas dietas, sendo a cor azul representando os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e a cor laranja representando os animais alimentados com a Dieta 2 (bagaço). 60

Figura 22 - Resultados das montagens *de novo* pelos softwares CLC Genomics Workbench, SPADe e IDBA nos três principais parâmetros: total de pares de bases, N50 e o tamanho do maior *contig* montado..... 63

Figura 23 - Distribuição dos comprimentos dos *reads* resultantes dos dados do sequenciamento metagenômico pela plataforma MiSeq Illumina e inseridos no software CLC Genomics Workbench. Os gráficos A, B e C representam, respectivamente, os reads provenientes do sequenciamento metagenômico dos animais I5F, II5F E II5F do tratamento controle (Dieta 1) e os gráficos D, E e F representam, respectivamente, os reads provenientes do sequenciamento metagenômico dos animais IV5F, V5F E VI5F do tratamento acrescido de bagaço de cana-de-açúcar (Dieta 2)..... 63

Figura 24 - Sequência *contig* que contém o gene que codifica a enzima GH2 e análises da arquitetura e do domínio conservado. (A) *Contig* contendo o gene GH2, em azul está representada a região codificadora e em cinza a posição dos *primers* externos, (B) Análise do domínio conservado do gene e (C) Arquitetura do domínio conservado. 67

Figura 25 - Sequência *contig* que contém o gene que codifica a enzima GH16 e análises da arquitetura e do domínio conservado. (A) *Contig* contendo o gene GH16, em azul está representada a região codificadora e em cinza a posição dos *primers* externos, (B) Análise do domínio conservado do gene e (C) Arquitetura do domínio conservado. 68

Figura 26 - Sequência *contig* que contém o gene que codifica a enzima GH25 e análises da arquitetura e do domínio conservado. (A) *Contig* contendo o gene GH25, em azul está representada a região codificadora e em cinza a posição dos *primers* externos, (B) Análise do domínio conservado do gene e (C) Arquitetura do domínio conservado. 68

Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose a 1% da reação de amplificação dos genes selecionados. (A) *Primers* externos e internos desenhados para o gene GH2, (B) *Primers* externos e internos desenhados para o gene GH16, (C) *Primers* externos e internos desenhados para o gene GH25. A letra M representa o marcador molecular Low Mass (Invitrogen), a letra B o branco da reação. Para as reações números 1, 2 e 3 foram utilizados 5 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C respectivamente. Para as reações 4, 5 e 6 foram utilizados 10 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 7, 8 e 9 foram utilizados 20 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 10, 11 e 12 foram utilizados 5 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 13, 14 e 15 foram utilizados 10 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 16, 17 e 18 foram utilizados 20 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. As reações de 1 a 9 foram feitas com os *primers* externos e as reações de 10 a 18 com os *primers* internos. 69

Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose a 1%. (A) Amplificação do gene GH2 utilizando os *primers* externos desenhados para o gene GH2. Para as reações 1, 2 e 3 foi utilizada a temperatura de 55°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Para as reações 4, 5 e 6 foi utilizada a temperatura de 57°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Para as reações 7, 8 e 9 foi utilizada a temperatura de 59°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Para as reações 10, 11 e 12 foi utilizada a temperatura de 61°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. A letra M representa o marcador molecular, a letra B o branco da reação. (B) Amplificação dos genes selecionados utilizando os *primers* externos desenhados de acordo com a metodologia. Em todas as amplificações foi utilizada a temperatura de anelamento em 55°C. Nas reações 1, 2 e 3 foi feita a tentativa de amplificação do gene GH2 utilizando as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Nas reações 4, 5 e 6 foi feita a tentativa de amplificação do gene GH16 utilizando as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Nas reações 7, 8 e 9 foi feita a tentativa de amplificação do gene GH25 utilizando as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. A letra M representa o marcador molecular Low Mass (Invitrogen), a letra B o branco da reação. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos animais utilizados no experimento, com data de nascimento e tipo de dieta oferecida.....	38
Tabela 2 – Iniciadores desenhados e utilizados na amplificação em cada um dos genes selecionados.....	42
Tabela 3 - Resumo das sequências obtidas após filtro de qualidade e anotação realizada no servidor MG-RAST.....	45
Tabela 4 – Análise comparativa das principais famílias de GH, as quais participam da desconstrução da parede celular das plantas, identificadas no metagenoma do rúmen de ovinos com outros metagenomas de herbívoros.....	61
Tabela 5 - Resultado das montagens <i>de novo</i> pelo software CLC Genomics Workbench utilizando os parâmetros pré-definidos de <i>Quality Score</i> 0.025 e teste de diferentes <i>Word Size</i> 31, 41, 51, 61 30, 40, 50 e 60. As combinações que resultaram em uma melhor montagem estão indicadas na tabela em cinza.....	65
Tabela 6 - Resumo das sequências após a montagem dos <i>contigs</i> com o valor de <i>Word size</i> em 31 para anotação funcional no software CLC Genomics Workbench.....	65
Tabela 7 - Lista de enzimas lignocelulolíticas completas recuperadas a partir das montagens dos <i>contigs</i> . As análises de similaridade e identidade foram realizadas com a ferramenta BlastP no NCBI.....	66

1. INTRODUÇÃO

O abundante material lignocelulósico representa uma fonte alternativa promissora de geração de energia, pela característica de ser uma fonte renovável não poluente, com isso a busca por esse tipo de fonte energética tem aumentado cada vez mais, tendo em vista, principalmente os problemas de mudanças climáticas no planeta, a insegurança energética e o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis (Yue *et al.*, 2012; Thankoses *et al.*, 2003; Rubin, 2008).

Ainda que a engenharia genética tenha buscado solucionar esse problema através da síntese de novas enzimas lignocelulósicas, a baixa eficiência catalítica dessas enzimas ainda é um fator limitante para a degradação desses compostos. Uma das possíveis razões para o sucesso limitado de engenharia de proteínas deve-se ao fato de que as enzimas utilizadas como modelos foram obtidas a partir de microrganismos cultiváveis (Wen *et al.*, 2009). Os microrganismos cultivados representam, em média, menos de 1% da diversidade genética encontrada na natureza (Amann *et al.*, 1995). Assim, para superar essa limitação imposta por técnicas microbiológicas tradicionais, novas estratégias, como metagenômica, podem ser empregadas (Handelsman, 2004).

O sucesso de proteínas engenheiradas para o aumento do desempenho de enzimas degradadoras de lignocelulose existentes tem sido limitado (Wen *et al.*, 2009), porém, de acordo com Rubin (2008) a recuperação de enzimas a partir de comunidades microbianas naturalmente selecionadas em ambiente de degradação de biomassa, oferece uma estratégia promissora para a identificação de novas enzimas lignocelulósicas com potencial de melhor atividade.

A análise direta de DNA de amostras metagenômicas representa uma estratégia para a descoberta de diversas enzimas codificadas na natureza (Ferrer *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). A abordagem metagenômica foi utilizada com sucesso na descoberta de genes envolvidos na degradação de biomassa na comunidade microbiana associada ao rúmen de bovino (Hess *et al.*, 2011) e representa uma fonte inesgotável para a descoberta de novos genes e enzimas para serem utilizados na degradação de biomassa para a produção de biocombustíveis.

A metagenômica tem provado ser uma poderosa ferramenta para a prospecção de novas biomoléculas (Simon e 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.

A estratégia apresentada neste projeto ataca diretamente a necessidade do entendimento dos processos de degradação de biomassa em ambientes naturalmente enriquecidos com microrganismos lignocelulolíticos, de maneira a aumentar o potencial de prospecção de enzimas para possível aplicação biotecnológica. Adicionalmente, a comparação dos microbiomas de

animais conduzidos sob duas dietas, isto é, uma dieta enriquecida com bagaço de cana-de-açúcar e uma dieta controle, irá permitir avaliar se essa alteração é capaz de estruturar a comunidade microbiana de forma a favorecer a abundância de microrganismos que atuam na degradação do bagaço de cana-de-açúcar, assim como na abundância de enzimas fibrolíticas.

Este trabalho empregou abordagens independentes de cultivo para analisar o metagenoma do rúmen, um ambiente naturalmente enriquecido utilizado tanto para um enfoque biotecnológico como ecológico. A primeira abordagem foi analisar a composição taxonômica do microbioma do rúmen dos animais submetidos a duas dietas diferentes por meio dos dados metagenômicos. Posteriormente, para a prospecção de genes codificadores de proteínas relacionadas à degradação da biomassa vegetal, foram utilizadas diferentes estratégias para a anotação funcional de genes a partir dos dados metagenômicos. Duas estratégias foram empregadas para anotação dos genes de interesse, na primeira estratégia foi realizada a anotação baseada nos *reads* provenientes do sequenciamento para análise da abundância e enriquecimento nos diferentes tratamentos, e na segunda estratégia, foi realizada exploração dos dados para busca dos genes completos codificadores de proteínas fibrolíticas de interesse no trabalho. Na segunda estratégia foi desenvolvida uma metodologia para a montagem dos *contigs* possibilitando a anotação e seleção dos genes completos. Assim, esta tese apresenta os resultados da análise taxonômica, bem como da análise funcional, e os resultados da busca por genes completos codificadores de proteínas relacionadas à degradação da biomassa vegetal, em seguida a descrição dos resultados são discutidos e finalmente são apresentadas as conclusões do trabalho.

1.1. Hipótese e Objetivos

Neste estudo, testamos a hipótese de que a substituição parcial de 12% da porção volumosa na dieta de ovinos por bagaço de cana-de-açúcar altera a composição do microbioma do rúmen de *Ovis aries* e conduz ao enriquecimento de genes que codificam proteínas fibrolíticas as quais atuam na degradação da biomassa vegetal.

O objetivo geral no presente estudo foi explorar a ocorrência de genes que codificam proteínas fibrolíticas a partir do sequenciamento metagenômico do microbioma da parte sólida do rúmen de seis ovinos da raça *Santa Inês* conduzidos com duas diferentes dietas, uma dieta controle ofertada a três animais e uma dieta suplementada com bagaço de cana-de-açúcar na porção volumosa ofertada a outros três animais, ambas por 60 dias. Para alcançar o objetivo geral, o projeto seguiu os seguintes objetivos específicos.

- I. Sequenciar o DNA metagenômico da fase sólida do conteúdo ruminal de três animais alimentados com uma dieta suplementada com bagaço de cana-de açúcar e de três animais alimentados com uma dieta controle.
- II. Analisar a taxonomia e função a partir dos resultados do sequenciamento metagenômico do microbioma da parte sólida do rúmen.
- III. Montar, anotar e selecionar genes codificantes de enzimas fibrolíticas, a partir dos resultados do sequenciamento metagenômico do microbioma.
- IV. Desenhar primers específicos para recuperar e amplificar os genes selecionados completos codificantes de enzimas fibrolíticas provenientes da montagem realizada a partir dos dados do sequenciamento do metagenoma.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tradução do capítulo de livro (Romagnoli E.M., Kmit M.C.P., Chiamonte J.B., Rossmann M., Mendes R.. Ecological Aspects on Rumen Microbiome. *In* Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. 1ed. Springer International Publishing 2017, p. 367-389).

2.1. Aspectos ecológicos do microbioma do rúmen

Os ruminantes são mamíferos herbívoros ungulados pertencentes a ordem *Artiodactyla*, que obtêm seus alimentos por pastoreio de material vegetal (Hackmann e Spain, 2010). Esses animais se distinguem de outros mamíferos, pois possuem peculiaridades para a mastigação do alimento, em um processo chamado ruminação (Hungate, 1966). O estômago dos ruminantes é dividido em quatro compartimentos: abomaso, omaso, rúmen e retículo. Em animais adultos, a proporção média em tamanho desses compartimentos do estômago complexo é de cerca de, respectivamente, 8%, 7%, 80% e 5% (Figura 1). O abomaso tem como principal função secretar enzimas e fluidos gástricos (Hodgson, 1971; Mcleay e Titcheng, 1975). Este compartimento é comparável ao verdadeiro estômago em animais não ruminantes. O rúmen e o retículo ocupam a maior parte do lado esquerdo do abdômen (Balch, 1950). Durante a ruminação, há uma ligeira tendência das porções de concentrados e succulentos da dieta passar pelo rúmen mais rapidamente do que a porção de volumoso. Quando o alimento retorna ao rúmen após ruminação, a redução no tamanho de partícula alcançada durante a mastigação determinará se qualquer partícula prossegue para o omasum ou se será ruminada novamente (Balch, 1950). Sendo uma cavidade que apresenta características peculiares, o rúmen é uma câmara de fermentação anaeróbia, com um pH entre 5,5 e 6,9, e temperatura $\sim 38-40^{\circ}\text{C}$ (Hungate, 1966; Church, 1969; Clarke, 1977; Dehority, 2003).

Figura 1- Compartimentos do sistema digestivo dos ruminantes (traduzido de Romagnoli *et al.*, 2017).

Este órgão do sistema digestivo dos ruminantes abriga uma riqueza e diversidade da comunidade microbiana responsável pela degradação de proteínas (Brooks *et al.*, 2012), lipídeos (Kim *et al.*, 2009), amido (Offner *et al.*, 2003), celulose, lignina e hemicelulose (Koike e Kobaiashi, 2009), possuindo um enorme espaço que contém material digerido e parcialmente digerido proveniente de alimentação dos animais. Durante a primeira etapa da digestão o alimento é engolido e repetidamente regurgitado (Hungate, 1966). A mastigação mecânica e a reação enzimática proveniente das enzimas secretadas pelo animal são responsáveis pela quebra de grandes moléculas aumentando a superfície de contato na fibra e aderência de microrganismos. A digestão é influenciada por vários fatores, como o tempo de retenção de alimento no rúmen, mastigação e mistura de saliva, índice de fluxo de digestão para o omasum e parte inferior do trato digestivo, ação da saliva e pela taxa de remoção de metabólitos, como ácidos graxos voláteis, amônia, dióxido de carbono e metano. Todos os ácidos graxos voláteis são absorvidos pela superfície do epitélio (Figura 2), principalmente por difusão (Storm *et al.*, 2012) e os gases CO₂ e CH₄ são removidos durante a eructação através da boca e nariz (Figura 2) (Hungate, 1966).

Figura 2- Influência da composição da dieta na estrutura do microbioma do rúmen (Dados obtidos de: Kim e Morrison, 2011; Jami e Mizrahi, 2012; Petri *et al.*, 2013; Jami *et al.*, 2013; Jami *et al.* 2014; Sirohi *et al.* 2012; Lima *et al.* 2014; McCann *et al.* 2014; Kumar *et al.*, 2015; Weimer, 2015; Henderson *et al.*, 2015), a qual afeta as funções microbianas e consequentemente a degradação da biomassa, resultando em liberação de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) através de eructação e ácidos graxos voláteis que são absorvidos pelo epitélio (traduzido de Romagnoli *et al.*, 2017).

Hofman (1978) afirma que os ruminantes alcançaram altos níveis de eficiência digestiva em cada estágio evolutivo. Com base em estudos morfológicos comparativos do sistema digestivo de vários ruminantes, esses animais são classificados de acordo com seu comportamento alimentar em três grupos: seletores, oportunistas e animais com uma alimentação mista. Recentemente, os seletores foram divididos em "ramoneadores" que preferem comer brotos e folhas e "frugívoros" que preferem comer frutas (ambos normalmente de arbustos e árvores); os oportunistas ou "pastejadores" são preferencialmente comedores de gramíneas e forrageiras e animais com alimentação mista que alternam entre os seletores e oportunistas, geralmente dependendo da disponibilidade sazonal (Hackmann e Spain, 2010). Dependendo da dieta, os ruminantes evoluíram diferentes peculiaridades para digestão, o que pode causar uma seleção nos microrganismos associados no rúmen (Hofman, 1989). Além dos diferentes comportamentos alimentares, observou-se a variação da composição da comunidade bacteriana do rúmen em animais de diferentes regiões, provavelmente causada por diferenças na dieta, clima e práticas agrícolas (Henderson *et al.*, 2015). Recentemente, um *core* do microbioma bacteriano foi identificado por Henderson e colaboradores (2015), onde *Prevotella*, *Butyrivibrio* e *Ruminococcus*, bem como bactérias não classificadas pertencentes às famílias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales* e *Clostridiales* estão presentes em uma grande seleção de ruminantes, embora em diferentes abundâncias de acordo com as espécies animais. Essas diferenças de abundância de acordo com a espécie animal podem ter ocorrido devido à co-evolução de ruminantes e seus microrganismos associados.

2.1. Co-evolução entre ruminantes e os microrganismos

Uma das características mais interessantes do sistema digestivo dos animais ruminantes é a relação simbiótica entre o animal e os microrganismos que vivem no trato digestivo. Isso inclui microrganismos transitórios e autóctones que se desenvolvem em populações relativamente estáveis, características de cada espécie (Dubos, 1966). Nesta interação, as enzimas (produtos de genes) produzidas pelos microrganismos ruminais assumem tarefas que não são desenvolvidas pelo genoma do habitat, como a degradação de componentes nutricionais, por exemplo, celulose, ampliando o espectro de funções e capacidades metabólicas do hospedeiro. Por outro lado, o ambiente do rúmen proporciona condições de crescimento adequadas para o desenvolvimento de microrganismos ali presentes (Rosenberg *et al.*, 2010).

Acredita-se que a interação entre ruminantes e microrganismos teve origem cerca de 36 milhões de anos atrás, no Eoceno, segunda fase do período de Paleogene. A interação ocorreu

com os microrganismos que afetam a evolução dos ruminantes e os ruminantes que afetam a evolução das espécies microbianas protegidas por eles, gerando, posteriormente, uma relação de interdependência (Troyer, 1984). Este processo, chamado coevolução, é definido como "[...] o processo de mudança evolutiva recíproca que ocorre entre pares de espécies ou entre grupos de espécies à medida que interagem uns com os outros. A atividade de cada espécie que participa na interação aplica pressão de seleção aos outros." (Rafferty e Thompson, 2016).

Durante o Eoceno, o clima na América do Norte e na Eurásia era úmido e tropical. Os proto-ruminantes tinham uma dieta consistindo de baixo teor de celulose, com base em estruturas de plantas ainda nos estágios iniciais do crescimento. No entanto, com o início do Oligoceno, terceira fase do Paleogene, o clima começou a ficar mais frio e seco e o desenvolvimento das plantas mais sazonais, assim, os animais começaram a consumir uma dieta rica em fibra durante alguns períodos do ano (Janis, 1976). Como os ruminantes são incapazes de sintetizar enzimas celulolíticas para degradar e desfrutar da nova dieta rica em fibras, ocorreu uma evolução em seus sistemas digestivos, com o surgimento de locais de fermentação e estabelecimento de relações simbióticas com microrganismos produtores de celulasas (Janis, 1976). Ao longo do processo evolutivo, os ruminantes desenvolveram uma enorme câmara de fermentação, o rúmen, o que lhes deu vantagens, como uma maior utilização da ação microbiana na parte fibrosa da dieta à medida que o rúmen é localizado antes da digestão química. Outra vantagem é a não necessidade de digerir os alimentos no lugar do consumo, evitando a exposição excessiva aos predadores (Janis, 1976; Alexander, 2009).

Considerando que, as mudanças climáticas durante esse período ocorreram gradualmente, bem como mudanças no sistema digestivo, durante um longo período, grande parte do volume de alimentos consumidos pelos animais não foi bem utilizado, exigindo assim a ingestão de grandes volumes da dieta. Além disso, com o clima de refrigeração contínua, os animais precisavam armazenar mais gorduras para melhor conservar o calor do corpo. Assim, também houve neste momento uma forte pressão seletiva para o aumento do tamanho animal (Janis, 1976). O aumento do tamanho do corpo, dieta fibrosa e clima mais seco também levaram a uma maior necessidade de reciclar nitrogênio, que se tornou cada vez mais escasso e indisponível. A presença de microrganismos capazes de quebrar ureia e incorporar na sua biomassa permitiu a incorporação de nitrogênio nesta forma através da assimilação da proteína microbiana pelo animal. Na reciclagem mais eficiente do nitrogênio, a coevolução dos ruminantes com este grupo de microrganismos permitiu a redução da perda de água, uma vez que a ureia é excretada através da urina (Janis, 1976). Acredita-se que esses fatores levaram lentamente ao início da colonização microbiana em animais, induzindo lentamente a formação de uma câmara

com condições ideais para a realização da atividade microbiana, como o pH perto da neutralidade. O aumento gradual do conteúdo de fibras da dieta poderia ter levado a uma seleção concomitante de microrganismos celulolíticos e produtores de urease e, pouco a pouco, o rúmen estava emergindo como é conhecido hoje, adaptado às exigências dos ciclos de Carbono e de Nitrogênio (Janis, 1976).

Como os constituintes das plantas da dieta dos proto-ruminantes durante o Eoceno apresentavam alta quantidade de substâncias tóxicas, alguns autores, como Foose (1974), acreditam que o crescimento e a divisão do estômago dos ruminantes foram devido à pressão de seleção sobre a necessidade da presença de bactérias desintoxicantes no sistema digestivo de animais. Após a evolução, algumas espécies foram mais eficientes em determinadas vias metabólicas, perdendo características que não eram mais necessárias, como a tolerância ao O₂, desenvolvendo um intrincado sistema de alimentação cruzada e metabolismo especializado neste ecossistema, criando interdependência entre espécies microbianas e entre a comunidade microbiana e o hospedeiro (Hungate, 1966).

2.2. O microbioma do rúmen

Os ruminantes e seus microbiomas evoluíram de forma conjunta ao longo de milhões de anos, tornando-se animais altamente adaptáveis às diferentes dietas devido à plasticidade funcional das comunidades microbianas ruminais (Morgavi *et al.*, 2013). No entanto, muitos outros fatores podem influenciar a comunidade microbiana do rúmen, incluindo a idade animal (Fonty *et al.*, 1987; Fonty *et al.*, 2007), uso de antibióticos (Kleen *et al.*, 2003), saúde do hospedeiro (Kleen *et al.*, 2003; Rustomo *et al.* 2006a), localização geográfica (Sundset *et al.*, 2007), estação do ano (Orpin *et al.*, 1985; Crater *et al.*, 2007), fotoperíodo (McEwan *et al.*, 2005), nível de estresse (Uyeno *et al.*, 2010), ambiente em que vive (Romero-Pérez *et al.*, 2011) e regime alimentar (Rustomo *et al.*, 2006b). Além disso, as espécies microbianas e suas atividades também foram mostradas como sendo afetadas pelos níveis de ingestão alimentar (Crater *et al.*, 2007) e frequência de alimentação (Pulido *et al.*, 2009), sugerindo que é possível manipular a composição da comunidade de microrganismo do rúmen pelo manejo da dieta (Crater *et al.*, 2007; Pulido *et al.*, 2009).

O microbioma do rúmen compreende uma diversa comunidade simbiótica de bactérias anaeróbicas, arqueias, protozoários, bacteriófagos e fungos (Figura 3) (Krause e Russel, 1996), no entanto, os grupos mais importantes são as bactérias e protozoários que juntos representam mais de 90% da biomassa microbiana, mas apenas 8% destes microrganismos foram isolados (Weimer,

2015). Os microrganismos simbióticos presentes no rúmen produzem um arsenal de enzimas que desconstroem os polissacarídeos vegetais fornecendo nutrientes essenciais ao hospedeiro, desintoxicam moléculas prejudiciais, como ureia, H_2 , CO_2 e CH_4 (Krause *et al.*, 2003) e protege o hospedeiro contra patógenos invasores e parasitas, modulando assim, o desenvolvimento e imunidade do animal (Hooper *et al.*, 2012).

Figura 3- Composição total do microbioma do rúmen. Dados obtidos de Mann 2005; Ross *et al.*, 2013; Petri *et al.*, 2013; Jami *et al.*, 2013; Jami *et al.*, 2014; Yáñez-Ruiz *et al.*, 2015; Henderson *et al.*, 2015 (modificado de Romagnoli *et al.*, 2017).

Os microrganismos presentes no rúmen podem ser subdivididos em quatro subpopulações principais: i) populações associadas a líquidos, que são compostas por microrganismos planctônicos presentes no líquido do rúmen, incluindo os que se destacam das partículas de alimentação e aqueles que consomem componentes do alimento solúveis no líquido do rúmen (McAllister *et al.*, 1994), ii) populações associadas à parte sólida, que incluem microrganismos que se aderem vagamente ou fortemente às partículas de alimento que são fundamentais na digestão (McAllister *et al.*, 1994) e que representam até 75% da população total de microrganismos do rúmen (Koike *et al.*, 2003), iii) populações associadas ao epitélio, que se ligam ao epitélio do rúmen, representando apenas 1% das populações do rúmen (Czerkawski, 1986), porém, são mais diversas (Malmuthuge *et al.*, 2012) e consideradas mais intimamente relacionadas com a atividade metabólica do hospedeiro quando comparada com as demais subpopulações (Wallace *et al.*, 1979); e iv) populações associadas aos microrganismos eucariontes, representadas pelas bactérias e arqueias anexadas à superfície de protozoários ou esporângios fúngicos (Figura 4) (Miron *et al.*, 2001).

Figura 4- Nichos ocupados pelos microrganismos presentes no rúmen (Traduzida de Romagnoli *et al.*, 2017).

2.3. Estrutura da comunidade bacteriana no rúmen

As bactérias são capazes de colonizar o rúmen logo após o nascimento do animal contribuindo para o metabolismo de carboidratos através da fermentação. Esse ambiente abriga uma comunidade bacteriana composta por mais de 200 espécies (McSweeney *et al.*, 2005) e com uma densidade tão alta como 10^{11} células por grama de conteúdo ruminal medido por contagem direta (Mackie *et al.*, 2000).

A comunidade bacteriana do rúmen é composta quase estritamente por indivíduos anaeróbios, porém apresenta algumas espécies bacterianas anaeróbicas facultativas, as quais também podem auxiliar a manutenção das condições anaeróbicas do ambiente. As análises filogenéticas revelaram um microbioma central, dominado pelas bactérias pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes (Figura 2), que estão presentes em todos os ruminantes em uma ampla gama geográfica, mas com grande variação entre os animais individuais, quando se trata da abundância relativa dos diferentes *taxa* (Henderson *et al.*, 2015).

O sequenciamento do gene bacteriano 16S do rRNA mostrou que, independentemente do tipo de dieta, espécie ou idade, os filos Bacteroidetes e Firmicutes podem representar aproximadamente 80% da população bacteriana em ruminantes (de Menezes *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 2013; Mohammed *et al.*, 2014). No entanto, os filos Proteobacteria, Fibrobacter, Verrucomicrobia, Tenericutes e Spirochaetes estão presentes em menor quantidade (de Menezes *et al.*, 2011). Os membros do filo Bacteroidetes são habilidosos na degradação de polissacarídeos complexos, incluindo amido, xilano, pectina, galactomanano e arabinogalactano (Martens *et al.*, 2011). O gênero *Prevotella*, pertencente ao a esse filo, é o mais abundante no rúmen em várias condições alimentares (Stevenson e Weimer, 2007; Pitta *et al.*, 2010), participando da fermentação de polissacarídeos estruturais (Matsui *et al.*, 2000). As espécies desse gênero são encontradas tanto

nas frações fibrosas (Koike e Kobayashi, 2009) como no líquido (Pitta *et al.*, 2010) do rúmen. Ramsak e colaboradores (2000) mostraram que *Prevotella* possui divergências genéticas altamente variadas e propôs que este gênero em particular também apresenta uma ampla versatilidade funcional. O filo Firmicutes possui espécies que podem usar amido, xilano, celulose, hemicelulose e galactomanano como fonte de energia (Dassa *et al.*, 2014). Os gêneros *Ruminococcus*, *Clostridium* e *Butyrivibrio*, pertencentes ao filo Firmicutes, tem espécies bacterianas com diferentes mecanismos de adesão e de ataque da fibra ruminal (Kim *et al.*, 2011; Morrison e Miron, 2000). Em particular, gênero de *Ruminococcus*, que representa aproximadamente 10% da população bacteriana (Palmonari *et al.*, 2010).

As bactérias no rúmen também são classificadas de acordo com a sua atividade metabólica como: fibrolítica (por exemplo, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* e *Butyrivibrio fibrisolvens*), amilolítica (por exemplo, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*), proteolítica (por exemplo, *Prevotella spp.*), lipolítica (por exemplo, *Anaerovibrio lipolytica*), produtoras de lactato (por exemplo, *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*) e consumidoras de lactato (por exemplo, *Megasphaera elsdenii*) (Hungate, 1966; McCann *et al.*, 2014). O isolamento de microrganismos provenientes do rúmen, principalmente de bactérias, foi descrito há mais de 50 anos (Bryant *et al.*, 1958; Hungate, 1966). As bactérias do rúmen mais estudadas são *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens* e *Eubacterium ruminantium* (Stewart *et al.*, 1997). Essas bactérias são caracterizadas como fibrolíticas, ou seja, que participam da despolimerização da parede celular da planta (Koike e Kobayashi, 2001). Lopes (2015) descreveu a composição da comunidade bacteriana no rúmen das ovelhas (*Ovis aries*) usando sequenciamento de genes de 16S do rRNA e revelou que a comunidade bacteriana estava dominada pela família Prevotellaceae, com mais de 30% do total das sequências de genes de 16S do rRNA classificadas.

Streptococcus bovis são bactérias esféricas gram-positivas, que têm seu crescimento de forma explosiva quando grandes quantidades de amido ou açúcares estão presentes na dieta. Essa bactéria também é capaz de produzir grandes quantidades de ácido láctico e polissacarídeo capsular causando ruminal inchaço agudo (Russell e Rychilik, 2001). Por outro lado, *Megasphaera elsdenii* utiliza o ácido láctico em seu crescimento, o que ajuda a limpar e elevar o pH do rúmen, sustentando o crescimento dos microrganismos digestores de fibras que são intolerantes aos ácidos (Kung e Hession, 1995). Outras bactérias presentes no rúmen também utilizam ácidos como fonte de energia, como por exemplo, a *Selenomonas ruminantium* que utiliza o ácido tânico como uma única fonte de energia. Essa bactéria foi isolada a partir de amostras fecais de cabras que se alimentam de espécies de acácia com alto conteúdo de taninos (Skene e Brooker, 1995).

2.4. Estrutura da comunidade de Arqueias no rúmen

Os microrganismos metanogênicos, inicialmente, foram agrupados com o domínio das Bactérias, porém com os estudos baseados na estrutura peculiar da parede celular e na sequência do gene 16S proveniente de amostras de rRNA; a classificação foi alterada criando um domínio separado denominado *Archaea* (Woese e Fox, 1977), mesmo que bactérias e arqueias compartilhem os mesmos ancestrais. Com isso, Woese e colaboradores (1990) sugeriram um sistema de classificação composto por três grandes domínios: *Eucaria*, composto por todos os seres eucariontes, *Bacteria* e *Archaea*. As arqueias são encontradas em muitos habitats diferentes (Liu e Whitman, 2008) e abriga táxons conhecidos de metanogênicos, que são uma parte essencial do microbioma do rúmen, pois mantêm uma baixa pressão de H₂ nesse ambiente (Janssen e Kirs, 2008).

Os microrganismos metanogênicos podem ser detectados no rúmen de ovino 17 horas após o nascimento (Gagen *et al.*, 2012) e são a parte essencial do microbioma do rúmen, por manterem a fermentação do ambiente em um estado estável. Isso ocorre porque durante o processo de fermentação de monossacarídeos, é gerado uma grande quantidade de hidrogênio que é usado pelos metanogênicos para a produção de metano no rúmen (Janssen e Kirs, 2008). A abundância de espécies metanogênicas no rúmen depende do gene alvo estudado (*rrs* ou *mcrA*), entretanto os resultados do qPCR relatam valores entre 10⁷-10⁸ o número de cópias por grama de conteúdo ruminal (Mosoni *et al.*, 2011).

As arqueias metanogênicas são divididas em três grupos diferentes em função da sua afinidade por substrato e magnitude de produção de metano: i) hidrogenotróficas (*Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* e *Methanobacterium spp.*), que convertem hidrogênio e/ou formiato em CH₄, ii) metilotróficas (*Methanosphaera spp.* e membros da ordem *Methanomassiliicoccales*), que produzem CH₄ a partir de compostos de metila, tais como metanol e metilaminas, e iii) metanogênicos acetoclásticos (*Methanosarcina*), que podem utilizar o acetato para produzir CH₄, além dos caminhos hidrogenotróficos e metilotróficos (Janssen e Kirs, 2008). Atualmente, as sequências do genoma estão disponíveis para quatro metanogênicos do rúmen, incluindo cepas de *Methanobrevibacter ruminantium* (Leahy *et al.*, 2010), *Methanobrevibacter boviskoreani* (Lee *et al.* 2013; Leahy *et al.*, 2013), *Methanobacterium formicicum* (Kelly *et al.*, 2014) e *Methanosarcina barberi* (Lambie *et al.*, 2015).

Sendo *Methanobrevibacter spp.* considerados os metanogênicos dominantes no rúmen (Janssen e Kirs, 2008). Com relação ao comportamento de vida das arqueias, foram observados que o gênero *Methanobrevibacter* era predominante em metanogênicos associados a protozoários, enquanto o gênero *Methanomicrobium* era predominante em metanogênicos de vida livre

(Tymensen *et al.*, 2012; Janssen e Kirs, 2008). Janssen e Kirs (2008) revisaram dados globais, e descreveram que de arqueias metanogênicas encontradas em rúmen podem ser classificadas em três gêneros: *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* e um grupo de arqueias do rúmen não cultivadas afiliadas a ordem Thermoplasmatales.

Esses microrganismos podem estar intimamente associados com protozoários, numa relação de espécies interespecíficas, e alguns podem ser de vida livre. A estrutura da comunidade de metanogênicos tanto de vida livre como associados a protozoários foram analisados usando genes de 16S proveniente de amostras de rRNA e genes de Metil coenzima M Redutase (*mcrA*) (Tymensen *et al.*, 2012). Ambos os grupos apresentaram microrganismos dos gêneros *Methanobrevibacter* e *Methanomicrobium* e cluster C ruminal (RCC), que está distantemente relacionado à ordem Thermoplasmatales.

A associação de metanogênicos com fungos anaeróbicos foi estabelecida recentemente utilizando um fungo coletado do rúmen da cabra e subcultivado para obter colônias uniformes (Jin *et al.*, 2014). Os mesmos autores usaram o gene *mcrA* para confirmar metanogênicos encontrados em culturas fúngicas e foram classificados como membros de um novo cluster RCC. O fungo associado às metanogênicas foi identificado como *Candidatus Methanomethylophilus alvus*, que representa uma parte muito pequena do cluster RCC, que está distantemente relacionado à Thermoplasmatales e foi classificado em uma nova ordem Methanoplasmatales (Paul *et al.*, 2012). Poulsen e colaboradores (2013) observaram que os Termoplasmatas são pouco caracterizados no rúmen bovino. Os mesmos autores sugeriram que esses metanogênicos metilotróficos podem reduzir a emissão de metano em vacas em lactação.

As arqueias metanogênicas presentes no rúmen utilizam o H_2 e o CO_2 produzidos pelos protozoários, fungos e bactérias a partir do catabolismo das hexoses para produzir CH_4 e gerar ATP (Albers *et al.*, 2007; Ferry e Kstead, 2007), o que beneficia os doadores, atuando como coletor de elétrons e minimizando a pressão parcial de H_2 (Wolin e Miller, 1988; Lange *et al.*, 2005) dentro do rúmen. Estes microrganismos são encontrados no líquido, aderidos à fibra do rúmen, nos protozoários e no epitélio do rúmen. A taxa de crescimento das comunidades de arqueias metanogênicas varia de acordo com as frações do rúmen, animal e a taxa de passagem através do sistema (Janssen e Kirs, 2008). A seleção adequada de carboidratos na dieta ou ração e na proporção de carboidratos não fibrosos ou estruturais pode ajudar a reduzir o dióxido de carbono e o hidrogênio, que são os principais precursores da produção de metano no rúmen (Mitsumori e Sun, 2008).

Os microrganismos metanogênicos, como dito anteriormente, são encontrados em associação com bactérias (Wolin e Miller, 1988) e protozoários do rúmen (Lange *et al.*, 2005). O

estabelecimento e manutenção de uma população estável de metanogênicas é, principalmente, afetado pelo tipo de dieta, nível e frequência de alimentação (Kumar *et al.*, 2012; Kumar *et al.* 2013a; Kumar *et al.*, 2013b; Sirohi *et al.* 2013a, Thiele *et al.*, 1988). Sendo a relação simbiótica entre metanogênicos e protozoários ciliados podendo gerar até 37% da emissão total de CH₄ no rúmen (Finlay *et al.*, 1994), porém as emissões de metano podem variar de acordo com o hospedeiro e dieta como já citado anteriormente. Singhal e colaboradores (2005) observaram que a contribuição do gado cruzado, bovinos indígenas, búfalos, caprinos e ovinos na emissão de metano através de fermentação entérica eram diferentes de acordo com as espécies hospedeiras. Kempton (1976) relata que os Cangurus cinzentos emitiam menos metano do que as ovelhas que estavam sendo mantidos sob a mesma dieta. Esta baixa emissão de metano também foi observada em camelos quando comparados com gado (Pinares-Patino *et al.*, 2003, Dittmann *et al.*, 2014).

As arqueias metanogênicas são um grupo único de microrganismos que produzem metano como um produto estequiométrico final no seu metabolismo (Janssen e Kirs, 2008). Embora a produção de metano entérico contribua para a produção de emissões de gases de efeito estufa (GEE), a produção também leva a uma perda de 2 a 12% de energia em ruminantes domésticos (Johnson e Johnson, 1995), e a diminuição das emissões de metano pelo gado tem se tornado uma prioridade e parte integrante das políticas de controle climático (Thorpe, 2008).

2.5. O papel dos Protozoários no rúmen

Os protozoários ingerem bactérias, se alimentam de partículas e digerem carboidratos, proteínas e gorduras (Williams e Coleman, 1992). Dois grupos de protozoários, pertencentes às ordens, holotrich e entodiniomorphida, foram estudados dentro do rúmen, sendo identificados morfologicamente utilizando a microscopia óptica que tem sido aplicada para estudar espécies ciliadas no rúmen (Williams e Coleman, 1992; Imai, 1998).

O gênero *Entodinium* é o mais representativo e abundante dos protozoários no rúmen e está relacionado com o controle de populações bacterianas (Nagaraja *et al.*, 1992), ajudando a manter o pH do rúmen (Dehority, 2005). Os protozoários se alimentam de carboidratos e celulose (Findley *et al.*, 2011) e consequentemente, liberam H₂ no ecossistema, que é usado por microrganismos metanogênicos (Skillman *et al.*, 2006; Tymensen *et al.*, 2012). Vários estudos acessaram a diversidade de protozoários no rúmen através de técnicas moleculares, criando *primers* específicos para este grupo (Skillman *et al.*, 2006; Tymensen *et al.*, 2012). Sylvester e colaboradores (2004) observaram que a dieta afeta diretamente a diversidade de protozoários no

rúmen e no duodeno identificando as espécies predominantes como *Epidinium caudatum*, *Entodinium caudatum* e *Isotricha prostoma*. Outros gêneros de protozoários presentes no rúmen são *Dasytricha*, *Ostracodinium*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Eudiplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex* e *Polyplastron*.

Estes organismos ciliados desempenham um papel importante na digestão das fibras e na modulação dos perfis de fermentação. Os protozoários do rúmen produzem produtos finais de fermentação semelhantes às bactérias, particularmente acetato, butirato e H₂. Eles utilizam grandes quantidades de amido e ao mesmo tempo podem armazená-lo em seus corpos (Williams e Coleman, 1992). Este engolfamento ajuda a retardar a fermentação bacteriana e a produção de ácidos que diminuem o pH, beneficiando o rúmen (Mackie *et al.*, 1978). Outra estratégia de controle do pH nesse ecossistema são arqueias metanogênicas no rúmen que se ligam e vivem na superfície dos protozoários acessando imediatamente o H₂ liberado pelos protozoários no processo de fermentação (Williams e Coleman, 1992).

Os protozoários do rúmen se multiplicam lentamente, acima de 15-24 horas, quando comparados às bactérias que podem levar menos que 13 minutos para se multiplicarem. Por este motivo, esses microrganismos aderem na porção de fibra móvel que apresenta a digestão mais lenta no rúmen, de modo que estes não sejam lavados antes que estes tenham a chance de se multiplicar. As dietas com baixo concentrado de forragem diminuem o tempo de retenção da fibra no rúmen e influenciam o número de protozoários em ruminantes. Os protozoários ciliados também são microrganismos proteolíticos, produzindo amônia e aminoácidos como produtos metabólicos finais (Warner, 1956). Os protozoários obtêm sua fonte de proteína realizando a digestão das bactérias engolidas por eles (Coleman, 1975). Os ciliados do rúmen possuem enzimas capazes de digerir proteínas vegetais (Coleman, 1983), porém são ineficientes (Coleman, 1975). O papel dos protozoários no ecossistema microbiano do rúmen foi considerado pouco claro (Williams e Coleman, 1992), e mesmo recentemente, foi difícil determinar claramente o papel dos protozoários ciliados na degradação das fibras do rúmen (Newbold *et al.*, 2015).

2.6. O papel dos fungos anaeróbicos

Os fungos anaeróbicos foram descritos pela primeira vez no rúmen por Colin Orpin na década de 1970, estabelecendo-se, no animal, entre 8-10 dias após o nascimento e constituindo com 5-8% da biomassa total do rúmen. Os zoósporos de fungos anaeróbicos originalmente foram classificados como protozoários, até que foi reconhecido que os flagelos presentes no zoósporo do fungo representavam sua fase de dispersão. (Liebetanz, 1910; Braune, 1913; Akin *et al.*, 1988).

O primeiro fungo ruminal foi identificado como *Neocallimastix frontalis* em rúmen de ovelha, e apresentou tanto zoósporos móveis como zoosporângios não móveis (Orpin, 1975). De acordo com o sistema de classificação recente (Hibbett *et al.*, 2007), os fungos anaeróbicos foram descritos no filo Neocallimastigomycota (Dagar *et al.*, 2011; Sirohi *et al.* 2013b; Gruninger *et al.*, 2014).

A classificação e identificação dos fungos anaeróbicos basearam-se principalmente no padrão de morfologia de talo/rizoide que pode ser monocêntrica ou policêntrica (Ho, 1995), o qual pode ser determinado nos primeiros estágios de crescimento, logo após a zoosporogênese. O ciclo de vida dos fungos anaeróbicos é assexuado, com a produção de zoósporos flagelados a partir do zoosporângio, e nenhum estágio sexual foi descrito, já que apenas as divisões nucleares mitóticas foram observadas. Os zoósporos podem ser posteriormente uniflagelados ou poliflagelados em ambas as formas (Heath *et al.*, 1986), que se altera entre um zoósporo móvel, zoósporo encistados e estágio zoosporangial vegetativo. Uma vez liberados do zoosporângio, as zoósporos móveis se movem por quimiotaxia para colonizar o material fibroso da planta e perdem seu flagelo para transformar-se em cisto. O cisto germina pela produção de um tubo germinativo, o que, por fim, dá origem a um sistema rizoidal. Em formas monocêntricas, o desenvolvimento pode ainda ser classificado como endógeno ou exógeno (Sirohi *et al.*, 2012). Eles se unem através dos flagelos, encistam e desenvolvem um sistema rizoidal que penetra no substrato com a ajuda de enzimas que degradam polissacarídeos. A fixação de zoósporos é muito rápida geralmente entre 15 a 30 minutos de incubação no alimento no rúmen. Esses fungos anaeróbicos do rúmen secretam uma série de enzimas incluindo esterases (feruloyl esterase, p-coumaryl esterase e acetil esterase) que quebram as ligações éster entre hemiceluloses e lignina, liberando celuloses livres e hemiceluloses para o metabolismo de outros microrganismos (Yue *et al.*, 2009).

No rúmen, os fungos anaeróbicos são representados pelo filo Neocallimastigomycota, que abriga os gêneros, *Orpinomyces*, *Caecomycetes*, *Anaeromyces*, *Cyllamyces*, *Piromyces* e *Neocallimastix*, cada um desses gêneros possui características morfológicas distintas (Ho e Barr, 1995; Ozkose *et al.*, 2001; Griffith *et al.*, 2009). Os fungos no rúmen possuem organelas chamadas hidrogenossomos e que são acoplados ao metabolismo da glicose para gerar energia sem produção de oxigênio. Essas organelas possuem características comuns às mitocôndrias (van Der Giezen, 2002), e são possivelmente, derivadas delas (Embley *et al.*, 1997; Voncken *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2012). O hidrogenossomos contém a enzima hidrogenase responsável pela produção de H₂, CO₂, lactato e acetato como produtos metabólicos finais da fermentação anaeróbica

fúngica de polissacarídeos de paredes celulares de plantas (Brul e Stumm, 1994; Theodorou *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 2012).

O genoma da cepa de C1A *Orpinomyces* sp. foi recentemente sequenciado e forneceu informações valiosas sobre a diversidade de enzimas ativas na degradação de carboidratos (Youssef *et al.*, 2013). A maquinaria dos fungos anaeróbicos celulolíticos consiste em enzimas livres e complexos de multi-enzimas (Wilson e Wood, 1992) conhecidas como celulosomas (Krause *et al.*, 2003; Joblin *et al.*, 2010). Esta característica tem despertado interesse e atenção para aplicações biotecnológicas, bem como para o suplemento microbiano para a produção de ruminantes como meio de melhorar o uso de alimentos de baixa qualidade. A inclusão de culturas de fungos anaeróbicos em dietas indica melhora na ingestão alimentar, taxa de crescimento animal, eficiência alimentar e aumento da produção de leite (Gao *et al.*, 2013).

2.7. Os bacteriófagos presentes no rúmen

Os bacteriófagos são importantes membros da comunidade microbiana do rúmen e estão presentes na quantidade aproximada de 10^9 partículas por mL (Tarakanov, 2006), pois além de serem os organismos mais abundantes na biosfera, demonstraram ser um fator dirigente na evolução das comunidades microbianas em vários ambientes (Breitbart *et al.*, 2002; Breitbart *et al.*, 2003; Fierer *et al.*, 2007; Dinsdale *et al.*, 2008; Rohwer e Thurber 2009; Parsley *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2010; Rodriguez-Brito *et al.*, 2010). Eles desempenham um papel importante no controle do número de microrganismos em um ecossistema, selecionando naturalmente os seres resistentes aos fagos além de facilitar a transferência horizontal de genes (HGT) (Breitbart e Rohwer, 2005; Rodriguez-Valera *et al.*, 2009; Rohwer e Thuber, 2009). HGT é um fenômeno comum e amplamente distribuído em comunidades microbianas contribuindo para a evolução dos microrganismos nessas comunidades (Koonin e Wolf, 2008; Aminov, 2011).

As estratégias de mitigação entérica do metano incluem a terapia com bacteriófagos (Patra, 2012), uma vez que os bacteriófagos podem atingir e lisar bactérias específicas indesejadas (Klieve *et al.*, 1999; Bach *et al.*, 2002). McAllister e Newbold (2008) relataram sifofagos que podem infectar metanogênicos como *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanococcus* spp., revelando o potencial da terapia de fago para ser usado como uma estratégia para controlar populações de metanogênicos e outras populações, como patógenos, no rúmen (Ackerman, 2007; Patra, 2012).

2.8. Perspectivas biotecnológicas do microbioma do rúmen

As populações microbianas apresentam uma enorme importância prática em diferentes áreas, como exemplo: engenharia, agricultura e medicina (Sloan *et al.*, 2006). Essas populações também têm uma capacidade única de degradar produtos residuais (Singh *et al.*, 2008), além de representar uma inexplorada gama genética e biológica com potencial de uso para a recuperação de genes, biomoléculas e vários produtos valiosos (Cowan, 2000). No microbioma gastrointestinal, os microrganismos empregam diversas funções benéficas como de proteção imunológicas, desenvolvimento e nutrientes que beneficiam o hospedeiro (Hooper, 2004) e sendo até considerados um "órgão" com importantes funções metabólicas (Xu e Gordon, 2003; Egert *et al.*, 2006; Gill *et al.*, 2006).

A aparente subestimação da verdadeira diversidade microbiana neste ambiente complexo deve-se principalmente ao fato de que apenas menos de 1% de todos os microrganismos presentes na natureza são cultiváveis (Hanada, 2003; Kamagata e Tamaki, 2005; Sekiguchi, 2006; Pontes *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008). O desenvolvimento e a aplicação de ferramentas moleculares recentes têm proporcionado aos microbiologistas um grande volume de informação para caracterizar e compreender as comunidades microbianas com importantes técnicas independentes de cultivo (Singh *et al.*, 2008). Os avanços na disponibilidade de dados genômicos e metagenômicos possibilitaram um aumento na área de estudos comparativos para a exploração da diversidade microbiana de comunidades complexas e melhor compreensão dos sistemas microbianos (Konstantinidis *et al.*, 2009; Quince *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2008).

A exploração de microbiomas intestinais de mamíferos através de sequenciamento metagenômico é recente e reflete a crescente atenção ao papel que as comunidades microbianas desse ambiente desempenham na saúde do hospedeiro (Morgavi *et al.*, 2013). Estudos sobre a microbiota intestinal mostram este ambiente complexo como uma fonte inesgotável de enzimas, bioterapêuticos, diferentes genes e novos produtos para aplicações em saúde, nutrição e desenvolvimento industrial (Selinger *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2001). Os principais objetivos das perspectivas microbiológicas e biotecnológicas da metagenômica da microbiota intestinal são i) a pesquisa de biocatalisadores inovadores para identificar novas hidrolases microbianas para uso em industriais de celulose e papel, indústria têxtil, alimentos e de rações para animais, como a aplicação de enzimas como suplementos dietéticos e/ou no tratamento da biomassa vegetal na dieta para aumentar a produtividade do gado, ii) descoberta de novas espécies microbianas e estudos de novas condições de cultivo para uma abordagem relevante no uso terapêutico e nutricional da microbiota de intestino como probióticos ou suplementos alimentares para animais produzidos diretamente dos microrganismos, iii) busca de novos genes, enzimas e

antimicrobianos como ferramentas da engenharia genética para promover a resistência natural da microbiota e pesquisas de bacteriocinas do rúmen para uso como moduladores do rúmen ou como supressivos contra agentes patogênicos oportunistas e iv) identificação de novos metanogênicos intestinais para a manipulação do microbioma do rúmen para reduzir a emissão de gases de efeito estufa e induzir anticorpos mediados pelo sistema imune do hospedeiro contra arqueia, desenvolvendo assim, vacinas contra alguns metanogênicos selecionados (Singh *et al.*, 2001).

O rúmen evoluiu para ser um eficiente e complexo sistema de degradação de lignocelulose e é considerado o sistema microbiano mais eficiente na degradação biomassa lignocelulósica (Flint *et al.*, 2008, Morgavi *et al.*, 2013), fato que atraiu grande interesse pelas enzimas deste ambiente para uso em processos industriais (Selinger *et al.*, 1996; Hess *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). A metagenômica funcional tem sido usada para identificar enzimas hidrolíticas, tais como, celulasas, hemicelulasas, xilanases, endoglucanasas e acetil xilan esterases, de interesse biotecnológico na desconstrução estrutural de polissacarídeos vegetais (Singh *et al.*, 2001, Morgavi *et al.*, 2013). É importante notar que as abordagens metagenômicas podem ser tendenciosas em relação aos números de genes abundantes abrigados pelas espécies microbianas mais abundantes (Qi *et al.*, 2011). No entanto, a importância de um gene na degradação da parede celular da planta pode não estar necessariamente correlacionada com a sua abundância no ecossistema, mas pela composição e abundância relativa de genes ativos transcritos (Qi *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2015).

Ferrer e colaboradores (2005) detectaram 9 endoglucanasas, 12 esterases e 1 ciclodextrinase de uma biblioteca metagenômica de rúmen de vaca leiteira, e foram pioneiros em usar a abordagem metagenômica para busca de enzimas hidrolíticas. Posteriormente, grupos diversos isolaram enzimas específicas de degradação de polissacarídeos do rúmen. Palackal (2007) detectou glucanase, mananase e xilanase do rúmen de bovinos. Wang *et al.* (2009) detectaram β -glucosidase e endo-b-1,4-glucanase do rúmen de bovinos. Wong (2008; 2009; 2010) detectou endo-xiloglucanase, exo-xiloglucanase, exo-a-1,5-L-arabinase e endo-a-1,5-L-arabinase. Hess e colaboradores (2011) identificaram mais de 100 enzimas hidrolíticas do rúmen de bovinos. Liu *et al.* (2009) e Duan *et al.* (2009) encontraram mananase, endo-b-1,4-glucanase, endo-glucanase, celodextrinase do rúmen de Búfalo. Além da busca de enzimas hidrolíticas as bibliotecas de metagenoma de rúmen também foram usadas para buscar compostos bioativos, incluindo novas lipases (Liu *et al.*, 2009; Bayer *et al.*, 2010), polifenol oxidase (Beloqui *et al.*, 2006) e uma enzima capaz de degradar 3,5,6-tricloro-2-piridinol, um produto de degradação do inseticida organofosforado (Math *et al.*, 2010), mas a maior parte da atenção tem sido na descoberta de genes responsáveis pela degradação da celulose e da hemicelulose mediada por enzimas

pertencentes à família GH (Hidrolases glicosídicas). Embora tenham sido utilizadas diferentes abordagens, grandes estudos baseados em sequências começaram a catalogar genes e a investigar os processos do rúmen envolvidos na degradação das fibras (Brulc *et al.*, 2009). O valor de explorar o ambiente do rúmen dessa maneira foi demonstrado pelo estudo do Joint Genome Institute, focado na comunidade microbiana ligada ao *switchgrass* (gramínea nativa da América do Norte cujo nome científico é *Panicum virgatum*) no rúmen da vaca leiteira (Hess *et al.*, 2011) e pela análise metatranscriptômica do rúmen de Boi-almiscarado, que teve o foco em fungos anaeróbios e protozoários (Qi *et al.*, 2011).

O microbioma do rúmen tem sido considerado uma excelente fonte de enzimas fibrolíticas e funciona como biorreator vivo para processar biomassa vegetal complexa. O desenvolvimento e a adoção de abordagens de biologia molecular, incluindo estudos microbianos independentes da cultura, fizeram grandes avanços na compreensão do ecossistema do rúmen e lançam luz sobre os microrganismos, genes e enzimas envolvidas na degradação da biomassa ruminal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O fluxo de trabalho e metodologias usadas neste trabalho seguiu a sequência ilustrada no fluxograma da Figura 5. As principais etapas estão descritas detalhadamente nos itens a seguir, que incluem, experimentação animal, isolamento e sequenciamento do DNA metagenômico, anotação taxonômica, anotação funcional de enzimas fibrolíticas, montagem dos *contigs* para prospecção de genes envolvidos na degradação da biomassa vegetal, anotação e seleção dos genes envolvidos na degradação da biomassa vegetal, desenho de oligonucleotídeos para a amplificação dos genes selecionados e análises estatísticas.

Figura 5: Fluxograma metodológico do presente trabalho.

3.1. Experimentação Animal

A experimentação animal para o acesso da diversidade microbiana e prospecção de genes responsáveis pela produção de enzimas com potencial de degradação de biomassa vegetal foi conduzida em trabalhos prévios pela doutora Emiliana Manesco Romagnoli, (Romagnoli 2016) do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola – ESALQ/USP em colaboração com o Prof. Dr. Adibe Abdalla do Laboratório de Nutrição Animal (LANA), da

Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba/SP, Brasil.

De acordo com a Comissão de Ética em Experimentos com Animais (protocolo 002/2009), foram utilizados seis ovinos machos da raça Santa Inês, canulados no rúmen (Tabela 1). Durante a amostragem e avaliação do desempenho animal, estes animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais. Três animais foram alimentados com uma dieta controle (Dieta 1: dieta base constituída por ~12% de farelo de soja, ~16% de milho, ~70% de feno e ~2% de sal mineral) e os outros três foram alimentados com uma dieta formulada, contendo de bagaço de cana-de-açúcar, para o enriquecimento de microrganismos degradadores de biomassa vegetal (Dieta 2: composta por ~12% de farelo de soja, ~16% de milho, ~58% de feno, 12% de bagaço de cana-de-açúcar e ~2% de sal mineral) de acordo com a Romagnoli (2016). A data de início do experimento foi em 04 de novembro de 2012 e foi até 08 de janeiro de 2013.

Tabela 1 - Descrição dos animais utilizados no experimento, com data de nascimento e tipo de dieta oferecida.

Animal	Data de Nascimento	Peso Inicial (Kg)
I5F*	29/06/2007	68,0
II5F	21/07/2005	69,5
III5F	23/05/2006	52,4
IV5F	17/09/2007	80,0
V5F	21/07/2005	82,5
VI5F	09/06/2006	74,0

*Os números romanos I, II ou III, representam os animais conduzidos com a dieta controle (três repetições) e IV, V e VI animais conduzidos com a dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. O número arábico 5 representa 60 dias após o início do experimento, tempo escolhido para as análises propostas no presente trabalho. A letra F representa amostra da fibra ruminal.

As rações foram formuladas de acordo com as exigências preconizadas pelo NRC (2007) e a alimentação foi ofertada duas vezes por dia, pela manhã e à tarde. A coleta da fase sólida do conteúdo ruminal nos dois tratamentos foi realizada após 60 dias, 3 horas depois da primeira oferta de alimento do dia, com auxílio de uma pinça e armazenada a temperatura -80°C (Romagnoli 2016).

3.2. Isolamento e sequenciamento do DNA metagenômico

Considerando três animais por tratamento (dieta 1 e dieta 2) foi extraído o DNA total de 6 amostras sendo cada amostra constituída por duas extrações independentes de DNA. O isolamento de DNA foi feito com o PowerSoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio), seguindo as recomendações do fabricante. Não houve tratamento da fibra antes do início da extração. A quantificação e a pureza do DNA total foi medida por Qubit® 2.0 Fluorômetro (Invitrogen – Life Technologies).

O sequenciamento do DNA total (6 amostras individuais) proveniente do metagenoma do rúmen de ovinos foi realizado em parceria com a Prof^a Dr^a Tsai Siu Mui do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, da Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba/SP, Brasil, em sequenciador MiSeq *Personal Sequencer* (Illumina®). As amostras foram sequenciadas em uma corrida múltipla, com o software MCS (MiSeq Control Software). Para o sequenciamento, 3 ng de DNA de cada amostra foi pré-preparado com o *Nextera® DNA Sample Preparation Kit 2x300* Illumina. Para a construção da biblioteca, o DNA foi fragmentado e ligado aos adaptadores do *Kit Nextera® Index*. Em cada amostra foi ligado um par de adaptadores para a identificação posterior. As bibliotecas produzidas foram então submetidas à plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq no modo *paired-end*, em que ocorre o sequenciamento dos fragmentos a partir de ambas as extremidades. Após a saída do sequenciador, os dados foram submetidos ao pré-processamento no *software* CLC *Genomics Workbench* (CGW, v. 6.0.5., CLCbio, Aarhus, Dinamarca) para retirada das sequências dos adaptadores utilizados.

3.3. Anotação taxonômica

A anotação taxonômica foi realizada a partir dos dados do sequenciamento do DNA total, utilizando o servidor *Metagenomics Rapid Annotations using Subsystems Technology* (MG-RAST), um sistema de genômica comparativa que permite estudar a função e a composição de comunidades microbianas (Meyer *et al.*, 2008). O servidor oferece controle de qualidade, anotação, análise comparativa dos dados normalizados e arquivamento automatizados. O fluxo de informações, bem como a interação com os dados e ferramentas de análise, ocorre dentro de um ambiente virtual (Overbeek *et al.*, 2005). Este ambiente abriga o servidor RAST que contém um banco de genomas completos anotados, bem como a lista de subsistemas já caracterizados. Os dados foram coletados em arquivo FastQ e inseridos no MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) (Meyer *et al.*, 2008) de acordo com o padrão MIMS (*Minimum*

Information about a Metagenomic Sequence) e com os parâmetros padrão de qualidade do servidor para o processamento das sequências.

Os perfis taxonômicos foram gerados pelo MG-RAST através de uma análise de similaridade entre as sequências submetidas contra um conjunto de bases de dados não-redundantes. Os táxons foram identificados através do SEED, que foi escolhido como principal banco de dados pelo fato de ter sido desenvolvido principalmente para anotação de dados metagenômicos. As sequências da taxonômica foram anotadas utilizando o BlastX com parâmetro de *Best hit* com 50 pb como menor tamanho de alinhamento e $E < 1 \times 10^{-5}$ como valor de corte para o *E-value* (Meyer *et al.*, 2008).

3.4. Anotação funcional e anotação de enzimas ativas em carboidrato

A anotação funcional foi realizada a partir dos dados do sequenciamento do DNA total, utilizando o servidor *Metagenomics Rapid Annotations using Subsystems Technology* (MG-RAST). Os perfis funcionais foram gerados através de uma análise de similaridade entre as sequências submetidas contra um conjunto de bases de dados do SEED. As classes funcionais foram identificadas através do SEED (Nível 1 e Nível 2), que foi escolhido como principal banco de dados pelo fato de ter sido desenvolvido principalmente para anotação de dados metagenômicos.

A estratégia para a busca das CAZymes (*Carbohydrate Active Enzymes*) (Lombard *et al.*, 2014) nos dados metagenômicos do rúmen de ovinos, foi realizada a partir da assinatura dos domínios conservados de tais grupos de enzimas. A anotação das CAZymes foi realizada localmente, a partir das *reads* obtidas do sequenciamento metagenômico de cada um dos seis animais (3 animais alimentados com uma dieta controle e 3 animais alimentados com uma dieta acrescida de bagaço de cana-de-açúcar) e com os perfis HMM das CAZymes, baixados no servidor dbCAN (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/>).

Foram acessadas as sequências submetidas à anotação no MG-RAST após a etapa de *Screening* (remoção de *reads* quase idênticas a sequências de genomas de organismos-modelo, como por exemplo, humanos e ratos), sendo obtido um arquivo multifasta contendo as sequências de DNA de todas as amostras. Antes da anotação, os dados foram normalizados considerando o número de *reads* da amostra que gerou a menor quantidade de dados, com isso, todos os seis conjuntos de dados foram aleatoriamente reduzidos à mesma quantidade de sequências.

Após a normalização, as sequências foram traduzidas nas 6 janelas de leitura utilizando o programa Transeq, do pacote EMBOSS (*European Molecular Biology Open Software Suite*) (Rice; Longden; Bleasby, 2000). Em seguida, foram baixados os perfis (domínios conservados) de todas

as famílias de CAZymes já descritas no servidor dbCAN. Foi então utilizado o programa hmmscan, do pacote de programas HMMER (Finn; Clements; Eddy, 2011), que usou os perfis HMM das famílias de CAZymes baixados, para realizar uma busca contra o multifasta obtido do sequenciamento metagenômico do rúmen de ovinos de cada um dos seis animais individualmente e traduzido, o qual funcionou como uma “base de dados”, permitindo a anotação. A ideia principal do hmmscan é a de utilizar perfis baseados nas cadeias ocultas de markov (HMM) como modelos na busca de regiões conservadas homólogas na base de dados de interesse. O resultado do hmmscan mostrou a quantidade de hits para CAZymes em cada animal, permitindo uma análise quanto à distribuição das diferentes classes e famílias destas enzimas.

3.5. Montagem dos *contigs* para a prospecção de genes codificadores de proteínas envolvidas na degradação da biomassa vegetal

Para a montagem dos *contigs*, foram testados três montadores diferentes IDBA, SPADE e o CLC *Genomics Workbench* a fim de selecionarmos o montador que resultasse na melhor montagem, considerando a utilização da maior quantidade de *reads* na montagem, maiores tamanhos de *contigs* e melhores valores de N50. Todos os montadores foram testados com os parâmetros padrões.

Por apresentar os melhores resultados para a montagem dos *contigs*, foi utilizado o software CLC *Genomics Workbench* (CGW, v. 6.0.5., CLCbio, Aarhus, Dinamarca) e o pré-processamento das sequências foi realizado visando avaliar a qualidade das bases, “*Trim sequences*” (NGS: QC and manipulation). Para padronizar o tamanho das sequências e eliminar sequências curtas, foi dado um último comando neste programa, “*Filter sequences by length*”, que selecionou sequências com tamanho mínimo de 50 bases. A montagem de *contigs*, a partir de dados metagenômicos, demanda uma quantidade alta de dados para obter melhores resultados com uma melhor qualidade, com isso, foram utilizados na montagem, o total de *reads* de cada amostra sem realizar a normalização e foram considerados dois conjuntos de dados, sendo um conjunto proveniente dos dados dos três animais alimentados com a dieta controle e um outro conjunto provenientes dos dados dos três animais alimentados com a dieta acrescida de bagaço de cana-de-açúcar, aumentando assim a quantidade de sequências em cada conjunto de dados.

Para a montagem *de novo* foram testada diferentes valores de *Word size* (size= 20, 30, 40, 50, 60, 21, 31, 41, 51 e 61), e foi selecionada a combinação de parâmetros que resultou na montagem de *contigs* de maiores comprimentos e em maior quantidade de dados de DNA, ou seja com perda menor de sequências durante a montagem.

3.6. Anotação e seleção dos genes codificadores de proteínas envolvidas na degradação da biomassa vegetal

Os *contigs* foram submetidos à busca por ORFs (*open reading frames*) considerando o tamanho mínimo das sequências em 400pb e todos os *códons* iniciadores. Em seguida foi realizada a tradução e comparação proteica através do BlastP (E-value 1-10, *Word size* 31) contra o banco de dados NCBI. As proteínas anotadas foram classificadas de acordo com as classes de proteínas degradadoras de carboidrato (CAZy). A partir da identificação das proteínas alvos foram selecionadas aquelas que continham sequências completas dos genes. Para avaliação da presença e integridade de domínios conservados, utilizou-se a ferramenta batch CD-Search (Marchler-Bauer *et al.*, 2011), disponível no NCBI.

3.7. Desenho de oligonucleotídeos e amplificação dos genes selecionados

Uma vez selecionados os genes alvos completos codificadores para proteínas com potencial de degradação da biomassa vegetal, foram desenhados pares de oligonucleotídeos específicos na região externa do gene, aproximadamente 100-200 pares de base antes do códon de iniciação (*start códon*) e após o códon de terminação (*stop códon*) da região codificadora do gene, para cada gene alvo, a partir da identificação e recuperação das sequências de nucleotídeos (CLC *Genomics Workbench*), determinação dos códons iniciais e finais (ORF *finder*), determinação das enzimas de restrição (NEB *Cuttr*) e pela %CG (*Oligo Analyzer*). Após a identificação dos genes os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio da ferramenta *Primer Blast*, disponível no NCBI (Figura 6 e Tabela 2). Em complemento aos oligonucleotídeos externos, foram desenhados novos oligonucleotídeos para a região codificadora do gene com sítios de restrição, de forma que mantivessem o quadro de leitura correto e a adição da cauda de Histina (6x) na região N-terminal do gene. Para tanto, após a anotação do gene, a identificação da ORF foi realizada utilizando a ferramenta *Open Reading Frame Finder* do NCBI. Posteriormente, o mapa de restrição do gene foi analisado no software CLC *Genomics Workbench* (CGW, v. 6.0.5, CLCbio, Aarhus, Dinamarca) para a escolha da enzima de restrição de forma que fosse evitados sítios de clivagem dentro do inserto. A partir da escolha das enzimas de restrição foi feita uma digestão teórica do possível constructo (vetor + inserto) para confirmação do quadro de leitura correto utilizando a ferramenta *Open Reading Frame Finder* do NCBI (Figura 6 e Tabela 2).

Figura 6 – Figura demonstrativa da posição dos *primer* internos e externos, identificação dos sítios de restrição e região codificadora do gene. As setas em vermelho indicam as posições dos *primers* externos à região codificadora do gene. As setas em amarelo indicam os *primers* internos desenhados nas regiões do start códon e do stop códon do gene. E a seta azul representa a região codificadora do gene assim como sua orientação.

Tabela 2 – Iniciadores desenhados e utilizados na amplificação em cada um dos genes selecionados.

ID do Gene	Família CAZy	Primer Externos Sequência (5'-3')	Primer internos Sequência (5'-3')	Enzimas de restrição
ORF 21	GH2	F: CGAGAAGCTGTATCCGAACCA R: TCTTATTGTCTCGCGTCATCA	F: TGA GGA TCC ATG AGA AAA TTC TT R: GTT CTC GAG TCA CTC AAA AAA AGC	BamHI / XhoI
ORF 615	GH16	F: ATGCGGAATTTTCATCACACAGG R: TTCCAACCAGATTGGCTATGC	F: AAT GAA TTC ATG ATA AAC AAG CGG R: TAT CTC GAG TCA TTG ACACGG	EcoR1 / XhoI
ORF 793	GH 25	F: ATCTTCCGCATCAAGGCCAA R: CCGACGACCCAGAGAATGTT	F: CTC GAA TTC ATG AAA TAC ACC CG R: AGA GCG GCC GCT TTA TTC	EcoR1 / NoT

A amplificação dos genes foi realizada a partir do mesmo DNA proveniente dos animais alimentados com a dieta 2 (acrescida de bagaço de cana-de-açúcar) e usado no sequenciamento do metagenoma do rúmen de ovinos, uma vez que os genes selecionados foram provenientes do conjunto de dados dos animais alimentados com a dieta 2.

Foram realizados diversos testes de amplificação, em termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycle* (*Applied Biosystems*) com o intuito de otimizar o procedimento. Para tanto, o primeiro teste da amplificação utilizou 2,5 µL de Buffer *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5 µL de solução de 10 mM contendo uma mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 1 µL de solução de 25 µM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1 µL de da primers a 10 µM, 1 U de *Taq* DNA Polimerase e DNA nas concentrações de 5 ng, 10 ng e 20 ng. Os parâmetros utilizados foram: um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, para o anelamento foram testadas diferentes temperaturas sendo 55, 57 e 59°C por 45 s e extensão a 72°C por 2 min e 30 s, e um ciclo final de extensão a 72°C por 1 min.

O segundo teste foi realizado com as recomendações do fabricante da *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) para tanto, foram utilizado 2,5 µL de Buffer *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 0,5 µL de solução de 10 mM contendo uma mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 0,8 µL de solução de 25 µM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 0,7 µL de

primers a 10 μ M, 1 U de Taq DNA Polimerase e DNA nas concentrações de 10 ng, 20 ng e 40 ng. Os parâmetros utilizados foram: um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, para o anelamento foram testadas diferentes temperaturas sendo 55, 57, 59 e 61°C por 1 min e 30 s e extensão a 72°C por 2 min 30 s, e um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min.

O terceiro teste foi realizado com um aumento balanceado nos reagentes da reação, para tanto, foi utilizado 2,5 μ L de Buffer *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 2,5 μ L de solução de 10 mM contendo uma mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2,5 μ L de solução de 25 μ M de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 2,5 μ L de da *primers* a 10 μ M, 1 U de Taq DNA Polimerase e DNA nas concentrações de 10 ng, 20 ng e 40 ng. Os parâmetros utilizados foram: um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, para o anelamento foram testadas diferentes temperaturas sendo 55°C por 1 min e 30 s e extensão a 72°C por 2 min e 30 s, e um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min.

Em todos os testes a visualização foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1x por 1 h e 30 min a 80 V. Para a fluorescência foi usado *GelRed*. O gel foi fotografado sob ação da luz UV em fotodocumentador.

3.8. Análises estatísticas

Os dados taxonômicos foram estatisticamente avaliados através da comparação dos dois tratamentos (Dieta 1 e Dieta 2), no programa STAMP (*Statistical Analyses of Metagenomic Profiles*) (Parks *et al.*, 2014). Para o perfil taxonômico, as diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. As *reads* não classificadas foram removidas das análises.

A ocorrência de genes codificadores de proteínas fibrolíticas foi estatisticamente avaliada através da comparação entre a anotação funcional das *reads* considerando dois tratamentos (Dieta 1 e Dieta 2), no STAMP. Para o perfil Funcional, o teste estatístico aplicado foi Anova. A diferença entre as abundâncias relativas foi considerada significativa para $p \leq 0,05$. As *reads* não classificadas foram removidas das análises.

4. RESULTADOS

4.1. Sequências obtidas do microbioma do rúmen

Um total de seis amostras, sendo de 3 animais do tratamento controle e 3 do tratamento contendo bagaço de cana-de-açúcar na dieta, provenientes da parte sólida do rúmen, foram sequenciadas utilizando a plataforma Illumina® MiSeq obtendo-se mais de dez milhões e meio de sequências, totalizando aproximadamente 4,69 Gb de dados. Após a retirada dos *barcodes* e aplicados todos os filtros de qualidade na plataforma *Galaxy*, a quantidade de dados se manteve alta (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo das sequências obtidas após filtro de qualidade e anotação realizada no servidor MG-RAST.

Saída do sequenciamento	Dieta 1: Controle				Dieta 2: Cana-de-açúcar			
	I5F*	II5F	III5F	Média	IV5F	V5F	VI5F	Média
Contagem de Sequências	859.056	2.249.354	1.063.444	1.390.618	2.959.167	1.552.748	2.065.158	2.192.358
Após QC: Contagem de Sequências	857.106	2.246.458	1.060.186	1.387.917	2.954.790	1.552.114	2.064.224	2.190.376
Após QC: Tamanho Médio das Sequências (pb)	198±102	205±101	184±99	-	228±104	205±101	230±102	-
Após QC: Percentual Médio de CG (%)	48±11	47±11	48±10	-	49±10	47±11	47±11	-
Processado: Funcionalidade de Proteínas Preditas	83%	85%	85%	84%	86%	85,50%	86,50%	86%
Anotação: Categorias Funcionais Identificadas	71.002	181.959	86.228	113.063	268.677	181.959	186.646	212.427

*Os números romanos I, II ou III, representam os animais conduzidos com a dieta controle (três repetições) e IV, V e VI animais conduzidos com a dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar. O número arábico 5 representa 60 dias após o início do experimento, tempo escolhido para as análises propostas no presente trabalho. A letra F representa amostra da fibra ruminal.

Nas análises geradas pelo servidor MG-RAST, observou-se uma variação na quantidade de sequências entre os animais. Por exemplo, o animal I5F apresentou a menor quantidade de sequências após controle de qualidade (857.102) e o animal IV5F apresentou maior quantidade de

sequências (2.954.790) (Tabela 3). A anotação funcional dos dados metagenômicos revelou aproximadamente nove milhões de proteínas preditas, representando 85% em relação à quantidade total dos dados distribuídos em 794.512 categorias funcionais.

Para checar a qualidade do sequenciamento, foi gerado um gráfico de qualidade das bases ao longo dos *reads* na plataforma *Galaxy* (Figura 7). Em média as sequências apresentaram um *score* médio de qualidade alta no valor de 30.

Figura 7- *Score* de qualidade por posição no *read* do sequenciamento metagenômico do rúmen de ovinos, proveniente de amostras de DNA dos seis animais (3 animais alimentados com a dieta 1: IF5; IIF5 e IIIF5, 3 animais do alimentados com a dieta 2: IVF5; VF5 e VIF5) extraídos da plataforma *Galaxy*.

Após a anotação das sequências no servidor MG-RAST foi gerada a curva de rarefação, ainda neste servidor, com o objetivo de se verificar a cobertura e a variação na riqueza de espécies e na diversidade microbiana no rúmen dos animais estudados (Figura 8).

Tanto a contagem de espécies, quanto o índice de diversidade calculado em cada amostra, tiveram valores distintos, mas aproximados. As amostras que apresentaram maior número na contagem de espécies, isto é, maior riqueza, foi o animal IVF5, seguido respectivamente pelo animal II5F, animal VI5F, animal III5F animal V5F e animal I5F. O mesmo padrão foi observado para o índice de diversidade de Shannon, onde o animal IV5F apresentou maior riqueza (286.83).

Figura 8 - Curva de rarefação extraída do servidor MG-RAST, mostrando a disposição dos *reads* do sequenciamento metagenômico entre os 6 animais. Diversidade alfa calculada a partir do índice de diversidade de Shannon, sendo os animais da dieta 1, Animal I =270.60, Animal II: 270.38; Animal III: 218.80 e os animais da dieta 2, Animal IV: 286.83, Animal V: 240.58 e Animal VI: 240.58.

4.1. Composição do microbioma do rúmen com base no DNA metagenômico

Para a anotação taxonômica dos dados do sequenciamento metagenômico foi utilizado o servidor MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008) e as informações sobre a composição da comunidade microbiana foram obtidas através da anotação contra o banco de dado SEED.

A composição do microbioma do rúmen de ovinos pode ser observada na Figura 9 e de acordo com a anotação mostrou que a comunidade é dominada, tanto no tratamento composto pela dieta 1 quanto na dieta 2, por Bactéria (>96%), e apresenta uma pequena fração de Archeias (~1-3%) e menos de 2% de Eucariotos, vírus e organismos não classificados (Figura 9).

A qualidade da anotação foi consistentemente alta em todas as fontes de dados SEED, apresentando mais de 80% de identidade. Foram anotados 22 diferentes filos no domínio Bactéria e considerando a frequência total deste domínio nas amostras de rúmen, foi observado que a variação entre os animais é maior que o efeito do tratamento (Figura 9).

Figura 9 - Anotação taxonômica pelo MG-RAST. Os gráficos de barra apresentam as informações sobre domínios taxonômicos dos dois grupos de animais separados de acordo com a dieta oferecida (Dieta 1 contém os animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 contém os animais IV5F, V5F e VI5F) obtidas através da anotação contra o banco de dado SEED.

Apesar da abundância dos grupos bacterianos ter apresentado diferenças em cada uma das amostras, os grupos dominantes prevaleceram os mesmos, onde um padrão pode ser observado entre todas as amostras, sendo os filos Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria sempre encontrados, nessa respectiva ordem crescente de maior abundância (Figura 10). Outros

filos encontrados em uma abundância relativa menor são Spirochaetes, Chlorobi, Fusobacteria, Cianobacteria, Verrucomicrobia, Tenericutes, Thermotogae e Chloroflexi.

Figura 10 - Frequência relativa da estrutura da comunidade bacteriana, em nível de filo, baseada no sequenciamento metagenômico entre os seis animais alimentados com duas dietas diferentes (Dieta 1 animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 animais IV5F, V5F e VI5F) obtidas através da anotação contra o banco de dado SEED.

Para a identificação dos filos bacterianos que tiveram sua frequência significativamente afetada pela alteração na dieta, foram conduzidos testes estatísticos no software STAMP (p -value <0,05). Foi observada uma maior proporção dos filos Bacteroidetes (~45,3% *vs* 42,6%) e Synergistetes (~1,1% *vs* 0,3%) nos animais alimentados com a Dieta 1. Em contrapartida, nos animais alimentados com uma dieta enriquecida de bagaço de cana-de-açúcar (Dieta 2), foi

observado uma maior abundância dos filos Firmicutes (~27,4% *vs* 29,8%), Proteobacteria (~12,7% *vs* 14,8%), Actinobacteria (~5,1% *vs* 6,4%), Spirochaetes (~1,9% *vs* 2,0%) e Verrucomicrobia (~1,6% *vs* 1,7%). Os quatro filos mais abundantes (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria) representaram aproximadamente 90% da comunidade bacteriana presente no rúmen de ovinos (Figura 11).

Figura 11 - Comparação da abundância relativa dos filos bacterianos entre os dois grupos de animais realizada no software STAMP. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$ (*). As barras em azul representam os animais alimentados com a Dieta1 (controle) e as barras em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar).

Foram anotadas 44 diferentes classes pertencentes ao domínio Bactéria. A classe Bacteroidia foi a classe mais abundante em ambos os tratamentos, seguido respectivamente das classes Clostridia, Bacilli, Gammaproteobacteria, Actinobacteria e Flavobacteria. Assim como em nível de filo, apesar da abundância das classes apresentar diferenças entre os tratamentos, os grupos dominantes prevaleceram os mesmos, onde um padrão pode ser observado (Figura 12). Entre as seis classes mais abundantes anotadas, duas delas, Bacteroidia (36% *vs* 32%) e Flavobacteria (5% *vs* 4%), ambas pertencentes ao filo Bacteroidetes mostraram-se mais abundantes na média das *reads* anotadas dos três animais alimentados com a Dieta 1 quando comparados com os animais alimentados com a Dieta 2. Com isso, as classes Clostridia (17% *vs* 19%) e Bacilli (8% *vs* 9%), pertencentes ao filo Firmicutes, e a classe Actinobacteria (4% *vs* 5%), pertencente ao filo Actinobacteria foram mais abundantes nos animais alimentados com a Dieta 2. A classe Gammaproteobacteria, pertencente ao filo Proteobacteria, apresentou mesma abundância relativa nos dois tratamentos (6%), não sofrendo nenhum impacto com a mudança

na dieta (Figura 12). Podemos observar também que as classes que apresentam maiores proporções na anotação das *reads* são provenientes dos quatro filos mais abundantes.

Figura 12 - Gráfico de Krona da distribuição dos domínios taxonômicos indicando a porcentagem de *reads* preditos em cada classe anotada para os animais submetidos à dieta controle, Dieta 1 (A) e à dieta contendo bagaço de cana-de-açúcar, Dieta 2 (B). Os dados foram anotados contra o banco de dados SEED no MG-RAST.

Para a comparação em nível de classe proveniente do domínio bactéria também foram realizados testes estatísticos pelo software STAMP e foi baseado nos resultados relativamente significantes ($p\text{-value} < 0,05$) comparando os tratamentos entre si levando em consideração a média dos três animais de cada tratamento (Dieta 1 contém os animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 contém os animais IV5F, V5F e VI5F). Das 15 classes bacterianas que apresentaram diferença estatística significativa apenas seis (Bacteroidia, Methanobacteria, Liliopsida, Flavobacteria, Negativicutes e Cytophagia) delas mostraram uma maior abundância na Dieta 1, contra 9 classes (Clostridia, Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Spirochaetes e Verrucomicrobiae) com maior abundância na Dieta 2 (Figura 13).

No geral, com a análise taxonômica podemos observar um enriquecimento dos grupos bacterianos no tratamento onde foi utilizada a Dieta 2, acrescida de bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 13 – Diferenças significativas em nível de classe na comunidade bacteriana entre os dois grupos de animais alimentados com duas dietas diferentes. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. As barras em azul representam os animais alimentados com a Dieta1 (controle) e as barras em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar). As classes Liliopsida e Aconoidasida não pertencem ao domínio Bactéria.

Para confirmar que a variação na composição taxonômica do microbioma ruminal entre os animais é maior que o efeito do tratamento, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), em nível de classe (Figura 14). A análise revelou que considerando a classificação taxonômica da comunidade bacteriana obtida pelo sequenciamento do DNA total, não há correlação entre a estruturação da comunidade e a presença de bagaço de cana-de-açúcar na dieta.

Figura 14 - Análise de Componentes Principais (PCA) da anotação taxonômica, em nível de classe, usando o banco de dados SEED pelo MG-RAST das sequências das 6 amostras do microbioma do rúmen de ovinos. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$ (*). Os pontos em azul representam os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e os pontos em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar).

4.2. Funções do microbioma do rúmen

4.3.1. Diversidade funcional da comunidade microbiana do rúmen

A composição funcional do metagenoma do rúmen de ovinos foi analisada utilizando *reads* de alta qualidade obtidos após a filtragem de controle de qualidade do MG-RAST, e as

categorias funcionais foram anotadas através do banco de dados SEED *Subsystem*. A comparação da análise entre as seis amostras apresentou uma alta similaridade na diversidade funcional com base na anotação de nível 1 tanto para os animais da dieta 1 (controle) quanto para os animais da dieta 2 (com bagaço de cana-de-açúcar), sendo os subsistemas funcionais mais abundantes: Metabolismo de carboidratos, Metabolismo de proteínas, Metabolismo de aminoácidos, Metabolismo de RNA e DNA, respectivamente (Figura 15).

Para a comparação em nível 1 da anotação funcional também foram realizados testes estatísticos pelo software STAMP e foi baseado nos resultados relativamente significantes (p -value <0,05) comparando os tratamentos entre si levando em consideração a média dos três animais de cada tratamento (Dieta 1 contém os animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 contém os animais IV5F, V5F e VI5F).

Figura 15 - Perfil funcional do microbioma do rúmen de ovinos (SEED nível 1) predito através do MG-RAST utilizando dados do sequenciamento metagenômico total. Na denominação das amostras os números romanos I, II ou III, representam os animais conduzidos com a dieta 1 e IV, V e VI animais conduzidos com a dieta 2.

Das 28 categorias funcionais anotadas, 19 delas mostraram-se diferentes estatisticamente, sendo apenas 7 categorias mais abundantes na Dieta 1 (Metabolismo de proteínas, Aminoácidos e derivados, Funções ligadas a Respiração, Funções do Metabolismo de Carboidratos, de Parede

celular e derivados, Nucleotídeos e Transporte de Membrana) contra 12 categorias funcionais (Plasmídeos de elementos transponíveis de Fagos e pro fagos, Lipídeos e Ácidos graxos, Agrupamentos do subsistema, Variados, Metabolismo de RNA e DNA, Fotossíntese, Metabolismo de compostos aromáticos, Regulação e sinal celular, Motilidade e resposta ao estresse, Parede celular e Capsula) com maior abundância na Dieta 2 (Figura 16).

Figura 16 - Diferenças significantes na anotação funcional de nível 1 com base no banco de dados de subsistemas do SEED na comunidade microbiana entre os dois grupos de animais alimentados com duas dietas diferentes. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. As barras em azul representam os animais alimentados com a Dieta1 (controle) e as barras em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar).

A análise estatística em nível 2 foi baseada nas duas categorias mais abundantes em nível 1 (Metabolismo de proteínas e Metabolismo de carboidratos) e comparou os tratamentos entre si levando em consideração a média dos três animais de cada tratamento (Dieta 1 contém os animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 contém os animais IV5F, V5F e VI5F).

Embora ambas as categorias anotadas mostraram-se mais abundantes no tratamento com a dieta 1, nas análises em nível 2, com relação à categoria de Metabolismo de proteínas, as classes funcionais não apresentaram diferenças estatísticas significantes (Figura 17 A), porém podemos observar um enriquecimento de 3 das 4 categorias diferenciadas estatisticamente com base no metabolismo de carboidratos no tratamento com a dieta 2 (Categoria enriquecida na dieta 1: Ácidos orgânicos; Categorias enriquecidas na dieta 2: Polissacarídeos, Fermentação e Alcoóis de açúcar) (Figura 17 B e C). No geral, podemos observar um enriquecimento das classes funcionais,

tanto em nível 1 quanto em nível 2, no tratamento onde foi utilizada a Dieta 2, acrescida de bagaço de cana-de-açúcar (Figuras 16 e 17).

Figura 17 – Análises estatísticas das categorias funcionais em nível 2 baseada nos dois grupos funcionais mais abundantes do nível 1 com base no banco de dados de subsistemas do SEED na comunidade microbiana entre os dois grupos de animais alimentados com duas dietas diferentes. (A) *Scater plot* baseado nas categorias de nível 2 provenientes do Metabolismo de proteínas. (B) *Scater plot* baseado nas categorias de nível 2 provenientes de Carboidratos. (C) Diferenças significantes na anotação funcional de nível 2 com base na categoria de Carboidratos do nível 1. Significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. As barras e pontos em azul representam os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e as barras e pontos em laranja representam os animais alimentados com a Dieta 2 (acrescida com bagaço de cana-de-açúcar).

As análises baseadas na anotação funcional de nível 2 dos dados metagenômicos mostraram que os animais agrupam-se de acordo com o tratamento de origem. Esse fato foi confirmado pela Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 18). Assim, embora os dados metagenômicos não tenham revelado correlação entre a composição da comunidade bacteriana e os tratamentos avaliados, houve uma correlação com as funções presentes em cada tratamento, sugerindo que a montagem da comunidade no rúmen é dirigida por funções em detrimento da filogenia, considerando a redundância funcional intrínseca aos microbiomas de ecossistemas complexos como o rúmen.

Figura 18 - Análise de Componentes Principais (PCA) das sequências das metagenômica do microbioma do rúmen de ovinos. Os dados foram anotados automaticamente utilizando o MG-RAST e o banco de dados SEED para os níveis Funcionais. Diferentes cores representam as réplicas para cada grupo de animais nas duas dietas, sendo a cor azul representando os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e a cor laranja representando os animais alimentados com a Dieta 2 (bagaço).

4.3.2 Efeito do enriquecimento da dieta com bagaço de cana-de-açúcar na frequência de enzimas ativas em carboidrato no metagenoma do rúmen

Um total de 5.154.336 sequências do metagenoma do rúmen de ovinos, resultantes da normalização dos dados, foram alinhados contra 359 famílias do CAZy (*dbCAN*). A abundância relativa das famílias de enzimas relacionadas à degradação de carboidratos segue um padrão similar de abundância entres todas as amostras do metagenôma. O módulo catalítico da família de *Glycoside Hydrolases* (GH) foi o mais abundante em todas as amostras (45,5%) e corresponde a um total de 107.841 sequências, sendo 49.785 provenientes do tratamento com a dieta 1 e 58.056 do tratamento com a dieta 2, as quais foram anotadas em 129 diferentes famílias, sendo as mais abundantes em ambos os tratamentos as sub-famílias GH2, GH43, GH97, GH12 E GH3 que juntas correspondem a 25% do total anotado. A segunda família mais abundante foi *Glycosyl Transferases* (GT, 24,85%) com 58890 sequências, sendo 25945 provenientes do tratamento com a

dieta 1 e 32945 do tratamento com a dieta 2, anotadas em 97 diferentes subfamílias. As enzimas das subfamílias GT2, GT4, GT41 e GT5 estão presentes em uma maior proporção representando 38,14% do total de GTs. A família *Carbohydrate-Binding Modules* (CBM, 12,6%) inclui um total de 28.579 sequências anotadas em 78 subfamílias, sendo 12.717 provenientes do tratamento com a dieta 1 e 15.862 do tratamento com a dieta 2. A subfamília CE1 codifica a enzima *feruloyl esterase*, a qual é essencial para solubilização dos polímeros de lignina da planta sendo a principal subfamília das *Carbohydrate Esterases* (CE) presentes no rúmen de ovinos contendo 5.737 sequências que representam 25,3% do total. A família de CE é a quarta mais abundante (9,97%) com um total de 23.633 sequências anotadas em 16 diferentes subfamílias, sendo 11.057 provenientes do tratamento com a dieta 1 e 12.576 do tratamento com a dieta 2. Além das quatro famílias mais abundantes, a anotação também identificou 13 subfamílias de AAs (*auxiliary activities*) e 23 subfamílias de PLs (*polysaccharide lyase*) (Figura 19).

Figura 19 - Abundância relativa das famílias de CAZymes nos dados do metagenoma do rúmen de ovinos em cada um dos animais. Na denominação das amostras os números romanos I, II ou III, representam os animais conduzidos com a dieta 1 e IV, V e VI animais conduzidos com a dieta 2 e as siglas significam *Glycoside Hydrolases* (GH), *Glycosyl Transferases* (GT), *Carbohydrate-Binding Modules* (CBM), *Auxiliary Activities* (AA), *Carbohydrate Esterases* (CE), *Polysaccharide Lyases* (PLs) e *S-layer homology domain* (SLH).

A análise estatística comparou os tratamentos entre si levando em consideração a média de hits em cada uma das nove famílias de CAZyme dos três animais de cada tratamento (Dieta 1 contém os animais I5F, II5F e III5F e Dieta 2 contém os animais IV5F, V5F e VI5F) e a diferença entre os tratamentos foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção

para a significância $p < 0,05$. Todas as famílias indicaram uma maior abundância na Dieta 2, porém apenas quatro das nove famílias apresentaram diferenças estatísticas significativas (GH, GT, CE, Dockerin e SLH), como podemos observar na Figura 20.

Figura 20 - Abundância de *bits* nas diferentes famílias de CAZymes entre os tratamentos Dieta 1 e Dieta 2. A significância foi determinada pelo teste exato de Fisher, com filtro de correção para significância $p < 0,05$. Siglas significam *Glycoside Hydrolases* (GH), *Glycosyl Transferases* (GT), *Carbohydrate-Binding Modules* (CBM), *Auxiliary Activities* (AA), *Carbohydrate Esterases* (CE), *Polysaccharide Lyases* (PLs) e *S-layer homology domain* (SLH).

As Análises de Coordenadas Principais (PCoA) mostraram que os animais agruparam-se de acordo com o tratamento de origem quando levando em consideração a anotação total incluindo todas as famílias de enzimas do CAZy (GH, GT, CBM, Outras). Porém quando as famílias são analisadas separadamente observamos esse padrão somente à família das GHs, família mais abundante em todas as amostras. As outras demais famílias não apresentaram correlação com os tratamentos avaliados (Dieta 1 e Dieta 2) (Figura 21).

Para determinar a diversidade de enzimas lignocelulolíticas, foram selecionadas 31 subfamílias principais de GH que foram agrupadas em cinco categorias (Celulases, Endo-hemicelulases, Xilanoglucanases, Enzimas de desconstrução e Enzimas degradadoras de oligossacarídeos) de acordo com a principal função na degradação da fibra da planta (Tabela 4).

Figura 21 - Análise de Componentes Principais (PCA) das sequências do microbioma do rúmen de ovinos. (A) PCA considerando o total de CAZy anotadas em cada um dos tratamentos, (B) PCA baseada anotação nas GH (*Glycoside Hydrolase*), (C) PCA baseada anotação nas CBM (*Carbohydrate-Binding Modules*), (D) PCA baseada anotação nas GT (*Glycosyl Transferases*), (E) PCA baseada anotação da soma dos demais grupos do CAZy (*Auxiliary Activities* - AA, *Carbohydrate Esterases* - CE, *Polysaccharide Lyases* - PLs e *S-layer homology domain* - SLH). Os dados foram anotados utilizando o banco de dados do CAZy. Diferentes cores representam as réplicas para cada grupo de animais nas duas dietas, sendo a cor azul representando os animais alimentados com a Dieta 1 (controle) e a cor laranja representando os animais alimentados com a Dieta 2 (bagaço).

As principais celulasas identificadas no microbioma do rúmen são classificadas dentro das subfamílias GH5, GH6, GH9, GH44, GH45 e GH48. Os fragmentos do sequenciamento metagenômico codificados para celulasas pertencentes às famílias GH5 e GH9, sendo as mais abundantes entre as celulasas, totalizam 10,9% do total de GHs encontradas no rúmen de ovinos. Comparativamente, um menor número de sequências codificadas para celulasas que degradam a cadeia de componentes da parede celular de plantas (12% do total das GHs) prevalecem no rúmen de ovinos, enquanto as enzimas envolvidas na hidrólise dos polímeros e oligossacarídeos das plantas (GH1, GH2, GH3, GH29, GH35, GH38, GH39, GH42, GH43 e GH52), são mais abundantes e representativas (68,97%). Exo- β -1, 4-glucosidases (GH1 e GH3) e endo- β -1, 4-glucanases (GH5 e GH12) envolvidas na hidrólise de resíduos de glicose β -1, 4-linked de celulose foram representadas por ~ 12 e $\sim 8\%$ do total de GHs, respectivamente. Um grande número de enzimas degradadoras de endo-hemicelulase provenientes das subfamílias GH8, GH10, GH11, GH12, GH26, GH28 e GH53 também foram identificadas e classificadas. A análise de enzimas degradadoras de carboidratos também identificou a presença de enzimas de degradação pertencentes à família GH51 (α -l-arabino furanosidases), GH67 (α -glucuronidases), e GH 78 (α -l-rhamnosidases) que desempenham um papel fundamental na despolimerização de hemicelulose.

As enzimas que efetuam a hidrólise de cadeias principais de xilano, como endo-1, 4- β -xilanasase e endo-1, 3- β -xilanasase foram representadas pelas famílias GH10 e GH11. Entre as 129 famílias de GH relatadas neste estudo, às subfamílias GH3, GH2 e GH43 que codificam enzimas degradadoras de oligossacarídeos foram mais abundantes e representadas por 4.279, 8.969 e 4.894 *reads*, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise comparativa das principais famílias de GH, as quais participam da desconstrução da parede celular das plantas, identificadas no metagenoma do rúmen de ovinos com outros metagenomas de herbívoros.

Família CAZy ^a	Principal Função	Ovelha	HF cross ^b	Vaca Jersey ^c	Gado ^d	Rena ^e	Termite ^f	Macropod ^g
Celulases								
GH5	endoglucanases	7,87	6,95	10,53	7,88	5,56	14,62	3,72
GH6	endoglucanases	0,13	0,1	0,44	0	0	0	0
GH7	endoglucanases	0,11	0	0	0,01	0	0	0
GH9	endoglucanases	3,06	3,16	3,51	4,32	2,11	2,35	0
GH44	endoglucanases	0,37	0,09	0	0,54	0,1	1,57	0
GH45	endoglucanases	0,26	0,19	0	0,62	0	1,04	0
GH48	carboidrolases	0,20	0,19	0	0,02	0,1	0	0
Subtotal		12,00	10,67	14,47	13,39	7,87	19,58	3,72
Endo-hemicelulases								
GH8	endoxilanasase	1,12	1,14	0,00	1,79	0,68	1,31	0,37
GH10	endo-1,4- β -xilanasases	4,08	2,03	15,35	5,57	3,68	12,01	4,09
GH11	xilanasases	0,51	0,29	0	0,9	0,16	3,66	0
GH12	xiloglucanases	0,09	0,53	0,44	0	0	0	0
GH26	B-mannanase e xilanasases	1,81	1,16	0,44	2	2,97	3,92	1,86
GH28	galactorunases	4,03	2,57	0	2,56	2,33	1,57	0,74
GH53	endo-1,4- β -galactanase	2,40	10,19	7,89	2,62	2,42	3,13	3,35
Subtotal		14,04	17,92	24,12	15,45	12,23	25,59	10,41
Xilanoglucanases								
GH16	xiloglucanases	1,81	2,53	0	2,62	2,25	0,26	1,49
GH74	xiloglucanases	2,25	0,45	0	2,09	0,85	1,83	0,37
Subtotal		4,06	2,98	0	4,72	3,1	2,09	1,86
Enzimas de desconstrução								
GH51	α -L-arabinofuranosidases	5,30	0,48	0,44	6,79	9,46	4,7	4,46
GH54	α -L-arabinofuranosidases	0,38	3,47	0	0,41	0,45	0	0
GH62	α -L-arabinofuranosidases	0,17	0	0	0,01	0	0	0
GH67	α -glucuronidases	1,93	0,98	0	0,65	1,43	6,61	1,86
GH78	α -L-ramnosidases	7,41	3,38	5,7	6,85	6,07	0	9,29
Subtotal		16,16	8,31	6,14	14,7	17,4	7,31	15,61
Enzimas de degradação de Oligossacarídeos								
GH1	β -glucosidases	1,43	2,17	4,39	1,37	2,36	5,74	22,68
GH2	β -galactosidases	20,72	15,99	7,02	7,8	13,88	6,01	8,92
GH3	β -glucosidases	9,88	17,12	21,05	15,45	16,36	18,02	26,77
GH29	α -L-fucosidases	4,38	2,45	1,32	5,1	5,19	0	0,74

Tabela 4 -Continuação

Família CAZy ^a	Principal Função	Ovelha	HF cross ^b	Vaca Jersey ^c	Gado ^d	Rena ^e	Termite ^f	Macropod ^g
GH35	β -galactosidases	1,67	1,12	0,88	0,86	0,76	0,78	1,12
GH38	α -mannosidases	0,67	0,79	0,44	1,48	2,25	2,87	1,12
GH39	β -xilosidases	1,84	7,28	7,89	1,71	1,47	0,78	0,37
GH42	β -galactosidases	2,75	0,45	0	2,03	1,84	6,27	2,97
GH43	arabino/xilosidases	11,30	12,74	12,28	15,93	15,25	4,18	3,72
GH52	β -xilosidases	0,07	0	0	0,01	0,04	0,78	0
Subtotal		68,97	60,11	55,26	51,75	59,4	45,43	68,4
Total		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Tamanho do metagenoma (Gb)		4.69	1.8	0,28	268	0,30	0,062	0,054

A tabela contém a porcentagem das diferentes famílias de GH que atuam na degradação dos polissacarídeos da parede celular das plantas e suas principais funções. (a) Anotação com base no banco de dados CAZy; (b) Jose *et al.*, 2017; (c) Wang *et al.*, 2013; (d) Hess *et al.*, 2011; (e) Pope *et al.*, 2012; (f) Warneke *et al.*, 2007; (f) Pope *et al.*, 2010.

4.3. Montagem *de novo* dos *contigs* para recuperação de genes codificadores de proteínas envolvidas na degradação da biomassa vegetal

Para recuperação de genes completos que codificam proteínas envolvidas na desconstrução da biomassa vegetal foram realizados testes de montagem *de novo* em três diferentes montadores, incluindo CLC Bio, SPADE e IDBA. Na seleção da melhor montagem foram observados e comparados três principais parâmetros: total de pares de bases, N50 e o tamanho do maior *contig* montado. Todas as montagens apresentaram resultados similares nos três parâmetros avaliados com exceção do número total de pares de base da montagem do SPADE que resultou em um valor bem inferior quando comparado com os demais montadores, sendo o primeiro a ser descartado na utilização das montagens por utilizar um número reduzido de *reads* do sequenciamento metagenômico. O montador selecionado para as etapas de montagem dos *contigs* e seleção dos genes completos foi o CLC por apresentar o tamanho dos maiores *contigs* montados um pouco superior aos demais montadores sendo um resultado de interesse por aumentar a chance da recuperação dos genes com sequências completas (Figura 22).

Uma vez selecionado o *software* CLC para a montagem *de novo* dos *contigs* foi realizada a avaliação da qualidade dos dados do sequenciamento, montagem, anotação e predição funcional. Uma checagem inicial da qualidade das sequências obtidas no sequenciamento metagenômico foi feita verificando-se a distribuição obtida no comprimento de *reads*. A análise revelou que grande parte das sequências apresentou comprimento >300 pb em todas as seis amostras (Figura 23) após as sequências serem submetidas à trimagem.

Figura 22 - Resultados das montagens *de novo* pelos softwares CLC Genomics Workbench, SPADE e IBDA nos três principais parâmetros: total de pares de bases, N50 e o tamanho do maior *contig* montado.

Figura 23 - Distribuição dos comprimentos dos *reads* resultantes dos dados do sequenciamento metagenômico pela plataforma MiSeq Illumina e inseridos no software CLC Genomics Workbench. Os gráficos A, B e C representam, respectivamente, os *reads* provenientes do sequenciamento metagenômico dos animais I5F, II5F E II5F do tratamento controle (Dieta 1) e os gráficos D, E e F representam, respectivamente, os *reads* provenientes do sequenciamento metagenômico dos animais IV5F, V5F E VI5F do tratamento acrescido de bagaço de cana-de-açúcar (Dieta 2).

Para a trimagem das sequências foram testados diferentes valores dos parâmetros *Quality score* (0,025 e 0,05) que é baseada na qualidade das sequências avaliadas pelo *Phred quality score*, uma escala de pontuação originalmente empregada pela ferramenta *Phred*, desenvolvida para a automação do sequenciamento do projeto Genoma Humano (*Phrap: Phred Quality Base Calling*) e

selecionado o valor 0,025 por ser descrito como mais restrigente e mais indicado em montagem metagenômicas.

Após a análise da qualidade das sequências e a realização do pré-processamento foi realizado a montagem *de novo* dos *contigs*. A estratégia utilizada para a montagem dos *contigs* foi a junção dos conjuntos de dados por tratamento a fim de aumentar a quantidade de sequências durante a montagem, proporcionando desta maneira, maiores chances de recuperar genes completos. Primeiramente, para padronizar o tamanho das sequências e eliminar as sequências muito curtas, foi utilizado o comando “*Filter sequences by length*”, que selecionou sequências com tamanho mínimo de 50 bases. Para uma montagem confiável e que apresente o menor número de erros assim como maior número de *contigs* com o menor número de perdas de sequências foram testados diversos valores para o parâmetro *Word Size* (30, 40, 50, 60, 31, 41, 51 e 61). Valores ímpares no *Word Size* tem apresentado uma redução de sequências palindrômicas durante a montagem de acordo com os testes do grupo de pesquisa orientado pelo Dr. André Oliveira de Souza Lima, conduzidos na Universidade do Vale do Itajaí, portanto, foram incluídos na montagem.

A qualidade de uma montagem normalmente é medida pela estatística N50. O cálculo do valor de N50 é realizado através da soma dos maiores *contigs*, até que o valor da soma atinja a metade do tamanho total da montagem. Assim o N50 é definido pelo último *contig* somado deste conjunto (Yandell e Ence, 2012). Este valor é um dos valores indicativos da qualidade da montagem do genoma, bem como outros valores, como o número de *contigs*, tamanho do maior *contig* e quantidade total de pares de base. A melhor montagem entre os valores testados, utilizando os *reads* de todos os animais do tratamento com a Dieta 1, foi a montagem com WS 31 que apresentou valores de N50 igual a 678, cobertura 706, tamanho do maior *contig* 20.511 e um total de 30.115 *contigs* (Tabela 5). Na amostra proveniente de todos os animais do tratamento com a Dieta 2, também foi escolhida a montagem com WS 31 que a análise revelou valor de N50 igual a 694, cobertura 711 e um total de 88.162 *contigs*, sendo o maior deles com tamanho de 39.504 pb. No geral, quanto maior o valor do *Word Size* e menor o valor do *Quality Score* mais restrigente é a montagem e com isso menor número de *reads* utilizados, menor a quantidade de *contigs* montados, menor tamanho e, principalmente, menor os valores do N50, que é o principal valor indicativo da qualidade, porém, é necessário sempre associar ao tamanho máximo do *contig*.

Tabela 5 - Resultado das montagens *de novo* pelo software CLC Genomics Workbench utilizando os parâmetros pré-definidos de *Quality Score* 0.025 e teste de diferentes *Word Size* 31, 41, 51, 61 30, 40, 50 e 60. As combinações que resultaram em uma melhor montagem estão indicadas na tabela em cinza.

Animais	Tamanho global	N50	Mínimo	Máximo	Cobertura	Contagem	Total
Dieta 1	30	678	174	20.511	706	30.115	21.254.403
Dieta 1	40	680	213	13.519	708	25.829	18.292.288
Dieta 1	50	680	240	13.372	706	22.306	15.759.053
Dieta 1	60	674	293	11.996	699	19.794	13.828.420
Dieta 2	30	696	108	39.544	711	88.668	63.075.452
Dieta 2	40	687	169	40.548	704	81.052	57.048.978
Dieta 2	50	679	178	39.497	698	71.026	49.568.192
Dieta 2	60	670	248	39.544	689	62.517	43.090.435
Dieta 1	31	678	96	20.511	706	29.635	20.930.456
Dieta 1	41	680	213	13.519	708	25.409	18.001.406
Dieta 1	51	679	266	13.372	706	22.015	15.543.488
Dieta 1	61	673	39	11.996	698	19.492	13.606.390
Dieta 2	31	694	122	39.504	711	88.162	62.642.159
Dieta 2	41	686	170	40.548	703	79.887	56.193.494
Dieta 2	51	678	178	39.497	697	70.257	48.952.570
Dieta 2	61	669	215	39.486	689	61.512	42.353.857

Os dados pré-processados pelo CLC apresentaram uma variação na quantidade de sequências de *reads* entre os animais, dado esperado por conta da diferença na quantidade de sequências geradas em cada amostra (Figura 23 e Tabela 6). Por exemplo, o animal I5F apresentou a menor quantidade de *reads* após controle de qualidade (857.102) e o animal IV5F apresentou maior quantidade de *reads* (2.953.664) (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo das sequências após a montagem dos *contigs* com o valor de *Word size* em 31 para anotação funcional no software CLC Genomics Workbench.

Saída do sequenciamento	Dieta 1: Controle			Dieta 2: Cana-de-açúcar		
	I5F*	II5F	III5F	IV5F	V5F	VI5F
Número total de <i>reads</i>	859.056	2.249.354	1.063.444	2.954.790	1.552.748	2.065.158
Número total de <i>reads</i> pós QC	857.102	2.246.468	1.060.172	2.953.664	1.552.114	2.064.224
	Dieta 1: Controle			Dieta 2: Cana-de-açúcar		
Número total de <i>reads</i> pós QC	4.163.742			6.570.002		
Número total de pares de base	754.591.490			1.406.843.007		
Número de <i>reads</i> utilizados	514.254			1.222.755		
N50	678			694		
Tamanho máximo	20.511			39.504		
Numero de <i>contigs</i>	29.635			88.162		

Os dados resultantes da montagem dos *contigs* indicaram a utilização de aproximadamente 12% dos *reads* nas amostras do tratamento com a dieta 1 e 18% nas amostras da Dieta 2. O montante inicial gerado dentre as seis amostras foi 10.733.744 *reads* sendo utilizados para a montagem dos *contigs* apenas 1.737.009 *reads* (Tabela 6).

4.4. Anotação dos *contigs*, seleção e amplificação dos genes codificadores de proteínas envolvidas na degradação da parede celular.

A anotação, realizada no *software* CLC Genomics Workbench e baseada no *Blast* das ORFs traduzidas contra o banco de dados do CAZy, resultou em 15 diferentes genes completos codificados nas subfamílias GH1, GH2, GH3, GH16, GH20, GH25, GH32, GH97 e GH127. A maioria das sequências apresentou um tamanho entre 300 e 450 aa, entretanto três delas se destacaram por apresentar um tamanho superior às demais, GH2 (771 pb), GH20 (648 pb) e GH127 (611 pb). Quando os genes selecionados foram submetidos à ferramenta *Blastp* no NCBI com o intuito de avaliar a identidade, a grande parte apresentou um valor superior a 75%, porém, seis dos 15 genes listados apresentaram um valor de identidade inferior a 40%, o que pode indicar a descoberta de novos genes ou que apesar desses genes apresentarem função semelhante a outros genes da mesma subfamília de GH, estes podem conter sequências de com uma diferença grande entre os demais comparados (Tabela 7).

Tabela 7 - Lista de enzimas lignocelulolíticas completas recuperadas a partir das montagens dos *contigs*. As análises de similaridade e identidade foram realizadas com a ferramenta *BlastP* no NCBI.

ID do gene	Família CAZy	Comprimento(aa)	Principal proteína semelhante	Identidade
ORF 180	GH3	446	auxin-responsive promoter	82%
ORF 21	GH2	771	β -mannosidase;	83%
ORF 615	GH16	341	β -glucanase;	29%
ORF 793	GH25	316	Lysozima	36%
ORF 802	GH25	313	Lysozima	32%
ORF 804	GH97	313	α -glucosidase	94%
ORF 49	GH20	648	β -hexosaminidase	79%
ORF 113	GH3	526	auxin-responsive promoter	80%
ORF 400	GH97	390	α -glucosidase	80%
ORF 474	GH25	377	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	33%
ORF 119	GH127	611	Acetyltransferase	40%
ORF 728	GH20	405	β -hexosaminidase	85%
ORF 1350	GH32	339	Sucrose-6-phosphate hydrolase	36%
ORF 1877	GH1	309	Xylanase	87%
ORF 1916	GH25	307	Lysozyme	51%

Três dos 15 genes completos recuperados das montagens dos *contigs* foram selecionados para a etapa de amplificação. A seleção foi realizada com base na análise dos domínios conservados, tamanho das sequências e sequência do *codon* de iniciação (ATG), sendo os genes GH2 (ORF 21) que codifica uma β -mannosidase, GH16 (ORF 615) que codifica uma β -glucanase, GH25 (ORF793 e ORF802) que codifica lisozima. Todos os genes apresentaram o Domínio conservado completo e a arquitetura do domínio conservado semelhante aos domínios do banco de dados do NCBI (Figuras 24, 25 e 26).

Figura 24 - Sequência *contig* que contém o gene que codifica a enzima GH2 e análises da arquitetura e do domínio conservado. (A) *Contig* contendo o gene GH2, em azul está representada a região codificadora e em cinza a posição dos *primers* externos, (B) Análise do domínio conservado do gene e (C) Arquitetura do domínio conservado.

Os pares de *primers* utilizados na amplificação dos genes selecionados foram desenhados com base nas sequências dos *contigs* montados a partir dos dados metagenômicos do rúmen de ovinos e anotados contra o banco de dados CAZy e NCBI (Figuras 25A, 26A e 27A). Todos os três genes selecionados foram recuperados da montagem que utilizou as sequências dos animais alimentados com a dieta enriquecida com o bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 25 - Sequência *contig* que contém o gene que codifica a enzima GH16 e análises da arquitetura e do domínio conservado. (A) *Contig* contendo o gene GH16, em azul está representada a região codificadora e em cinza a posição dos *primers* externos, (B) Análise do domínio conservado do gene e (C) Arquitetura do domínio conservado.

Figura 26 - Sequência *contig* que contém o gene que codifica a enzima GH25 e análises da arquitetura e do domínio conservado. (A) *Contig* contendo o gene GH25, em azul está representada a região codificadora e em cinza a posição dos *primers* externos, (B) Análise do domínio conservado do gene e (C) Arquitetura do domínio conservado.

Foram realizados três testes diferentes de amplificação com diferentes parâmetros, como temperatura e tempo, diferentes quantidades de reagentes na reação e diferentes concentrações de DNA (Figuras 27 e 28).

Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose a 1% da reação de amplificação dos genes selecionados. (A) *Primers* externos e internos desenhados para o gene GH2, (B) *Primers* externos e internos desenhados para o gene GH16, (C) *Primers* externos e internos desenhados para o gene GH25. A letra M representa o marcador molecular Low Mass (Invitrogen), a letra B o branco da reação. Para as reações números 1, 2 e 3 foram utilizados 5 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C respectivamente. Para as reações 4, 5 e 6 foram utilizados 10 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 7, 8 e 9 foram utilizados 20 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 10, 11 e 12 foram utilizados 5 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 13, 14 e 15 foram utilizados 10 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. Para as reações 16, 17 e 18 foram utilizados 20 ng de DNA com as temperaturas 55°C, 57°C e 59°C, respectivamente. As reações de 1 a 9 foram feitas com os *primers* externos e as reações de 10 a 18 com os *primers* internos.

Entretanto, não foi possível recuperar *amplicons* dos genes alvo em nenhum dos testes executados (Figuras 27 e 28). No segundo teste foi observada a presença de bandas inespecíficas, com tamanhos entre 600-250 pb aproximadamente, porém, nenhuma delas apresenta o tamanho esperado para as bandas dos genes de interesse (comprimentos dos genes: GH2 2.313 pb, GH16 1.023 pb e GH25 948 pb). Desta forma, foi descartada a possibilidade de um alvo de amplificação passível de clonagem (Figura 28).

Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose a 1%. (A) Amplificação do gene GH2 utilizando os *primers* externos desenhados para o gene GH2. Para as reações 1, 2 e 3 foi utilizada a temperatura de 55°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Para as reações 4, 5 e 6 foi utilizada a temperatura de 57°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Para as reações 7, 8 e 9 foi utilizada a temperatura de 59°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Para as reações 10, 11 e 12 foi utilizada a temperatura de 61°C, e as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. A letra M representa o marcador molecular, a letra B o branco da reação. (B) Amplificação dos genes selecionados utilizando os *primers* externos desenhados de acordo com a metodologia. Em todas as amplificações foi utilizada a temperatura de anelamento em 55°C. Nas reações 1, 2 e 3 foi feita a tentativa de amplificação do gene GH2 utilizando as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Nas reações 4, 5 e 6 foi feita a tentativa de amplificação do gene GH16 utilizando as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. Nas reações 7, 8 e 9 foi feita a tentativa de amplificação do gene GH25 utilizando as concentrações de 10 ng 20 ng e 40 ng de DNA respectivamente. A letra M representa o marcador molecular Low Mass (Invitrogen), a letra B o branco da reação.

5. DISCUSSÃO

O microbioma do rúmen é um ecossistema único que contém uma relação simbiótica complexa entre microrganismos e microrganismo hospedeiro, além de um sistema eficiente na despolimerização da biomassa vegetal (Hungate, 1966). Há várias décadas, uma vasta quantidade de estudos tem sido realizada com o intuito de isolar microrganismos fibrolíticos e identificar enzimas degradadoras de biomassa vegetal a partir do rúmen (Flint *et al.*, 2008). A aplicação biotecnológica de microrganismos que atuam na desconstrução da biomassa vegetal e suas respectivas enzimas com ação lignocelulolítica têm despertado grandes interesses na área acadêmica e industrial. Com a evolução das metodologias da biologia molecular e da bioinformática com abordagens da genômica, metagenômica, transcriptômica e metatranscriptômica tornou-se possível o acesso mais profundo dessa comunidade pelo fato de não depender somente de técnicas de cultivo.

A comunidade microbiana no rúmen é altamente dinâmica e este fato está associado à dieta, disponibilidade de nutrientes e a redundância funcional. A estrutura dessa comunidade é classificada em três conjuntos de microrganismos: i) microrganismos associados à fibra, ii) microrganismos associados à fase líquida e iii) microrganismos associados ao tecido animal (Larue *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Sadet *et al.*, 2007), sendo que os microrganismos degradadores de biomassa são mais abundantes quando associados à fibra ruminal (Craig *et al.*, 1987), este conjunto de microrganismos desempenha o papel mais importante na digestão alimentar (McAllister *et al.*, 1994). Dessa forma, foram sequenciadas apenas as amostras obtidas a partir das fibras coletadas do rúmen.

5.1. Eficiência do sequenciamento e qualidade dos dados

O sequenciamento total do rúmen (*shotgun metagenomics sequencing*) produziu uma quantidade de *reads* de aproximadamente 10 milhões, com comprimento médio de 150 pares de base (pb), totalizando 6.2 Gb de dados (Tabela 4; Figura 7).

Ross e colaboradores (2012), realizaram o sequenciamento metagenômico na plataforma Illumina GAIIx de onze amostras do fluido do rúmen provenientes de três vacas leiteiras, resultando em 6 milhões de *reads*, com comprimento médio de 146 pb, em cada amostra. Após o filtro de qualidade dos dados, com base nos escores de qualidade do *Phred*, foram mantidos 91,5% do total dos pares de base, e 99,08% (91,9 milhões no total) dos *reads* foram mantidos (comprimento médio dos *reads* após o corte: 135 pb).

No estudo metagenômico de enzimas fibrolíticas provenientes do rúmen de gado alimentado com palha de milho, a parte sólida e líquida do rúmen de três animais foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq, resultando em um total de 171.594 sequências, totalizando aproximadamente 1.8 Gb de dados. Após o filtro de qualidade dos dados foram mantidos 94,57% dos *reads* e a anotação funcional utilizando o subsistema SEED identificou uma média de 113.337 funções preditas (Jose *et al.*, 2017).

No presente estudo, utilizando a plataforma Illumina MiSeq, foi gerada uma quantidade bruta de *reads* variando de 850.00 a 3.000.000 por amostra, sendo inferior aos resultados encontrados por Ross (2012), porém uma quantidade de dados superior ao estudo de Jose (2017), o qual utilizou a mesma plataforma de sequenciamento. Entretanto, após o filtro de qualidade do metagenoma (DNA total), a quantidade final de *reads* apresentou mesma proporção, com média de 99,87% dos *reads* mantidos e com comprimento médio de 185,6 pb entre os animais alimentados com a dieta 1 e 217,3 pb entre os animais alimentados com a dieta 2, acrescida de bagaço de cana-de-açúcar. A anotação funcional utilizando o subsistema SEED identificou uma média de 113.337 funções preditas para os animais alimentados com a dieta 1 e 212.127 funções preditas para os animais alimentados com a dieta 2 (Tabela 4).

Diferentes plataformas são utilizadas para o sequenciamento metagenômico gerando quantidades de dados distintas dependendo da estratégia. Whitley e colaboradores (2012) utilizaram a plataforma PGM Ion Torrent para o sequenciamento metagenômico para acessar a comunidade microbiana de dejetos suínos. Eles obtiveram uma quantidade aproximada de 650.000 *reads* na saída bruta utilizando o chip 314 e por volta de 2.5 milhões de *reads* com o chip 316. Após o filtro de qualidade, o número de *reads* foi reduzido para 350.000 com o chip 314 e 1,2 milhões com o chip 316. Lopes e colaboradores (2016) utilizaram o chip 316 que resultou em uma quantidade bruta de *reads* de 2,25 milhões. Após o filtro de qualidade, o número de *reads* foi reduzido para 1,4 milhão. Sing e colaboradores (2014) também utilizando a plataforma PGM Ion Torrent sequenciaram o metagenoma da parte sólida e líquida do rúmen de búfalos obtendo uma quantidade de dados de aproximadamente 1.788,1 *reads* para a parte líquida do rúmen e 2.126,9 *reads* para a parte sólida do rúmen.

Pope e colaboradores (2012) realizaram o sequenciamento metagenômico do rúmen de renas de Svalbard para acessar a função da comunidade microbiana, obtendo aproximadamente 503 Mb de *reads* gerados a partir do pool de DNA de dois animais. Wang (2013) gerou 0,28 Gb de dados provenientes do sequenciamento metagenômico do rúmen de bovinos para acessar enzimas ativas em carboidrato de microrganismos aderidos à parte sólida. Em estudo recente,

para acessar a comunidade microbiana do rúmen de vacas foram gerados 268 Gb de dados (Hess *et al.*, 2011), um valor muito superior aos valores observados nos demais trabalhos descritos.

O gráfico das curvas de rarefações incluiu todas as seis amostras do sequenciamento metagenômico, e indicou uma alta robustez com relação à qualidade do sequenciamento para o estudo da ecologia microbiana no presente trabalho (Figura 8). O animal I5F mostrou uma discrepância em relação ao padrão dos demais, com menor riqueza de espécies, porém o segundo maior índice de Shannon (270.60), o que sugere a presença de menos espécies raras, possuindo maior regularidade na abundância das espécies que contém. Como o algoritmo do índice de diversidade de Shannon leva em consideração não só a contagem de espécies (riqueza), mas a regularidade de todas as espécies contadas (Lemos *et al.*, 2011) então os valores de alta diversidade e baixa riqueza só podem ser explicados por uma menor quantidade de espécies raras na amostra de menor riqueza, sendo a recíproca verdadeira.

As curvas de rarefação indicam boa cobertura de espécies, porém a amostra do animal III5F apresentou menor riqueza de espécie e menor índice de diversidade em relação às outras. As curvas mostram diferenças na estrutura da comunidade microbiana entre os diferentes animais, com valores de riqueza e índices de diversidade distintos ainda que próximos. Jami e Mizrahi (2012) caracterizaram a comunidade bacteriana do rúmen de dezesseis vacas em lactação, utilizando o pirosequenciamento de *amplicons*, o qual também foi observado uma perceptível diferença na curva de rarefação entre os animais avaliados. As curvas de rarefação mostraram que foram necessários dez animais para saturar o número de OTU's presentes em suas amostras de rúmen bovino (Jami e Mizrahi, 2012).

5.2. Análise taxonômica dos dados do sequenciamento metagenômico do rúmen de ovinos

Estudos sobre a ecologia microbiana ainda se mostram insuficiente quando utilizadas técnicas para o isolamento e cultivo dos microrganismos, mesmo essas técnicas tendo apresentado aprimoramentos significativos nos últimos anos, considerando que grande parte dos microrganismos não são passíveis de cultivo (Amann *et al.*, 1995; Schloss e Handelsman, 2003). Handelsman e colaboradores (1998) pela primeira vez definiram o termo “metagenômica” para descrever a aplicação de técnicas genômicas modernas no estudo de comunidades microbianas derivadas diretamente do ambiente natural, sem a necessidade do isolamento e cultivo de espécies individuais. O termo foi derivado do conceito estatístico de meta-análise e genômica (Schloss e Handelsman, 2003).

Na descoberta de novas moléculas ativas, a dinâmica da abordagem metagenômica e os avanços da computação científica são fatores que convergem para transformar a análise numa tarefa mais importante e desafiadora que a própria geração de dados (Meyer *et al.*, 2008). Nesse sentido, o MG-RAST destaca-se como uma ferramenta capaz de promover uma metodologia sistemática, pois abriga mais de 29 trilhões de nucleotídeos de informação, divididos em 85 mil metagenomas. Aproximadamente 5,3 trilhões de pares de bases compõem os mais de 12 mil metagenomas que estão disponíveis para a consulta pública (Wilke *et al.*, 2012).

O servidor é mantido pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos e permite o depósito e a pesquisa de metagenomas, além de comparação das sequências de nucleotídeos resultantes com os principais bancos de dados públicos do mundo. Essas comparações retornam informações funcionais ou taxonômicas, que são tratadas por uma ferramenta computacional que elimina respostas redundantes (Wilker *et al.*, 2012).

Estudos da ecologia microbiana do rúmen e sua composição taxonômica em diferentes espécies de ruminantes vêm crescendo principalmente na última década. Os principais ruminantes estudados são os bovinos, possivelmente por apresentarem relevante importância econômica (Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Brulc *et al.*, 2009; Jami e Mirazhi, 2012). Estudos utilizando caprinos (Lee *et al.*, 2012), ovinos (Lopes *et al.*, 2014; Romagnoli *et al.*, 2016), bubalinos (Singh *et al.*, 2012) e renas (Pope *et al.*, 2012) também estão presentes na literatura. A soma de todas as atividades microbianas no rúmen é de grande importância, pelo fato de se conhecer a riqueza deste ecossistema (Edwards *et al.*, 2004) e a dinâmica da sua comunidade microbiana é alta e este fato está associado ao material alimentar, disponibilidade de nutrientes e a redundância funcional.

Nos diversos estudos realizados a respeito da ecologia microbiana do rúmen e a composição taxonômica nos mais variados ruminantes, pode-se notar, que apesar de algumas diferenças entre os diversos ruminantes e entre os tratamentos aplicados aos animais em cada estudo, no geral, os resultados encontrados no presente trabalho são compartilhados pela grande parte dos ruminantes estudados até o momento.

Na anotação taxonômica foi observado que 96% das sequências foram anotadas no domínio Bactéria, uma pequena fração de Archeia (~1-3%) e menos de 2% de Eucarioto, Vírus e organismos não classificados (Figura 9), resultado semelhante ao encontrado por Jose e colaboradores (2017), na análise da filogenia do metagenoma de gado que revelou 97,5% de sequências anotadas no domínio Bactéria, 1,3 de Archeia e 0,9% de Eucariotos. Esses resultados são esperados uma vez que, em número de células, as bactérias são os microrganismos mais abundantes no ecossistema de ruminantes, representando acima de 95% (Brulc *et al.*, 2009).

Como observado na figura 9, que apresenta filos bacterianos presentes em todas as seis amostras do microbioma do rúmen, foi possível perceber a dominância do filo Bacteroidetes, seguido predominantemente dos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, além da presença de outros filos com uma menor abundância com relação à anotação das sequências.

Os filos Bacteroidetes e Firmicutes são dominantes no ecossistema microbiano ruminal (Dodd; Mackie; Cann, 2011; Edwards *et al.*, 2004, Edwards *et al.*, 2005). 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 *et al.*, 2001; Wongwilaiwalin *et al.*, 2013), o qual explica a alta presença deste filo nas amostras analisadas.

Segundo estudos realizados por Kim e colaboradores (2011), na análise da taxonomia de microbiomas ruminais o filo Firmicutes mostra-se muito mais diverso e predominante do que o filo Bacteroidetes. Entretanto, as abundâncias relativas desses dois importantes filos variam entre os estudos de diversidade microbiana (Whitford *et al.*, 1998; Larue *et al.*, 2005; Ozutsumi *et al.*, 2005; Brulc *et al.*, 2009). Lee e colaboradores (2012) avaliaram variações taxonômicas entre diferentes animais, em estudo utilizando duas raças de bovinos e uma de caprino. As análises estatísticas apresentaram diferença significativa entre a estrutura da comunidade bacteriana, principalmente dos caprinos em relação aos bovinos. Porém todos os animais apresentaram uma dominância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes respectivamente, assim como o observado no presente trabalho. Os filos Fibrobacteres, Proteobacteria e Actinobacteria são menos abundantes, porém representam uma importante fração no microbioma ruminal. Nesses filos menos abundantes, foi possível observar diferença significativa entre o rúmen dos caprinos, o qual houve menor presença de Fibrobacteres e maior presença de Proteobacterias e Actinobacterias, respectivamente, quando comparado ao rúmen de bovinos. Esta característica pode ser observada nos animais estudados no presente trabalho, permitindo inferir uma maior proximidade entre a composição taxonômica no rúmen de caprinos e ovinos, do que do rúmen de bovinos.

Por outro lado, as variações observadas na ecologia microbiana entre diferentes ruminantes podem também ser justificadas pelas diferenças nos *primers* utilizados (Edwards *et al.*, 2004), frações (líquido e sólido) do rúmen analisadas, pelos métodos de extração de DNA e nos métodos de sequenciamento (Laser *et al.*, 2002).

Pope e colaboradores (2012) demonstraram a dominância na abundância bacteriana dos filos Bacteroidetes e Firmicutes em estudos do microbioma do rúmen de renas Svalbard realizado a partir do sequenciamento metagenômico de biblioteca de clones. A presença dos filos

Actinobacteria e Proteobacteria também foi descrita em quantidades significativamente mais baixas.

Lopes e colaboradores (2015) acessaram o microbioma do rúmen de 4 animais alimentados com uma mesma dieta através de abordagens do sequenciamento do gene 16S rRNA e do sequenciamento metagenômico total do DNA. Em ambas as abordagens os filos dominantes identificados foram Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria respectivamente. Apenas um dos animais foi observado uma inversão de abundância entre os filos Firmicutes e Bacteroidetes. Essa mesma inversão, foi observada em um estudo do rúmen de ovinos (Perumbakkam *et al.*, 2011) e também no estudo do microbioma do rúmen de bovinos baseado no pirosequenciamento e no sequenciamento de genes de 16S rRNA (Brulc *et al.*, 2009).

Em trabalho anterior, Romagnoli (2016) realizou análises taxonômicas, com sequenciamento de *amplicons* das regiões V3 e V6 do 16S rRNA, do rúmen dos seis ovinos do mesmo experimento apresentado neste estudo, em diferentes períodos (15, 30, 45 e 60 dias após o início da oferta das dietas). Ambas as análises no período de 60 dias apresentaram os filos Bacteroidetes (V3: 48% e V6: 44%) e Firmicutes (V3: 28% e V6: 40%) sendo os mais abundantes. No presente trabalho foram observados valores próximos sendo Bacteroidetes (~44%) e Firmicutes (~28%), porém a abundância do filo Proteobacteria no sequenciamento metagenômico foi maior (~14% *vs* 1% na região V3 e não foi observado na região V6).

Os filos Bacteroidetes e Firmicutes, com base na região V3 e na região V6-7 do gene 16S rRNA foram mais abundantes em todas as amostras estudadas, porém não apresentaram diferença significativa ao longo dos dias e entre os tratamentos (Romagnoli, 2016). Quando analisada a diferença no mesmo tratamento ao longo dos dias observa-se que a abundância relativa de Bacteroidetes na fibra ruminal dos animais alimentados tanto com a Dieta 1 (controle) como com a Dieta 2, foi significativamente maior no primeiro e 60 dias após o início do tratamento quando comparada com os demais períodos (Romagnoli, 2016). O mesmo padrão foi confirmado no presente trabalho utilizando a abordagem metagenômica aplicada nas amostras da porção fibrosa do rúmen no período dos 60 dias. Com base na comparação dos resultados das diferentes estratégias utilizadas (Sequenciamento do gene 16S e sequenciamento metagenômico), pode-se inferir que ambas as técnicas possibilitam um acesso similar na comunidade microbiana do rúmen de ovinos.

A colonização desses dois principais filos no rúmen ocorre via lactação já nas primeiras horas de vida do animal, entretanto estudos recentes, utilizando uma abordagem metagenômica, indicam também a predominância do filo Proteobacteria nos estágios iniciais em bezerros (Jami e Mizrahi, 2012). Os filos Firmicutes e Bacteroidetes são moldados ao longo da vida do animal e

se tornam predominantes com a transição da dieta do leite materno para a forragem no primeiro e segundo ano de vida (Li *et al.*, 2012; Jami *et al.*, 2013). A abundância de Firmicutes em ruminantes está diretamente ligada à quantidade de fibra na dieta (Pitta *et al.*, 2014), entretanto, em camundongos criados em laboratórios observa-se o aumento de indivíduos pertencentes ao filo Firmicutes e uma diminuição de indivíduos pertencentes ao filo Bacteroidetes relacionado ao aumento de gorduras na dieta (Hildebrandt *et al.*, 2009). Resultado semelhante ao observado nas alterações de gordura na dieta de humanos assim como em vacas leiteiras (De Fillippo *et al.*, 2010; Jami *et al.*, 2013).

Membros do filo Bacteroidetes colonizam diferentes nichos ecológicos, incluindo solos, oceanos, água doce e principalmente trato gastrointestinal de animais, onde participam de várias funções biológicas (Thomas *et al.*, 2011). Sendo um dos mais diversos filos do rúmen, abrange quatro classes, Bacteroidia, Flavobacteria, Sphingobacteria e Cytophaga, as quais representam ~7.000 diferentes espécies (Thomas *et al.*, 2011).

5.3. Análise funcional dos dados do sequenciamento metagenômico do rúmen de ovinos

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. O recente avanço das tecnologias moleculares vem oferecendo a oportunidade de compreender os aspectos fundamentais da evolução e formação da comunidade microbiana. O uso das tecnologias genômicas e abordagens metagenômicas são promissores, uma vez que permite o acesso e a exploração dos microrganismos tanto cultivados, que representam menos de 1% da diversidade genética encontrada na natureza, como principalmente dos não cultivados (Qin *et al.*, 2010; Sogin *et al.*, 2006), oferecendo assim, maiores informações sobre a comunidade microbiana ambiental (Cowan *et al.*, 2005) e permitem a exploração do vasto potencial metabólico dos microrganismos não cultivados, a fim de descobrir novos genes responsáveis pela codificação de proteínas com sequências específicas (Chistoserdova, 2010).

As categorias funcionais mais abundantes descritas no presente trabalho foram o Metabolismo de carboidratos, Metabolismo de proteínas, Metabolismo de aminoácidos, Metabolismo de RNA e DNA, respectivamente (Figura 15), dados muito similares e sustentados por outros trabalhos que analisaram o metagenoma do rúmen, como descritos a seguir.

Lopes e colaboradores (2014) realizaram análise funcional do microbioma do rúmen utilizando dados de *shotgun* (Ion Torrent) provenientes de amostras de 16S rRNA de 4 animais alimentados com uma dieta basal, onde foi observadas as principais funções dominantes, Metabolismo de aminoácidos e Metabolismo de carboidratos. Outros dois trabalhos realizaram análises funcionais a partir de dados metagenômicos provenientes da tecnologia de sequenciamento 454 (pirosequenciamento) anotados com o banco de dados SEED Subsystems na plataforma MG-RAST. No metagenoma do rúmen cabras foram observadas as classes funcionais mais abundantes sendo Carboidratos totais, Metabolismo de proteínas, Metabolismo de Aminoácidos e Metabolismo de Parede celular e Cápsula (Jakhesera *et al.*, 2010). Nas análises do metagenoma do rúmen de búfalos foi observada uma maior abundância das classes: Metabolismo de carboidratos, Metabolismo de proteínas e Metabolismo de aminoácidos (Singh *et al.*, 2011).

O metabolismo de aminoácidos foi a terceira categoria funcional mais abundante encontrada. Sua abundância é devido à complexidade e diversidade de aminoácidos nas proteínas, que requerem ação sinérgica de um grande conjunto de enzimas proteolíticas. Além disso, a microbiota do rúmen abriga um grande número de espécies, que sintetizam, de forma contínua, uma grande diversidade de proteínas microbianas, fazendo com que o metabolismo de aminoácidos seja muito mais complexo do que o metabolismo de carboidratos (Bach *et al.*, 2005).

Sendo o rúmen um ambiente naturalmente enriquecido para a degradação da biomassa vegetal lignocelulótica e uma clara fonte potencial para descoberta de novas enzimas ativas na degradação da fibra vegetal, estudos desse sistema têm crescido cada vez mais (Selinger *et al.*, 1996). No entanto, a quebra da biomassa vegetal em açúcares simples para utilização industrial ainda é ineficiente e de alto custo devido à natureza recalcitrante da fibra vegetal, que dificulta a degradação, principalmente, da celulose (Adsul *et al.*, 2001; Himmel *et al.*, 2007). A biomassa derivada de plantas é basicamente constituída pelo conteúdo da parede celular vegetal, mais especificamente em celulose (cerca de 44%), hemicelulose (cerca de 30%) e lignina (cerca de 15%), que são polissacarídeos ricos em energia (Wen, *et al.*, 2009). Estes três componentes interagem entre si, se entrelaçando e formando uma estrutura rígida que aumenta a dificuldade de degradação da biomassa lignocelulósica (Yue *et al.*, 2012; Cosgrove, 2005).

A base de dados CAZy integra exclusivamente o grupo diversificado de enzimas que contribuem ativamente para síntese e degradação de carboidratos complexos. O banco de dados CAZy fornece informações com curadoria manual para todas as famílias do CAZyme: hidrolases glicosídicas, glicosil transferases, polissacarídeos liasases, esterases de carboidratos, módulos ligação de carboidratos e atividades auxiliares (Cantarel *et al.*, 2009). As enzimas que

codificam as famílias GH são altamente abundantes na maioria dos genomas e compoendo cerca de 50% das enzimas classificadas no banco de dados do CAZy. Entre todas as principais classes de CAZymes que foram relatadas, as hidrolases glicosídicas foram o grupo mais predominante e diversificado de enzimas catalíticas envolvidas na hidrólise de polímeros de plantas em metagenomas do rúmen.

As GHs representam as glicosidases e transglicosidases e são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas ligando dois ou mais carboidratos ou um carboidrato e uma fração não hidratada (Jose *et al.*, 2017). O número total de *contigs* obtidos em cada família CAZyme dá uma indicação da abundância desse grupo específico de enzimas no metagenoma do rúmen de ovinos. Das 135 subfamílias relatadas o banco de dados CAZy até o momento, foram representadas no metagenoma do rúmen de ovinos 129 subfamílias. Jose e colaboradores (2017) relataram cerca de 96 subfamílias e Patel (2014) relatou 72 famílias de GHs no ecossistema do rúmen de búfalo. O número substancialmente grande de enzimas da família GH (129 famílias) no presente estudo, pode ser, devido à diferença na plataforma de sequenciamento ou as modificações na linha de análise, uma vez que os trabalhos citados utilizaram a anotação dos *contigs* enquanto aqui foi utilizada a estratégia da anotação das *reads* com o intuito de avaliar a bundância e diferenças entre os tratamentos. Consideravelmente maior número de famílias de GH obtidas em nosso estudo também pode indicar que o rúmen de ovinos pode ter um processo mais intrincado de quebra de lignocelulose do que outros metagenomas de ruminantes.

Genes que codificam celulasas pertencentes às subfamílias GH5 e GH9 foram presentes em maiores proporções em outros metagenomas de ruminantes (Wang *et al.*, 2013; Stevenson e Weimer 2007; Pope *et al.*, 2012). Dai e colaboradores (2012) relataram a atividade de enzimas exoglucanase correspondentes à subfamília GH5 que também codificam endoglucanase, manana e atividades de endo-xilanase. O grande número de genes putativos para celulase identificados na subfamília GH5 (3.408 *reads*) em nosso estudo sugere que os microrganismos do rúmen ovinos podem apresentar novas estratégias para a degradação de polissacarídeos de plantas presente na alimentação. Estudos anteriores sobre metagenomas do rúmen não relataram nenhum *contig* atribuído à subfamília GH6, além de um *contig* do fosmídeo da biblioteca metagenômica de gado (Wang *et al.*, 2013; Jose *et al.*, 2017).

Todos os metagenomas de herbívoros relacionados ao presente estudo (Brulc *et al.*, 2009; Hess *et al.*, 2011; Pope *et al.*, 2012; Warnecke *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2011) não apresentaram sequências associadas à subfamília GH7 de celulasas, entretanto, no metagenoma do rúmen de ovinos observou-se 47 sequências codificadas nessa subfamília. Consequentemente, a escassa

representação de enzimas pertencentes à subfamília GH48 mostra as possibilidades da função celulosomal de hidrólise da parede celular da planta no rúmen não ser eficiente.

A despolimerização completa de polissacarídeos vegetais requer atividades coletivas de diferentes grupos de enzimas que não sejam GHs e estas incluem *Glycosyl Transferases* (GT), *Carbohydrate-Binding Modules* (CBM), *Auxiliary Activities* (AA), *Carbohydrate Esterases* (CE) e *Polysaccharide Lyases* (PLs). GTs, reportados como envolvidos na catálise de ligações glicosídicas para formar dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (Coutinho *et al.*, 2003; Lairson *et al.*, 2008), foram a segunda mais abundante família CAZy no rúmen de ovinos (24,85% das sequências anotadas). Noventa e sete subfamílias das GT foram identificadas no metagenoma do rúmen de ovinos. CBMs que foram o terceiro grupo mais abundante (12,6%) não apresentam atividade enzimática relatada por conta própria, mas pode atuar na potencialização das atividades de todos os outros grupos de CAZymes (GHs, CEs e enzimas auxiliares) (Tomme *et al.*, 1995; Boraston *et al.*, 2004).

Singh e colaboradores (2014) identificaram genes codificadores de proteínas que atuam na degradação de carboidrato a partir do sequenciamento metagenômico do DNA ruminal de búfalos, extraído da fase sólida do rúmen coletada seis semanas após o início da dieta dos animais. Foram encontrados 2.614 genes candidatos, sendo 1.943 genes distribuídos em 48 famílias GH, 124 genes em famílias CBM e 261 genes em famílias de enzimas de glicosil transferases (GT). A alta magnitude de glicosil transferase sugere o desenvolvimento de ação em processo de degradação da biomassa combinada, mostrando o potencial de busca de enzimas degradadoras de biomassa vegetal a partir do metagenoma do rúmen de búfalos (Singh *et al.*, 2014). Brulc e colaboradores (2009) encontraram diversas famílias GHs e vários CBMs, porém, em contraste com este trabalho, não foram identificadas as famílias GH6, CBM1 e CBM10. Alguns estudos têm usado bibliotecas metagenômicas para explorar o rúmen, por exemplo, Ferrer *et al.* (2005) identificaram 22 subfamílias GH em bibliotecas metagenômicas provenientes da microflora do rúmen de bovinos, e Wang *et al.* (2011) clonou 87 fragmentos de genes de xilanases provenientes do rúmen de cabras.

5.4. Efeito da alteração da dieta no microbioma do rúmen de ovinos

No presente estudo foi possível observar o enriquecimento funcional para a degradação da biomassa vegetal e do aumento da ocorrência de enzimas lignocelulolíticas através do efeito da manipulação da dieta de ovinos por meio da substituição parcial da fração volumosa por bagaço de cana-de-açúcar que contém uma biomassa vegetal com maior recalcitrância. Diversos fatores

podem influenciar o microbioma ruminal como, por exemplo, alterações na dieta, a idade do animal, o uso de antibióticos, a localização geográfica, estações do ano, saúde do animal e até mesmo a genética do hospedeiro (Koncherginkaya *et al.*, 2001; Li e Zhu, 2009), entretanto, mesmo com a influência desses fatores, Henderson e colaboradores (2015) sugeriram que o microbioma do rúmen é composto por um *core* que ainda é pouco caracterizado, especialmente o domínio Bactéria.

A comunidade microbiana presente no rúmen é responsável por executar funções essenciais para a nutrição e para o desenvolvimento dos ruminantes, sendo esses animais altamente dependentes de sua microbiota para o aproveitamento de uma dieta exclusivamente herbívora em uma relação mutualística (Duncan e Poppi, 2008). Apesar das alterações provenientes dos diversos fatores acima citados, o ambiente do rúmen apresenta uma alta redundância funcional entre os microrganismos ali presentes (Weimer, 2015), isso significa que diferentes espécies podem desempenhar mesma função e com isso se adaptar rapidamente, e essa flexibilidade estrutural da comunidade microbiana permite o hospedeiro explorar uma ampla variedade de plantas em sua dieta (Henderson *et al.*, 2015; Weimer, 2015).

Podemos observar a influência da redundância funcional quando comparamos os gráficos da Análise de Componentes Principais (PCA) da taxonomia do rúmen (Figura 14) com o gráfico de PCA da anotação das funções (Figura 18). No primeiro gráfico citado não foi possível observar um agrupamento entre as repetições de um mesmo tratamento, e considerando a classificação taxonômica da comunidade bacteriana, não há correlação entre a estruturação da comunidade e os tratamentos com diferentes dietas. Porém, no gráfico de PCA da anotação funcional foi possível observar um agrupamento entre as repetições de um mesmo tratamento, revelando uma correlação entre a dieta e a funcionalidade do microbioma. Com isso, pode-se inferir que mesmo que não exista diferença na composição da comunidade microbiana entre os grupos de animais alimentados com diferentes dietas, às funções executada por esses microrganismos mostram-se diferentes entre os tratamentos, apresentando uma redundância funcional.

Whitaker e colaboradores (1993) mostraram que a manipulação nutricional em bovinos, pode afetar substancialmente a saúde do animal e a produção de leite. Estudos tem mostrado cada vez mais que o tipo da dieta e sua composição é um fator chave para a digestão, podendo alterar a fermentação ruminal e direcionar vias metabólicas enriquecendo grupos específicos de microrganismos (Hart *et al.*, 2008; Romagnoli, 2016). No presente estudo, foram analisados os microrganismos associados à fibra ruminal com o objetivo de identificar as enzimas envolvidas na despolimerização da biomassa vegetal. Os resultados mostraram uma alta abundância dos filos

Bacteroidetes e Firmicutes que somados representam 80% da comunidade total do rúmen de ovinos. Estes filos predominantes possuem espécies especializadas na fermentação da parede celular vegetal que é composta por celulose, hemicelulose e lignina (van Soest, 1994). A lignina em especial é o componente de maior dificuldade para digestão e tem a principal função de servir como uma barreira física as plantas, limitando o ataque microbiano por se tornar indigesta em condições anaeróbicas uma vez que os microrganismos do rúmen possuem uma quantidade reduzida de enzimas capazes de degradá-la (McAllister *et al.*, 1994; van Soest, 1994).

Os filos Firmicutes e Bacteroidetes se mostraram mais abundantes como já descritos, apresentando espécies chaves para a fermentação e degradação de biomassa vegetal além de apresentarem também microrganismos que são categorizados como espécies chaves, com ampla influência no ecossistema ruminal cujo seu desaparecimento poderia colocar em risco o funcionamento desse ambiente como um todo (Jami e Mizrahi, 2012; Weiner *et al.*, 2015).

5.5. Prospecção de genes codificadores de proteínas envolvidas na degradação da de biomassa vegetal a partir do metagenoma do rúmen de ovinos

A montagem *de novo* é o processo de construção de um genoma ou fragmentos maiores denominados *contigs*, sem que para isso, seja usada uma referência. É um procedimento bastante complexo, principalmente na definição dos passos necessários, de modo a que a montagem tenha o menor número possível de falhas. As leituras são comparadas e alinhadas entre si, permitindo desta forma montar segmentos de sequência cada vez maiores (Baker, 2012).

Para a predição funcional e busca de genes completos codificadores de proteínas que estão envolvidas na degradação da biomassa vegetal é necessária à realização da montagem dos *contigs*, entretanto sequenciamentos de comunidades microbianas de alta complexidade resultam em pouca ou nenhuma montagem de fragmentos (Raes, 2007). Foi observado que os dados resultantes da montagem dos *contigs* indicaram a utilização de aproximadamente 10% dos *reads* para em todas as amostras, o que foi esperado uma vez que o rúmen abriga comunidades microbianas complexas devido a suas características peculiares (KANRA, 2005).

A Montagem possibilitou a recuperação de três genes que codificam proteínas com função na desconstrução da biomassa vegetal, GH2, GH16 E GH25. O gene ligado à família GH2 foi identificado como uma β -manosidases. Essa enzima lisossômica β -manosidase (EC 3.2.1.25) cliva o resíduo de mannosilo Ligações β -monosídicas na ligação-N de cadeias laterais de glicoproteínas de oligossacarídeos. Os oligossacarídeos de glicoproteínas de ligação-N são degradados a partir da ação sequencial de pelo menos cinco diferentes atividades de enzimas lisossômicas.

Deficiências de qualquer dessas atividades resulta em um acúmulo de cadeias de oligossacarídeos incompletamente catabolizadas que levam a vacuolação celular generalizada (Adams *et al.*, 1943). Estudos de prospecção de lignocelulases a partir do metagenoma de rúmen mostra uma predominância desse gene nas sequências anotadas em diversos animais ruminantes como ovinos, caprinos, bubalinos e renas. (Jose *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2013; Stevenson e Weimer 2007; Pope *et al.*, 2012 ;Brulc *et al.*, 2009; Hess *et al.*, 2011; Warnecke *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2011), entretanto, dados sobre a caracterização enzimática para degradação da biomassa vegetal desse gene, ainda se encontra deficiente na literatura.

β -glucanases, pertencentes à família GH16 (EC: 3.2.1.39), são enzimas multifuncionais que hidrolisam polissacarídeos como a celulose (Pitson *et al.*, 1993, Kumar; Deobagkar, 1996) e ligações β -(1,3)-D-glicosídicas de glucanas lineares ou parcialmente ramificadas (Stone; Clarke, 1992; Sutherland, 1999). A celulose, um polímero de D-glucose ligado por ligação β -1,4, é o principal componente da parede celular da planta. A liberação de moléculas de glicose a partir das cadeias de lignocelulose, para serem utilizadas como matéria-prima para produzir etanol é uma estratégia promissora (Hasunuma *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2006). Neste caso, a decomposição eficiente da celulose é o principal fator que determina a viabilidade desta estratégia. Assim sendo, são necessárias celulasas altamente eficazes que catalisam a hidrólise da celulose. Além da indústria de combustíveis, a celulase também é aplicada em várias outras indústrias, como indústrias têxtil, detergente e papelaria (Ko *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2012), que utilizam essas enzimas para substituir os químicos tradicionais, tornando o processamento menos impactante ao meio ambiente de maneira que o mercado de celulase tende a crescer (Cherry e Fidantsef, 2003; Zhang *et al.*, 2006).

As fontes mais comuns para exploração das celulasas são as bactérias e fungos (Kumar *et al.*, 2008). As evidências sugerem que os fungos dos ruminantes contêm celulasas com atividades muito superiores aos fungos encontrados nos demais ecossistemas (Chen *et al.*, 2003; Harhangi *et al.*, 2003; Nagy *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2000). Assim, os fungos do rúmen são considerados como uma fonte potencial para a busca de celulasas altamente eficientes. Uma vez que o cultivo de fungos do rúmen em larga escala não é fácil devido às suas condições de crescimento únicas, o número de celulasas clonadas a partir de fungos do rúmen é limitado.

As lisozimas são beta-N-acetil-muramídeo-hidrolase que perturbam a mureína bacteriana (Fleming, 1922). A lisozima animal mais comum é o tipo C, encontrada em animais, insetos e plantas (Prager e Jolles, 1996). Os animais monogástricos possuem um único gene para a lisozima C que é expressa em vários tecidos (Yu e Irwin, 1996) e está envolvida principalmente na defesa contra infecções bacterianas. Em contraste, os ruminantes possuem múltiplos genes de lisozima

(Iewin e Wilson, 1989; Mantovani, 2001). A maioria dos componentes dietéticos são fermentados no rúmen para ácidos gordurosos voláteis, e o ruminante se beneficia da digestão de bactérias para obter aminoácidos. A lisozima proveniente do rúmen de bovino é uma enzima básica adaptada para atuar nas condições extremas, com atividade ótima em pH baixo (4.5-5.2), valores baixos de força iônica e resistente ao ácido e à pepsina (Mantivani, 2001). As diferenças de aminoácidos entre proteínas homólogas de diferentes espécies podem ter significância adaptativa, como é o caso das lisozimas encontradas no rúmen. As bactérias do rúmen representam um componente importante da biomassa do rúmen e é um fator provável que exerce pressão evolutiva sobre a lisozima.

As lisozimas, que evoluíram em um ambiente muito hostil, como o estômago ou o rúmen, desenvolveram resistência ao ácido e proteólise e podem ser aplicadas no tratamento de infecções e na indústria de alimentos. Na indústria de produção animal, o extensivo uso de antibióticos e hormônios como promotores de crescimento representaram ameaças à saúde humana e animal, e a suplementação de ração com alguns promotores de crescimento é agora ilegal. Assim, o uso de novos promotores de crescimento que não representam problemas de resistência é uma prioridade, e os peptídeos antimicrobianos são, naturalmente, bons candidatos. Na verdade, a lisozima foi considerada tão eficaz quanto os antibióticos convencionais, na promoção do crescimento de aves (Humphrey *et al.*, 2002).

A montagem de genes completos selecionados no presente trabalho foi possível a partir dos dados metagenômicos, entretanto, a amplificação e caracterização enzimática não foi possível. Entre os fatores que podem explicar a não obtenção do *amplicon*, incluem, baixa cobertura de sequenciamento considerando a complexidade do rúmen, baixo número de cópia dos genes alvo, ou ainda a presença de inibidores na amostra que impedem a amplificação.

6. CONCLUSÃO

A comparação da estrutura do microbioma nos tratamentos permitiu a identificação de um *core* microbiano compartilhado por todos os animais estudados, o qual apresenta basicamente, a predominância de quatro principais filos: Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, resultado também observado em outros trabalhos que investigam o microbioma do rúmen em diferentes animais.

A análise funcional do microbioma do rúmen de ovinos revelou que a adição de bagaço de cana-de-açúcar na dieta impactou significativamente em funções de classes de nível 1 anotadas com banco de dados SEED como metabolismo de proteínas, de carboidratos, de aminoácidos e de RNA e DNA. No geral, tanto na taxonomia quanto na parte funcional pode-se observar um enriquecimento dos grupos microbianos e classes funcionais no tratamento com a Dieta 2.

A classificação taxonômica não apresentou correlação com os tratamentos na análise de ordenação, entretanto, o conjunto de resultados obtidos aponta que a alteração na dieta de ovinos pela substituição de uma parte da fração volumosa da dieta por bagaço de cana-de-açúcar impacta na estruturação da comunidade bacteriana do rúmen de ovelhas enriquecendo funções relacionadas à degradação de biomassa.

Assim, os resultados sugerem o potencial de manipular a dieta de ovelhas com a intenção de favorecer grupos e funções de microrganismos em um ambiente naturalmente enriquecido como o rúmen para aumentar a frequência de genes específicos possibilitando a chance de descoberta de novos genes especializados na degradação da biomassa para possível aplicação industrial.

7. CONCLUSÃO

A comparação da estrutura do microbioma nos tratamentos permitiu a identificação de um *core* microbiano compartilhado por todos os animais estudados, o qual apresenta basicamente, a predominância de quatro principais filos: Bacterioidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, resultado também observado em outros trabalhos que investigam o microbioma do rúmen em diferentes animais. A análise funcional do microbioma do rúmen de ovinos revelou que a adição de bagaço de cana-de-açúcar na dieta impactou significativamente em funções de classes de nível 1 anotadas com banco de dados SEED como metabolismo de proteínas, de carboidratos, de aminoácidos e de RNA e DNA. No geral, tanto na taxonomia quanto na parte funcional pode-se observar um enriquecimento dos grupos microbianos e classes funcionais no tratamento com a Dieta 2.

A classificação taxonômica não apresentou correlação com os tratamentos na análise de ordenação, entretanto, o conjunto de resultados obtidos aponta que a alteração na dieta de ovinos pela substituição de uma parte da fração volumosa da dieta por bagaço de cana-de-açúcar impacta na estruturação da comunidade bacteriana do rúmen de ovelhas enriquecendo funções relacionadas à degradação de biomassa. Assim, os resultados sugerem o potencial de manipular a dieta de ovelhas com a intenção de favorecer grupos e funções de microrganismos em benefício do desempenho animal ou ainda usar o rúmen como fonte de genes especializados na degradação da biomassa para possível aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, H.W. 5500 phages examined in the electron microscope. **Archives of virology**, n.152, p.227–243, 2007.
- ADAMS, M., RICHTMYER, N.K. AND HUDSON, C.S. Some enzymes present in highly purified invertase preparations; a contribution to the study of fructofuranosidases, galactosidases, glucosidases and mannosidases. **Journal of the American Chemical Society**, n. 65, p. 1369–1380. 1943.
- ADSUL, M.G.; SINGHVI, M.S.; GAIKAIWARI, S.A.; GOKHALE, D.V. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Vienna, n. 102, p. 4304–4312, 2011.
- AKIN, D.E.; BENNER, R. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. **Applied and environmental microbiology**, Washington. n.54, p.1117–1125, 1988.
- ALEXANDER, R.M. The energetics of coprophagy: a theoretical analysis. **Journal of Zoology**, London, n. 20, p. 629–637, 2009.
- ALBERS, S.V.; KONINGS, W.N.; DRIESSEN, J.M. Solute transport. In: Cavicchioli R (ed) *Archaea: molecular and cellular biology*. **ASM Press**, Washington, DC, p. 354–368, 2007.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, New York, n. 59, p. 143–169. 1995.
- AMINOV, R.I. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**. Washington, n. 2, p. 158, 2011.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, p.E9–E21, 2005.
- BACH, S.J.; MCALLISTER, T.A.; VEIRA, D.M.; GANNON, V.P.J.; HOLLEY, R.A. Transmission and control of *Escherichia coli* O157: H7 – a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, n. 82, p.475–490. 2002.
- BALCH, C.C.; JOHNSON, V.W. Factors affecting the utilization of food by dairy cows. **British Journal of Nutrition**, London, n. 4, p.361–388. 1950.
- BAYER, S.; KUNERT, A.; BALLSCHMITER, M.; GREINER-STOEFFELE, T. Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, New York, n. 18, p. 181–187, 2010.
- BELOQUI, A.; PITA, M.; POLAINA, J.; MARTINEZ-ARIAS, A.; GOLYSHINA, O.V.; ZUMARRAGA, M.; YAKIMOV, M.M. *et al.* Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. **Journal of Biological Chemistry**, New York, n. 281, p.22933–22942, 2006.

BORASTON, A.B.; BOLAM, D.N.; GILBERT, H.J.; DAVIES, G.J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Journal of biochemistry**, California, n. 382, p.769–778. 2004.

BRAUNE, R. Untersuchungen über die Wiederkauemagen vorkommenden protozoen. **Archiv für Protistenkunde**, Germany, n. 32, p.111–170. 1913.

BREITBART, M.; SALAMON, P.; ANDRESEN, B.; MAHAFFY, J.M.; SEGALL, A.M.; MEAD, D.; AZAM, F.; ROHWER, F. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, n. 99, p. 14250–14255, 2002.

BREITBART, M.; HEWSON, I.; FELTS, B.; MAHAFFY, J.M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; ROHWER, F. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. **Journal of Bacteriology**, New Jersey, n. 185, p. 6220–6223. 2003.

BREITBART, M.; ROHWER, F. Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. **Biotechniques**, New York, n. 39, p. 729–736. 2005.

BROOKS, M.A.; HARVEY, R.M.; JOHNSON, N.F.; KEERLEY, M.S. Rumen degradable protein supply affects microbial efficiency in continuous culture and growth in steers. **Journal of Animal Science**, London, n. 90, p. 4985–4994. 2012.

BRYANT, M.P.; SMALL, N.; BOUMA, C.; ROBINSON, I.M. Characteristics of ruminal anaerobic cellulolytic cocci and *Cillobacterium cellulosolvens* n. sp. **Journal of bacteriology**, Washington, n. 76, p.529–537, 1958.

BRUL, S.; STUMM, C.K. Symbionts and organelles in anrcobic protozoa and fungi. **Trends in ecology & evolution**, Cambridge, n. 9, p. 319–324, 1994.

BRULC, J.M.; ANTONOPOULOS, D.A.; MILLER, M.E.; WILSON, M.K.; YANNARELL, A.C.; DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.E. *et al.* Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, n. 106, p.1948–1953. 2009.

CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n. 37, p. D233–D238, 2009.

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. *et al.* 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, n. 16, p. 92–101. 2006.

CHURCH, D.C. “Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants” OSU Book Stores, Inc., Corvallis, Oregon. Vol. 1, p. 251, 1969

CLARKE, R.T.J. Protozoa in the rumen ecosystem. In: Clarke RTJ, Bauchop T (eds) **Microbial ecology of the gut**. Academic, London, pp 251–275, 1977.

COLEMAN, G.S. The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In: McDonald IW, Warner ACI (eds) Digestion and metabolism in the ruminant. **University of New England Publishing Unit**, Armidale, pp 149–164, 1975.

Coleman GS The cellulolytic activity of thirteen species of rumen entodiniomorphid protozoa. **Journal of Protozoology**, New York, n. 30 , p. 36A, 1983.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**, London, v.6, p. 850-867, 2005.

COUTINHO, P.M.; DELEURY, E.; DAVIES, G.J.; HENRISSAT, B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, Toronto , n. 328, p. 307–317, 2003.

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

COWAN, D.A. Microbial genomes the untapped resource. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, n. 18, p. 14–16, 2000.

CRAIG, W. M.; BRODERICK, G. A.; RICKER, D. B., Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 117, n. 1, p. 56–62, Jan. 1987.

CRATER, A.R.; BARBOZA, P.S.; FORSTER, R.J. Regulation of rumen fermentation during seasonal fluctuations in food intake of muskoxen. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, n. 146, p. 233–24, 2007.

CZERKAWSKI, J.W. An introduction to rumen studies. **Pergamon Press**, Oxford/New York. 1986.

DAGAR, S.S.; KUMAR, S.; MUDGIL, P.; SINGH, R.; PUNIYA, AK. D1/D2 domain of large-subunit ribosomal DNA for differentiation of *Orpinomyces* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Newark, n. 77, p. 6722–6725, 2011.

DAI, X.; TIAN, Y.; LI, J.; 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**, Newark, n.81, 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 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. *et al.* Rumen cellulosomes: divergent fiber-degrading strategies revealed by comparative genome-wide analysis of six ruminococcal strains. **PLoS ONE**, San Francisco, n. 9, p.99221.2014.
- DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J.B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the Natural Academy Science of the United States of America**. Washington. V.107. n. 33. P. 14691-14696, 2010.
- DEHORITY, B.A. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, 2003.
- DEHORITY, B.A. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, New Jersey. n. 52, p. 339–342, 2005.
- 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**, Oxford. n. 78, p. 256–265. 2011.
- DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.A.; HALL, D.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BRULC, J.M.; FURLAN, M. *et al.* Functional metagenomics profiling of nine biomes. **Nature**, London, n. 452, p.1–6, 2008.
- DITTMANN, M.T.; RUNGE, U.; LANG, R.A.; MOSER, D.; GALEFFI, C.; KREUZER, M.; CLAUSS, M. Methane emissions by camelids. **PLoS ONE**, San Francisco, n.9, p. e94363, 2014.
- DODD, D.; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O. Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. **Molecular Microbiology**, Salem, v.79, n.2, p.292–304, 2011.
- DUAN, C.J.; XIAN, L.; ZHAO, G.C.; FENG, Y.; PANG, H.; BAI, X.L.; TANG, J.L.; MA, Q.S.; FENG, J.X. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, n. 107, p. 245–256, 2009.
- DUBOS, R. The microbiota of the gastrointestinal tract. **Gastroenterology**, n. 51, p.868–874, 1966.
- DUNCAN, A. J.; POPPI, D. P. Nutritional ecology of grazing and browsing ruminants. In: GORDON, I. J.; PRINS, h. H. T. The ecology of browsing and grazing. **Ecological Studies**, Berlin, v. 195, p. 89-116, 2008.
- EDWARDS, J.E.; MCEWAN, N.R.; MCKAIN, N.; WALKER, N. and WALLACE, R.J. Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. **Microbiology**, New York, n.151, p.717–725. 2005.

EDWARDS, J. E.; MCEWAN, N. R.; TRAVIS, A. J. and WALLACE, R. J. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Berlin, n. 86, p.263–281. 2004.

EMBLEY, T.M.; HORNER, D.A.; HIRT, R.P. Anaerobic eukaryote evolution: hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria? **Trends in Biotechnology**, Cambridge, n.12, p. 437–441, 1997.

EGERT, M.; DE GRAAF, A.A.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M.; VENEMA, K. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, 14:86–91, 2006.

FERRER, M., O. V. GOLYSHINA, T. N. CHERNIKOVA, A. N. KHACHANE, D. REYES-DUARTE, V. A. P. M. D. SANTOS, C. STROMPL, K. ELBOROUGH, G. JARVIS, A. NEEF, M. M. YAKIMOV, K. N. TIMMIS, AND P. N. GOLYSHIN.. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. **Environmental Microbiology**. London, n. 7, p. 1996–2010. 2005.

FERRY, J.G.; KASTEAD, K.A. Methanogenesis. In: Cavicchioli R (ed) *Archaea: molecular and cellular biology*. **ASM Press**, Washington, DC, pp 288–314, 2007.

FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M. *et al.* Metagenomic and Small-Subunit rRNA Analyses Reveal the Genetic Diversity of Bacteria, Archaea, Fungi, and Viruses in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Newark, n.73, p.7059–7066, 2007.

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

FINLAY, B.J.; ESTEBAN, G.; CLARKE, K.G.; WILLIAMS, A.G.; EMBLEY, T.M.; HIRT, R.P. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS Microbiololy**. n.117, p.157–162, 1994.

FLEMING A: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proc Roy Soc London**. B39: 306-317. 1922.

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 Reviewer Microbiology**, London, n. 6, p. 121–131, 2008.

FONTY, G.; GOUET, P.H.; JOUANY, J-P.; SENAUD, J. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. **Journal of General Microbiology**, London, n.133, p.1835–1943, 1987.

FONTY, G.; JOBLIN, K.; CHAVAROT, M.; ROUX, R.; NAYLOR, G.; MICHALLON, F. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen free lambs. **Applied and Environmental Microbiology**, Newark, n.73, p.6391–6403, 2007.

FOOSE, T. In: Janis, C. The evolutionary strategy of the equidae and the origins of rumen and cecal digestion. **Society for the Study of Evolution**, St. Louis, pp 757–774, 1974.

GAGEN, E.J.; MOSONI, P.; DENMAN, S.E.; AL, JASSIM, R.; MCSWEENEY, C.S.; FORANO, E. Methanogen colonization does not significantly alter acetogen diversity in lambs isolated 17 h after birth and raised aseptically. **Microbiology Ecology**, Oxford. n. 64, p. 628–640, 2012.

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**, n. 295, p.224–231, 2013.

GILL, S.R.; POP, M.; DEBOY, R.T.; ECKBURG, P.B.; TURNBAUGH, P.J.; SAMUEL, B.S.; GORDON, J.I. *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, London, n.312, p.1355–1359, 2006.

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. **Functional Ecology**, London, n. 2, p.87–97, 2009.

GRUNINGER, R.J.; PUNIYA, A.K.; CALLAGHAN, T.M.; EDWARDS, J.E.; YOUSSEF, N.; DAGAR, S.S.; FLIEGEROVA, K. *et al.* Anaerobic fungi (Phylum *Neocallimastigomycota*): advances in understanding of their taxonomy, life cycle, ecology, role, and biotechnological potential. **Environmental Microbiology**. London, n.90, p.1–17, 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, n. 93, p. 1320–1334, 2010.

HANADA, S. Filamentous anoxygenic phototrophs in hot springs. **Applied and Environmental Microbiology**, Newark, n.18, p.51–61, 2003.

HANDELSMAN, L. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology Molecular Review**, New York, n 68, p. 669-685. 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, Washington, n. 5, p.R245-R249, 1998.

HART K.J.; YÁNEZ-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. 174, p. 8-35. 2008.

HEATH, I.B.; KAMINSKYJ, S.G.; BAUCHOP, T. Basal body loss during fungal zoospore encystment: evidence against centriole autonomy. **Journal of Cell Science**, Cambridge, n.83, p.135–140, 1986.

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

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. **Science Reports**, London, n. 5, p.1–15, 2015.

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**, London, v. 331, n. 6016, p. 463, 2011.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHDORF, S. *et al.* A higher level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Cambridge, n.111, p.509–547, 2007.

HILDEBRANDT, M.A.; HOFFMANN, 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, 1995.

HIMMEL, M.E.; DING, S.Y.; JOHNSON, D.K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M.R.; BRADY, J.W.; FOUST, T.D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, London, v.315, p. 804-807, 2007.

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

HODGSON J. The development of solid food intake in calves. The relationship between liquid and solid food intake. **Animal Production Science**, Oxford, n. 13, p.593–597, 1971.

HOFMANN, R. R. The ruminant stomach. Stomach structure and feeding habits of East African game ruminants. **East African monographs in biology**. Volume 2, 1978.

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

HOOPER, L.V. Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends in Microbiology**, Cambridge, n.12, p.129–134, 2004.

HOOPER, L.V.; LITTMAN, D.R.; MACPHERSON, A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, London, n. 336, p.1268–1273, 2012.

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

HUMPHREY, B.D.; HUANG, N.; KLASING, K.C. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks. **Journal Nutrition**, London, n.132, p. 1214-1218. 2002

IAKIVIAK, MICHAEL, RODERICK I. MACKIE, AND ISAAC K. O. CANN. "Functional Analyses of Multiple Lichenin-Degrading Enzymes from the Rumen Bacterium *Ruminococcus Albus* 8." **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77 n.21, p. 7541–7550. 2011.

IMAI S (1998) Phylogenetic taxonomy of rumen ciliate protozoa based on their morphology and distribution. **Journal of Applied Animal Research**, Janakpuri, n. 13, p. 17–36, 19998.

IRWIN DM, WILSON AC: Multiple cDNA sequences and the evolution of bovine stomach lysozyme. **J Biol Chem**. 264: 11387-11393. 1989.

JAKHESARA, S.J.; P.G. KORINGA; U.V. RAMANI; V.B. AHIR; A.K. TRIPATHI; P.S. SONI; K.M. SINGH; V.D. BHATT; J.S. PATEL; M.M. PATEL; M.R. SAJNANI and C.G. JOSHI. "Comparative Study of Tannin Challenged Rumen Microbiome in Goat Using High Throughput Sequencing Technology". **Developmental Microbiology and Molecular Biology**. London, v.1, n. 1, p.95-106, 2010.

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, n.9, p. e85423, 2014.

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

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.3, e33306, 2012.

JANIS, C. The evolutionary strategy of the equidae and the origins of rumen and cecal digestion. **Evolution**, n. 30, p.757–774, 1976.

JANSSEN PH, KIRS M Structure of the archaeal community of the rumen. **Appl Environ Microbiol**, n. 74, p.3619–25, 2008.

JIN W, CHENG YF, MAO SY, ZHU WY. Discovery of a novel rumen methanogen in the anaerobic fungal culture and its distribution in the rumen as revealed by real-time **PCR**. **BMC Microbiol**, n. 14, p.104, 2014.

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

JOHNSON KA, JOHNSON DE. Methane emissions from cattle. **J Anim Sci**, n. 73, p.2483–2492, 1995.

JOSE VL, APPOOTHY T, MORE RP & ARUN AS. Metagenomic insights into the rumen microbial fibrolytic enzymes in Indian crossbred cattle fed finger millet straw. **AMB Express**, n. 7, p. 13. 2017.

KAMAGATA Y, TAMAKI H. Cultivation of uncultured fastidious microbes. **Microbes Environ** n. 20, p.85–91. 2005.

KELLY WJ, LEAHY SC, LI D, PERRY R, LAMBIE SC, ATTWOOD GT, ALTERMANN E. The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanobacterium formicicum* BRM9. **Stand Genomic Sci**, n. 9, p.1–8, 2014.

KEMPTON TJ, MURRAY RM, LENG RA. Methane production and digestability measurements in the grey kangaroo and sheep. **Aust J Biol Sci**, n.29, p.209–214, 1976.

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

KIM EJ, HUWS SA, LEE MRF, SCOLLAN ND. Dietary transformation of lipid in the rumen microbial ecosystem. **Asian Austral J Anim**, n.22, p. 1341–1350, 2009.

KLEEN JL, HOOIJER GA, REHAGE J, NOORDHUIZEN JPTM, Subacute ruminal acidosis (SASA): a review. **J Vet Med A**, n. 50, p.406–414. 2003.

KLIEVE AV, HECK GL, PRANCE MA. Genetic homogeneity and phage susceptibility of ruminal strains of *Streptococcus bovis* isolated in Australia. **Lett Appl Microbiol**, n. 29, p.108–112, 1999.

KONSTANTINIDIS, K.T.; BRAFF, J.; KARL, D.M.; DELONG, E.F. (2009) Comparative metagenomic analysis of a microbial community residing at a depth of 4,000 meters at station ALOHA in the North Pacific subtropical gyre. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n.75, p.5345–5355, 2009.

KOIKE S, KOBAYASHI Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiol Lett**, n.204, p.361–366, 2001.

KOIKE S, KOBAYASHI Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. **Asian Austral J Anim**, n. 22, p.131–138, 2009.

KOIKE S, YOSHITANI S, KOBAYASHI Y. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. **FEMS Microbiol Lett**, n. 229, p.23–30, 2003.

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

KRAUSE DO, DENMAN SE, MACKIE RI, MORRISON M, RAE AL, ATTWOOD, G.T, MCSWEENEY CS. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiol**, n. R 27, p.663–693, 2003.

KRAUSE DO, RUSSELL JB. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Appl Environ Microb**, n.62, p. 815–821, 1996.

KOONIN EV, WOLF YI. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. **Nucleic Acids Res**, n.36, p.6688–6719, 2008.

- KUMAR, N. N.; DEOBAGKAR, D. N. Multifunctional glucanases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 14, p. 1-15, 1996.
- KUMAR S, DAGAR SS, PUNIYA AK. Isolation and characterization of methanogens from rumen of Murrah buffalo. **Ann Microbiol**, n. 62, p.345–350, 2012.
- KUMAR S, DAGAR SS, PUNIYA AK, UPADHYAY RC. Changes in methane emission, rumen fermentation in response to diet and microbial interactions. **Res Vet Sci**, n. 94, p.263–268, 2013a.
- KUMAR S, DAGAR SS, SIROHI SK, UPADHYAY RC, PUNIYA AK. Microbial profiles, in vitro gas production and dry matter digestibility based on various ratios of roughage to concentrate. **Ann Microbiol**, n. 63, p.541–545, 2013b.
- 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. **Front Microbiol**, n. 6, p.1–10, 2015.
- KUNG LJ, HESSION AO. Preventing *in vitro* lactic acid accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. **J Anim Sci**, n. 73, p.250–256, 1995.
- LAIRSON LL, HENRISSAT B, DAVIES GJ, WITHERS SG. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. **Annu Rev Biochem**, n. 77, p.521. 2008.
- LAMBIE SC, KELLY WJ, LEAHY SC, LI D, REILLY K, MCALLISTER TA, VALLE ER et al. The complete genome sequence of the rumen methanogen *Methanosarcina barkeri* CM1. **Stand Genom Scien**, n. 10, p. 1–8, 2015.
- LANGE M, WESTERMANN P, AHRING BK Archaea in protozoa and metazoan. **Appl Microbiol Biotech**, n. 66, p.465–474, 2005.
- LARUE, R., Z. YU, V. A. PARISI, A. R. EGAN, AND M. MORRISON. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. **Environ. Microbiol.** 7:530–543. 2005.
- LASER, M, SCHULMAN, D, ALLEN, S. G., LICHWA, J., ANTAL, JR., M. J., LYND, L. R., A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technol.**, 81, 33-44. 2002.
- LEAHY SC, KELLY WJ, ALTERMANN E, RONIMUS RS, YEOMAN CJ, PACHECO DM, LI D et al. The genome sequence of the rumen methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. **PLoS ONE**, n. 5, p. e8926, 2010.
- LEAHY SC, KELLY WJ, LI D, LI Y, ALTERMAN E, LAMBIE SC, COX F, ATTWOOD GT. The complete genome sequence of *Methanobrevibacter* sp. AbM4. **Stand Genomic Sci**, n.8, p.215, 2013.
- LEE JH, RHEE MS, KUMAR S, LEE GH, CHANG DH, KIM DS, CHOI SH et al. Genome sequence of *Methanobrevibacter* sp. strain JH1, isolated from rumen of Korean native cattle. **Genome Announc**, n. 1, p. e00002–e00013, 2013.

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.

LEMOES, L.N.; FULTHORPE, R.R.; TRIPLETT, E.W.; ROESCH, L.F.W. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.86, p.42-51, 2011.

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**, Washington, v. 14, n. 1, p. 129-139, 2012

LI R.; ZHU H.; RUAN J.; QIAN W.; FANG X.; SHI Z.; LI Y.; LI S.; SHANG G.; KRISTIANSEN K.; LI S.; YANG H.; 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.

LIEBETANZ, E. Die parasitischen Protozoen des Widenkauermagens. **Arch Protistenkd** n,19, p.19–80, 1910.

LIMA, F.S.; OIKONOMOU, G.; LIMA, S.F.; BICALHO, M.L.S.; GANDA, E.K.; FILHO, J.C.O.; LORENZO, G. *et al.* Prepartum and Postpartum Rumen Fluid Microbiomes: Characterization and Correlation with Production Traits in Dairy Cows. **Environmental Microbiology**, Washington, n.81m p.1327–1337, 2014.

LIU, Y.; WHITMAN, W.B. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. **ann n y academic science**, New York, n. 1125, p.171–189. 2008.

LIU, K.; WANG, J.; BU, D.; ZHAO, S.; MCSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, California, n. 385, p. 605–611, 2009.

LOMBARD, V.; GOLACONDA, R. H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, New York, 2014.

LOPES, L.D.; DE SOUZA LIMA, A.O.; TAKETANI, R.G.; DARIAS, P.; DA SILVA, L.R.F.; ROMAGNOLI, E.M.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; MENDES, R. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlin, n.108, p.15. 2015.

MACKIE RI, GILCHRIST FMC, ROBBERTS, AM, HANNAH PE, SCHWARTZ HM () Microbiological and chemical changes in the rumen during the step wise adaptation of sheep to high concentrate diets. **J Agric Sci**, n. 90, p.241–254, 1978.

MACKIE, R.I.; AMINOV, R.I.; WHITE, B.A.; MCSWEENEY, C.S. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. In: Cronjé PB (ed) Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. CAB International, London, pp 61–77, 2000.

MALMUTHUGE, N.; LI, M.; CHEN, Y.; FRIES, P.; GRIEBEL, P.J.; BAURHOO, B.; ZHAO, X.; GUAN, L.L. Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, n.79, p.337–347, 2012.

MANTOVANI HC, RUSSELL J: Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. **Appl Environ Microbiol.**, n.67, p. 808-813. 2001.

MANN, N.H. (2005) The third age of phage. **PLoS Biology**, Cambridge, n. 3, p.182, 2005.

MARCHLER-BAUER, A. *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, n.39, p. (D)225-9, 2011.

MARTENS, E.C.; LOWE, E.C.; CHIANG, H.; PUDLO, N.A.; WU, M.; MCNULTY, N.P.; WADEABBOTT, D.W. *et al.* Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. **PLoS Biology**, Cambridge, n.9, p.e1001221, 2011.

MATSUI H, OGATA K, TAJIMA K, NAKAMURA M, NAGAMINE T, AMINOV RI, BENNO Y () Phenotypic characterization of polysaccharidases produced by four *Prevotella* type strains. **Curr Microbiol**, n. 41, p. 45–49, 2000.

MATH, R.K.; ISLAM, S.M.A.; CHO, K.M.; HONG, S.J.; KIM, J.M.; YUN, M.G.; CHO, J.J.; HEO, J.Y.; LEE, Y.H.; KIM, H.; YUN, H.D. Isolation of a novel gene encoding a 3,5,6-trichloro-2- pyridinol degrading enzyme from a cow rumen metagenomic library. **Biodegradation**, London, n.21, p.565–573, 2010.

MCALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A.; CHENG, K.J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Animal Science**, London, n.72, p.3004–3018, 1994.

MCALLISTER, T.A.; NEWBOLD, C.J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, n. 48, p.7–13, 2008.

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**, California, n. 8, p.109–125, 2014.

MCEWAN, N.R.; ABECIA, L.; REGENSBOGENOVA, M.; ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; NEWBOLD, C.J. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. **Journal of Applied Microbiology**, Newark, n.41, p.97–101, 2005.

MCLEAY, L.M.; TITCHENG, D.A. Gastric, antral and fundic pouch secretion in sheep. **The Journal of Physiology**, London, n. 248, p.595–612, 1975.

MCSWEENEY, C.S.; BLACKALL, L.L.; COLLINS, E.; CONLAN, L.L.; WEBB, R.I.; DENMAN, S.E.; KRAUSE, D.O. Enrichment, isolation and characterisation of ruminal bacteria that degrade non-protein amino acids from the tropical legume *Acacia angustissima*. **Animal Feed Science and Technology**, Leicestershire, n. 121, p.191–204, 2005

MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, D.; MORRISON, M. Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n.84, p.1294–1309, 2001.

MITSUMORI, M.; SUN, W. Control of rumen microbial fermentation for mitigating methane emissions from the rumen. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, Seoul, n. 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, n. 5, p. 689, 2014.

MORGAVI, D.P.; KELLY, W.J.; JANSSEN, P.H.; ATWOOD, G.T. Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. **Animal Science**, London, n. 7, p. 184–201, 2013.

MORRISON, M., MIRON, J. Adhesion to cellulose by *Ruminococcus albus*: a combination of cellulosomes and Pil-proteins? **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, n. 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 of Animal Science**, Champaign, n.89, p. 783–791, 2011.

MULLER, M.; MENTEL, M.; VAN HELLEMOND, J.J.; HENZE, K.; WOEHLER, C.; GOULD, S.B.; YU, R.Y. *et al.* Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. **Microbiology and Molecular Biology**, Washington, R 76, p. 444–495, 2012.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; SOUZA, M.D.; 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 metagenomas. **BMC Bioinformatics**, London, V. 9, p.386–394. 2008.

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, n. 58, p. 2410–2414, 1992.

NEWBOLD, C.J.; FUENTE, G.L.; BELANCHE, A.; RAMOS-MORALES,; MCEWAN, N.R. The role of ciliate protozoa in the rumen. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, n. 6, p. 1–14, 2015

OFFNER, A.; BACH, A.; SAUVANT, D. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, n. 106, p.81–93, 2003.

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

ORPIN, C.G.; MATHIESEN, S.D.; GREENWOOD, Y.; BILX, A.S. Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Newark, n. 50, p. 144–151, 1985.

OVERBEEK, R.; BEGLEY, T.; BUTLER, R.M.; CHOUDHURI, J.V.; CHUANG, H.Y.; *et al.* The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford n. 33, p. 5691-5702, 2005.

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

OZUTSUMI, Y., TAJIMA, K.; TAKENAKA, A.; ITABASHI, H. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, Tokyo, n. 69, p. 499–506. 2005.

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, n. 93, p. 279–287, 2010.

PALACKAL, N.; LYON, C.; ZAIDI, S.; LUGINBUHL, P.; DUPREE, P.; GOUBET, F.; MACOMBER, J. *et al.* A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. **Applied microbiology and biotechnology**, New York, n. 74, p. 113–124, 2007.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; BEIKO, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, Oxford, n. 30, p. 3123–3124, 2014.

PARSLEY, L.C.; CONSUEGRA, E.J.; THOMAS, S.J.; BHAVSAR, J.; LAND, A.M.; BHUIYAN, N.N.; MAZHER, M.A. *et al.* Census of the viral metagenome within an activated sludge microbial assemblage. **Applied and environmental microbiology**, Washington, n. 76, p. 2673–2677, 2010.

PATRA, A. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. **Environmental monitoring and assessment**, Dordrecht, n. 184, p. 1929–1952, 2012.

PAUL, K.; NONOH, J.O.; MIKULSKI, L.; BRUNE, A. Methanoplasmatales, Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. **Applied and environmental microbiology**, Washington, n. 78, p. 8245–8253, 2012.

PERUMBAKKAM, S.; MITCHELL E.A.; CRAIG A.M. Changes to the rumen bacterial population of sheep with the addition of 2,4,6-trinitrotoluene to their diet. **Antonie van Leeuwenhoek**. Amsterdam. V.99. p.231-240, 2011.

PETRI, R.M.; SCHWAIGER, T.; PENNER, G.B.; BEAUCHEMIN, K.A.; FORSTER, R.J.; MCKINNON, J.J.; MCALLISTER, T.A. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. **PLoS ONE**, San Francisco, 8:e83424, 2013.

PINARES-PATINO, C.S.; ULYATT, M.J.; WAGHORN, G.C.; LASSEY, K.R.; BARRY, T.N.; HOLMES, C.W.; JOHNSON, D.E. Methane emission by alpaca and sheep fed on Lucerne hay or grazed on pastures of perennial rye grass/white clover or birds foottre foil. **The Journal of agricultural science**, London, n. 140, p. 215–226, 2003.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 15, p. 178-190, 1993.

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.4041-4022, 2014.

PITTA, D.W.; PINCHAK, W.E.; DOWD, S.E.; OSTESTOCK, J.; GONTCHAROVA, V.; YOUN, E.; DORTON, K. *et al.* Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. **Microbial ecology**, New York, n. 59, p. 511–522, 2010.

PONTES, D.S.; LIMA-BITTENCOURT, C.I.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M.A. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, n. 34, p. 463–473, 2007.

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.

POULSEN, M.; SCHWAB, C.; JENSEN, B.B.; ENGBERG, R.M.; SPANG, A.; CANIBE, N.; HOJBERG, O. *et al.* Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. **Nature communications**, London, n. 4, p. 1428, 2013.

PRAGER EM, JOLLES P: Animal lysozymes c and g: an overview. Lysozymes: model enzymes in Biochemistry and Biology. **Edited by: P Jolles**. Basel/Boston/Berlin, Birkhauser, 9-31. 1996.

PULIDO, R.G.; MUÑOZ, R.; LEMARIE, P.; WITTEWER, F.; ORELLANA, P.; WAGHORN, G.C. Impact of increasing grain feeding frequency on production of dairy cows grazing pasture. **Livestock science**, Amsterdam, n. 125, p. 109–114, 2009.

QI, M.; WANG, P.; O'TOOLE, N.; BARBOZA, P.S.; UNGERFELD, E.; LEIGH, M.B.; SELINGER, L.B.; *et al.* Snapshot of the eukaryotic gene expression in muskoxen rumen a metatranscriptomic approach. **PLoS ONE**, San Francisco, 6:e20521, 2011.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D.R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.M.; HANSEN, T.; 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.; METAHIT CONSORTIUM; BORK, P.; EHRLICH, S.D.; WANG, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, London, v. 464, 2010.

QUINCE, C.; LANZEN, A.; CURTIS, T.P.; DAVENPORT, R.J.; HALL, N.; HEAD, I.M.; READ, L.F. *et al.* Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. **Nature Methods**, New York, n. 6, p. 639–641, 2009.

RAFFERTY, J.P.; THOMPSON, J.N. Enciclopedia Britannica. Available: <<http://global.britannica.com/science/coevolution>> Accessed on July 16, 2016

RAMSAK, A.; PETERKA, M.; TAJIMA, K.; MARTIN, J.C.; WOOD, J.; JOHNSTON, M.E.D.; AMINOV, R.I. *et al.* Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, n. 33, p. 69–79, 2000.

REYES, A.; HAYNES, M.; HANSON, N.; ANGLY, F.E.; HEATH, A.C.; ROHWER, F.; GORDON, J.I. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. **Nature**, London, n. 466, p.334-338, 2010.

RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics**, Amsterdam, 16(6), p. 276-277, 2000.

FINN, R.D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S.R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 39, Issue suppl_2, p. W29–W37, 2011.

RODRIGUEZ-BRITO, B.; LI, L.; WEGLEY, L.; FURLAN, M.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BUCHANAN, J. *et al.* Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. **International Society for Microbial Ecology**, London, n. 4, p. 739–751, 2010.

RODRIGUEZ-VALERA, F.; MARTIN-CUADRADO, A.B.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; PASIC, L.; THINGSTAD, T.F.; ROHWER, F.; MIRA, A. Explaining microbial population genomics through phage predation. **Nature reviews. Microbiology**, London, n. 7, p. 828–836, 2009.

ROHWER, F.; THURBER, R.V. Viruses manipulate the marine environment. **Nature**, London, n. 459, p. 207–212, 2009.

ROMAGNOLI, E.M.; KMIT M.C.P.; CHIARAMONTE, J.B.; ROSSMANN. M.; MENDES. R. Ecological Aspects on Rumen Microbiome. In: de Azevedo J., Quecine M. (eds) *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*. Springer, P. 367-389, 2017.

ROMAGNOLI, E.M Dinâmica do microbioma ruminal de ovinos (*Ovis aries*) e sua relação com a degradação da biomassa. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Solos, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”/Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2016.

ROMERO-PEREZ, G.A.; OMINSKI, K.H.; MCALLISTER, T.A.; KRAUSE, D.O. Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers. **Applied and environmental microbiology**, Newark, n. 77, p. 258–268, 2011.

ROSENBERG, E.; SHARON, G.; ATAD, I.; ZILBER-ROSENBEG, I. The evolution of animal and plants via symbiosis with microorganisms. **Environmental microbiology reports**, Hoboken, n. 2, p. 500–506, 2010.

ROSS, E.M.; PETRVCKI, S.; MOATE, P.J.; HAYES, B.J. Metagenomic of rumen bacteriophage from thirteen lactating dairy cattle. **BMC Microbiology**, London, n. 13, p.242, 2013.

ROSS, E.M.; MOATE, P.J.; BATH, C.R.; DAVIDSON, S.E.; SAWBRIDGE, T.I.; *et al.* High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing. **BMC Genetics**, London, n. 13, p. 53, 2012.

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

RUSTOMO, B.; CANT, J.P.; FAN, M.P.; DUFFIELD, T.F.; ODONGO, N.E.; MCBRIDE, B.W. Acidogenic value of feeds. I. the relationship between the acidogenic value of feeds and in vitro ruminal pH changes. **Journal of animal science**, Champaign, n. 86, p. 109–117, 2006.

RUSTOMO, B.; ALZAHAL, O.; ODONGO, N.E.; DUFFIELD, T.D.; MCBRIDE, B.W. Effects of rumen acid load from feed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cow. *Journal of dairy science*, Champaign, n. 89, p. 4758–4768, 2006.

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

SADET, S.; MARTINA, C.; MEUNIER, B.; MORGAVI, D. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. **Animal**, n.1, p. 939–944. 2007.

SCHLOSS, P.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. 14. p. 303–310, 2003.

SEKIGUCHI, W. Yet-to-be cultural microorganism relevant to methane fermentation processes. *Microbes and environments*, Tagajo, n. 21, p. 1–15, 2006.

SELINGER, L.B.; FORSBERG, C.W.; CHENG, K.J. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. **Anaerobe**, London, n.2, p.263–284, 1996.

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.

SINGH, K.M; PANDYA, P.R; TRIPATHI, A.K; PATEL, G.R; PARNERKAR, S; KOTHARI, R.K; JOSHI, C.G. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. **Meta Gene**, Amsterdam, n. 2, p. 191-199, 2014.

SINGH, S.P.; HOODA. O.K.; KUNDU, S.S.; SINGH, S. Biochemical changes in heat exposed buffalo heifer rs supplemented with yeast. **Tropical animal health and production**, Edinburgh, v.44, p.1383-1387, 2012.

SINGH, K.M.; AHIR, V.B.; TRIPATHI, A.K.; RAMANI, U.V.; SAJNANI, M.; KORINGA, P.G.; JAKHESARA, S.; PANDYA, P.R.; RANK, D.N.; MURTY, D.S.; KOTHARI, R.K.; JOSHI, C.G. Metagenomic analysis of Surti buffalo (*Bubalus bubalis*) rumen: a preliminary study. **Molecular biology reports**, Dordrecht, n. 39, p.4841–4848, 2012.

SINGH, B.; BHAT, T.K.; SINGH, B. Exploiting gastrointestinal microbes for livestock and industrial development. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, n. 14, p. 567–586, 2001.

SINGH, B.; GAUTAM, S.K.; VERMA, V.; KUMAR, M.; SINGH, B. Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. **Anaerobe**, London, n. 14, p. 138, 2008.

SINGHAL, K.K.; MOHINI, M.; JHA, A.K.; GUPTA, P.K. Methane emission estimates from enteric fermentation in Indian livestock: dry matter intake approach. **Current Science**, Bangalore, n. 88; p. 119, 2005.

SIROHI, S.K.; SINGH, N.; DAGAR, S.S.; PUNIYA, A.K. Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. **Applied microbiology and biotechnology**, New York, n. 95, p. 1135–1154, 2012.

SIROHI, S.K.; CHAUDHARY, P.P.; SINGH, N.; SINGH, D.; PUNIYA, A.K. The 16S rRNA and mcrA gene based comparative diversity of methanogens in cattle fed on high fibre based diet. **Gene**, Amsterdam, n. 523, p. 161–166, 2013.

SIROHI, S.K.; CHOUDHURY, P.K.; PUNIYA, A.K.; SINGH, D.; DAGAR, S.S.; SINGH, N.; Ribosomal ITS1 sequence based diversity analysis of anaerobic rumen fungi in cattle fed on high fiber diet. **Annals of Microbiology**, Milano, n. 63, p. 1571–1577, 2013.

SKENE, I.K.; BROOKER, J.D. Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Anaerobe**, London, n. 1, p. 321–327, 1995.

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**, Newark, n. 72, p.200–206, 2006.

SLOAN, W.T.; LUNN, M.; WOODCOCK, S.; HEAD, I.M.; NEE, S.; CURTIS, T.P. Quantifying the role of immigration and chance in shaping prokaryote community structure. **Environmental microbiology**, Oxford, n. 8, p. 732–740, 2006.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedures of national Academy of Science**, Washington, v. 103, n. 32, 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, n. 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, pp 140–19, 1997.

STONE, B.; CLARKE, A. Chemistry and biology of (1,3)-b-Glucans. Melbourne: **La Trobe University Press**, 1992.

STOREY, J.D. A direct approach to false discovery rates, **Journal of the Royal Statistical Society**, Series B, London n. 64, p. 479–498, 2002.

STORM, A.C.; KRISTENSEN, N.B.; HANIGAN, M.D. A model of ruminal volatile fatty acid absorption kinetics and rumen epithelial blood flow in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 95:2919–2934, 2012.

SUNDSET, M.A.; PRAESTENG, K.E.; CANN, I.K.; MATHIESEN, S.D.; MACKIE, R.I. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. **Microbial Ecology**, Berlin, n. 54, p. 424–438, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 38, p. 319–328, 1999.

SWEENEY M. D., XU, F. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. **Catalysts**, n.2, p.244–263. 2012.

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. **The Journal of Nutrition**, n.134, p.3378–3384, 2004.

TARAKANOV, B.V. The Phenomenon of Bacteriophagy in the Rumen of Ruminants. Moscow: Nauchny mir. 2006

THANKOSES, P.; BLACK, A.S.; HOLTZAPPLE, M.T. Fermentation of corn stover to carboxylic acids. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v.83, n.2, p.191–200, 2003.

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**, London, n.55, p. 913–926, 1996

THIELE, J.H.; CHARTRAIN, M.; ZEIKUS, J.G.; Control of interspecies electron flow during anaerobic digestion: role of floc formation in syntrophic methanogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, Newark, n. 54, p. 10–19, 1988.

THORPE, A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. **Climatic change**, Boston n. 93, p. 407–431, 2008.

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.

TOMME, P.; WARREN, R.A.J.; GILKES, N.R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Advances in Microbial Physiology**, London, n.37, p. 1–81, 1995.

TROYER, K. Microbes, herbivory and the evolution of social behavior. **Journal of Theoretical Biology**, Amsterdam, n. 106, p. 157–169, 1984.

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**, n. 158, p.1808–1817, 2012.

UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, n. 51, p. 570–577, 2010.

VAN DER GIEZEN, M. Strange fungi with even stranger insides. **Mycologia**, Abingdon 16:129–131, 2002.

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.

VONCKEN, F.; BOXMA, B.; TJADEN, J.; AKHMANOVA, A.; HUYNEN, M.; VERBEEK, F.; TIELENS, A.G.M. *et al.* Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. **Molecular Microbiology**, Salem, n. 44, p. 1441–1454, 2002.

WALLACE, R.J.; CHENG, K.J.; DINSDALE, D.; ORSKOV, E.R. An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. **Nature**, London, n. 279, p. 424–426, 1979.

WANG, L.; HATEM, A.; CATALYUREK, U.V.; MORRISON, M.; YU, Z. Metagenomic insights into the carbohydrate-active enzymes carried by the microorganisms adhering to solid digesta in the rumen of cows. **PLoS ONE**, San Francisco, 11:e78507, 2013.

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**, 2011.

WANG, F.C.; LI, F.; CHEN, G.J.; LIU, W.F. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. **Microbiological Research**, Berlin, n. 164, p. 650–657, 2009.

WARNER, A.C.I. Proteolysis by rumen microorganisms. **Journal of General Microbiology**, London, n. 14, p. 749, 1956.

WEBER, S.; STUBNER, S.; CONRAD R. Bacterial populations colonizing and degrading rice straw in anoxic paddy soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Newark, n. 67, p. 1318–1327, 2001.

WEIMER, P.J.; Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne , n. 6, p. 1–16, 2015

- 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.
- WILKE, A.; HARRISON, T.; WILKENING, J.; FIELD, D.; GLASS, E. M.; KYRPIDES, N.; MEYER, F. The M5nr: a novel non-redundant database containing protein sequences and annotations from multiple sources and associated tools. **BMC bioinformatics**, London, v. 13, n. 1, p. 141, 2012.
- WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. Springer, New York, p. 4–83, 1992.
- 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, n. 37, p. 125–129, 1992.
- WHITAKE, 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.
- WHITELY, A.S.; JENKINS, S.; WAITE, I.; KRESOJE, N.; PAYNE, H.; MULLN, B.; ALLCOCK, R.; O'DONNELL, A. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 91, n. 1. p. 80–88, 2012.
- WHITFORD, M. F.; FORSTER, R. F.; BEARD, C. E.; GONG, J. & TEATHER, R. M. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. **Anaerobe**, New York, n.4, p.153–163. 1998.
- WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, n. 74, p. 5088–5090, 1977.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea bacteria and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, n. 87, p. 4576–4579, 1990.
- WONGWILAIWALIN, S.; LAOTHANACHAREON, T.; MHUANTONG, W.; TANGPHATSORNRUANG, S.; EURWILAICHITR, L.; IGARASHI, Y. *et al.* 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.
- WOLIN, M.J.; MILLER, T.L. Microbe-microbe interactions. In: Hobson PN (ed) The rumen microbial ecosystems. Elsevier, London, p. 343–459, 1988.
- WONG, D.; CHAN, V.J.; MCCORMACK, A.A.; BATT, S.B. A novel xyloglucanspecific endo-b-1,4-glucanase: biochemical properties and inhibition studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, n. 86, p. 1463–1471, 2010.

WONG, D.W.S.; CHAN, V.J.; BATT, S.B. Cloning and characterization of a novel exo- α -1,5-L-arabinanase gene and the enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, n. 79, p. 941–949, 2008.

WONG, D.W.S.; CHAN, V.J.; MCCORMACK, A.A. Functional cloning and expression of a novel endo- α -1,5-L-arabinanase from a metagenomic library. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, n. 16, p. 1435–1441, 2009.

XU, J.; GORDON, J.I. Inaugural article: honor thy symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, n. 100, p. 10452–10459, 2003.

YANDELL, M.; ENCE, D. A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 13, n. 5, p. 329–342, 2012.

YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; ABECIA, L.; NEWBOLD, C.J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, n. 6, p. 1–12, 2015.

YOUSSEF, N.H.; COUGER, M.B.; STRUCHTEMAYER, C.G.; LIGGENSTOFFER, A.S.; PRADE, R.A.; NAJAR, F.Z.; ATIYEH, H.K. *et al.* 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, n. 79, p. 4620–4634, 2013.

YU M, IRWIN DM: Evolution of stomach lysozyme: the pig lysozyme gene. **Mol Phylogenet Evol.** 5: 298-308. 10.1006/mpev.1996.002,1996.

YUE, Q; YANG, H.J.; CAO, Y.C.; ZHANG, D.F.; JIANG Y.H.,; WANG J.Q. Feruloyl and acetyl esterase production of an anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. YQ2 effected by glucose and soluble nitrogen supplementations and its potential in the hydrolysis of fibrous fetuffs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, n. 153, p. 263–277, 2009.

YUE, Z.B.; LI, W.W.; YU, H.Q. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v.128, p.738-744, 2012.