

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

**Sequenciamento do microbioma do rúmen de ovinos  
utilizando a plataforma Ion Torrent (PGM)**

**Lucas Dantas Lopes**

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre em  
Ciências. Área de Concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2013**

Lucas Dantas Lopes  
Engenheiro Agrônomo

**Sequenciamento do microbioma do rúmen de ovinos  
utilizando a plataforma Ion Torrent (PGM)**

Orientador:  
Dr. **RODRIGO MENDES**

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre  
em Ciências. Área de Concentração: Microbiologia  
Agrícola

**Piracicaba  
2013**

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

Lopes, Lucas Dantas  
Sequenciamento do microbioma do rúmen de ovinos utilizando a plataforma  
Ion Torrent (PGM) / Lucas Dantas Lopes.- - Piracicaba, 2013.  
88 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Microbioma do rúmen 2. Metagenoma 3. Comunidades bacterianas 4. Enzimas  
celulolíticas 5. Sequenciamento de segunda geração I. Título

CDD 636.3085  
L864s

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



À minha Mãe, Kátia Maria Fontes Dantas, por representar a principal fonte de apoio nos momentos mais difíceis, e pelos primeiros ensinamentos biológicos,

**Dedico.**



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo César Barreto Lopes e Kátia Maria Fontes Dantas, pelos valores passados durante a minha criação, pelo incondicional amor e incessante estímulo;

Aos meus irmãos, Luciana Dantas Lopes e Luís Paulo Dantas Lopes, pela companhia e afeto fraternal imensurável,

Aos meus avós, Nilma de Araújo Fontes, Cleonice Barreto Lopes, José Ives Lopes, Maria Lúcia Dal Farra e Francisco José Costa Dantas, pelo grande afeto e pelo conhecimento transmitido por suas experiências. Especial agradecimento aos dois últimos, pelo exemplo na vida acadêmica, e, é claro, pelas correções de português;

A Camila de Souza Varize, por todo o carinho, companheirismo e ajuda nas referências bibliográficas;

A todos os tios, primos e demais componentes da minha família, por toda a força e pelos momentos agradáveis;

Aos meus reais amigos, por me acompanharem nas fugas à superficialidade, ou pelas boas risadas nos humanos momentos superficiais;

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Mendes, por todos os ensinamentos científicos, pela agradável convivência e pela grande ajuda em situações críticas;

Ao Professor Dr. Fernando Dini Andreote, por todo o auxílio e presteza, e por abrir as portas do seu laboratório para o meu aprendizado;

Ao Professor Dr. Adibe Luiz Abdalla e à Lília Raquel Fé da Silva, por concederem as amostras de rúmen e por toda a contribuição neste trabalho;

Ao Dr. Marcelo Ferreira Fernandes, por me ajudar nos direcionamentos acadêmicos, e pelos primeiros ensinamentos científicos, de grande valia;

A Emiliana, Clederson, Leonardo, Milena, Vanessa e todos os outros colegas do laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, pelos auxílios no que me foi necessário e pela boa convivência;

A Diogo, Luana, Pedro, Thiago, Ademir e todos os colegas do laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP, pela ajuda na iniciação à biologia molecular e nas dúvidas diárias;

Aos colegas do laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros, pelos bons momentos lá vividos.

À agência financiadora do projeto do rúmen, FAPESP (2012/03848-8);

À agência CNPq, pela concessão de bolsa durante os dois anos de mestrado;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP;

Ao Charles Darwin, Louis Pasteur, Gregor Mendel, Antonie van Leeuwenhoek, Carl

Woese e demais cientistas que apresentaram uma visão além do bem e do mal, com o propósito de promover a compreensão das ciências da vida.

“Os pensadores em cujo espírito todas as estrelas se movem em órbitas cíclicas não são os mais profundos; aqueles que olham para o fundo de si da mesma forma que para um imenso universo e consigo traz vias lácteas, sabe a desordem dos caminhos de todas as vias lácteas; elas levam ao caos, ao labirinto da existência.”

Friedrich W. Nietzsche



## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Coevolução entre ruminantes e micro-organismos.....	23
2.2 Ecologia microbiana no rúmen.....	26
2.2.1 Bactérias.....	26
2.2.2 Archaeas.....	27
2.2.3 Fungos.....	28
2.2.4 Protozoários.....	28
2.2.5 Bacteriófagos.....	29
2.3 Microbioma do rúmen como fonte de enzimas celulolíticas.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Experimentação animal e amostragem.....	33
3.2 Incubação e análises químicas.....	34
3.3 Análise da comunidade bacteriana utilizando Ion Tags.....	37
3.4 Análise metagenômica.....	37
3.5 Processamento de dados, anotação e análises estatísticas.....	39
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Qualidade dos resultados dos sequenciamentos.....	43
4.2 Estrutura da comunidade bacteriana baseada nos sequenciamentos rRNA 16S e DNA total (metagenômica).....	47
4.3 Análises químicas.....	49
4.4 Correlações entre as variáveis químicas (CH <sub>4</sub> ; GP; pH e OMD) e taxonômicas (sequenciamento rRNA 16S).....	50
4.5 Comparação da estrutura da comunidade bacteriana acessada pelos métodos de sequenciamento rRNA 16S e metagenômica.....	55
4.6 Genes lignocelulolíticos identificados no microbioma do rúmen.....	58
5 DISCUSSÃO.....	61
5.1 Eficiência dos sequenciamentos e inferências ecológicas preliminares.....	61

5.2 Composição da comunidade bacteriana no microbioma do rúmen.....	64
5.3 Interpretações ecológicas baseadas nas correlações entre a estrutura taxonômica da comunidade bacteriana (rRNA 16S) e as variáveis químicas.....	66
5.4 Comparação da diversidade microbiana acessada pelo sequenciamento rRNA 16S e por metagenômica.....	69
5.5 O rúmen de ovinos como fonte de descoberta de genes relacionados à degradação da fibra vegetal.....	72
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

## RESUMO

### Sequenciamento do microbioma do rúmen de ovinos utilizando a plataforma Ion Torrent (PGM)

Os micro-organismos que habitam o trato digestivo dos ruminantes têm uma profunda influência no desenvolvimento e funcionamento do animal hospedeiro. O rúmen abriga comunidades microbianas complexas dominadas por bactérias que participam de um processo eficiente de degradação dos materiais que compõem a parede celular vegetal. Por esta razão, o microbioma do rúmen representa uma fonte inexplorada de enzimas hidrolíticas com potencial aplicação na produção de combustíveis a partir da biomassa lignocelulósica. Nós usamos a plataforma Ion Torrent (PGM) para acessar o microbioma do rúmen de quatro animais da raça Santa Inês submetidos a uma dieta base. A fim de descrever a estrutura da comunidade microbiana no rúmen de ovinos e explorar o seu potencial como uma fonte de genes de degradação da biomassa, usamos a abordagem de sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S (rRNA), utilizando Ion Tags, e a abordagem de sequenciamento metagenômico *shotgun* (DNA total), respectivamente. Além disso, medimos parâmetros químicos do ambiente do rúmen, relacionados a cada animal, incluindo pH, Degradabilidade da Matéria Orgânica (OMD), Produção total de Gás (GP) e Emissões de Metano (CH<sub>4</sub>), a fim de buscar correlações entre estas variáveis químicas e os grupos bacterianos. Em termos de estrutura da comunidade microbiana (bacteriana), encontramos Bacteroidetes como o filo dominante, seguido por Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. Alguns táxons foram correlacionados com os parâmetros químicos, como as famílias Corynebacteriaceae e Streptococcaceae, que foram positivamente correlacionadas com OMD; e a família Streptomycetaceae, negativamente correlacionada com GP e CH<sub>4</sub>. Algumas glicosil hidrolases conhecidas foram identificadas, como Endo-1,4-beta-glucanases, Beta-D-glicosídeo-glicohidrolases e outras foram designadas como putativas. Estas descobertas mostram interações ecológicas entre os grupos microbianos e funções importantes do rúmen, assim como o potencial do rúmen de ovinos para a descoberta de novas enzimas celulolíticas.

Palavras-chave: Microbioma do rúmen; Metagenoma; Comunidades bacterianas; Enzimas celulolíticas; Sequenciamento de segunda geração



**ABSTRACT**  
**Sheep rumen microbiome sequencing using Ion Torrent (PGM) platform**

The microorganisms inhabiting the digestive tracts of ruminants have a profound influence on the host animal development and functioning. The rumen harbors complex microbial communities dominated by bacteria, which participate in an efficient process to digest plant cell wall materials. For this reason, the rumen microbiome represents an untapped source of hydrolytic enzymes with potential application for fuel production from lignocellulosic biomass. We used the Ion Torrent (PGM) platform to access the rumen microbiome of four animals of Santa Inês breed under a base diet. In order to describe the structure of the microbial community in the sheep rumen and explore its potential as a source of biomass-degrading genes, we used 16S ribosomal RNA (rRNA) Ion Tags sequencing approach and shotgun metagenomic sequencing (total DNA) approach, respectively. Furthermore, we measured rumen chemical environmental parameters related to each animal, including pH, Organic Matter Degradability (OMD), Total Gas Production (GP) and Methane emissions (CH<sub>4</sub>) in order to search for correlations between these chemical variables and bacterial groups. In terms of microbial (bacterial) community structure, we found Bacteroidetes as the dominant phylum in sheep rumen microbiome, followed by Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria. Some taxa were correlated with the environmental parameters, like the Corynebacteriaceae and Streptococcaceae families, which was positively correlated with OMD, and the Streptomyetaceae family, negatively correlated with GP and CH<sub>4</sub>. Some known glycoside hydrolases were identified, such as Endo-1,4-beta-glucanases, Beta-D-glucoside glucohydrolases and others were designated as putative ones. These findings show ecological interactions among microbial groups and important rumen functions, as well as the potential of the sheep rumen for the discovery of new cellulolytic enzymes.

**Keywords:** Rumen microbiome; Metagenome; Bacterial communities; Cellulolytic enzymes; Next generation sequencing



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos compartimentos estomacais dos ruminantes.....	21
Figura 2 – Condução dos quatro animais da raça Santa Inês submetidos à mesma dieta.....	33
Figura 3 – Detalhe da fístula, por onde foram retiradas as amostras líquidas e fibrosas do rúmen de cada animal.....	34
Figura 4 – Estufa onde foi realizada a incubação das garrafas utilizadas.....	35
Figura 5 – Solução tampão utilizada para incubação.....	35
Figura 6 – Coleta do fluido ruminal incubado.....	36
Figura 7 – Sequenciador Ion Torrent (PGM).....	38
Figura 8 – <i>Score</i> de qualidade por posição no <i>read</i> de sequenciamento.....	45
Figura 9 – Curvas de rarefação extraídas do servidor MG-RAST.....	46
Figura 10 – Estrutura da comunidade bacteriana baseada no sequenciamento rRNA 16S e metagenômica.....	48
Figura 11 – Análises químicas.....	49
Figura 12 – Análise de Componentes Principais (PCA) (filos).....	52
Figura 13 – Análise de Componentes Principais (PCA) (classes e ordens).....	53
Figura 14 – Análise de Componentes Principais (PCA) (famílias).....	54
Figura 15 – Principais gêneros bacterianos encontrados nos sequenciamentos, comparados por proporções relativas de sequências entre a abordagem de rRNA 16S e metagenômica.....	56
Figura 16 – Comparação entre os filos bacterianos encontrados no sequenciamento rRNA 16S e metagenômica.....	57
Figura 17 – Funções relacionadas à degradação de celulose e lignina.....	60



**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Solução tampão.....	36
Tabela 2 – Resumo das sequências após saída do sequenciador, após os filtros de qualidade e após anotação.....	43
Tabela 3 – Grupos bacterianos que apresentaram correlação com as variáveis ambientais a diferentes níveis taxonômicos, de filo a família.....	51
Tabela 4 – Celulases identificadas na metagenômica considerando o Blastx no banco de dados do Swissprot.....	58



## 1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes são animais herbívoros que possuem o estômago dividido em quatro cavidades: rúmen, retículo, omaso e abomaso. Por essa característica, são também conhecidos como poligástricos. De todas as cavidades, apenas o abomaso é o estômago químico, ou “verdadeiro”, onde enzimas digestivas e sucos gástricos são secretados (RUCKESBUCH, 2011). O rúmen é uma cavidade especial, sendo um órgão que abriga uma enorme abundância e riqueza de micro-organismos que são responsáveis por executar funções essenciais para a nutrição do animal. Produzem enzimas que catalisam a degradação de proteínas (BROOKS et al., 2012), lipídios (KIM et al., 2009), amido (OFFNER et al., 2003), celulose, lignina, hemicelulose (KOIKE & KOBAYASHI, 2009), dissacarídeos (KASPEROWICZ et al., 2012), entre outros, liberando ácidos graxos voláteis como produtos destas reações, principalmente acetato, propionato e butirato, que são moléculas constituídas de cadeias carbônicas mais simples, as quais o animal consegue absorver e assimilar. Além disso, os micro-organismos que estão aderidos ao bolo alimentar seguem para o abomaso, onde sofrem digestão peptídica, constituindo assim uma importante fonte protéica para a nutrição do animal, já que este possui uma dieta baseada em alimentos com alta relação C/N (KAMRA, 2005; DEWHURST et al., 2000).

O conjunto dos genomas de micro-organismos associados mutualisticamente a um organismo é denominado de microbioma (HOOPER & GORDON, 2001), e as funções executadas por essa comunidade microbiana associada são fundamentais para o desenvolvimento do organismo hospedeiro. Desta maneira, os ruminantes são altamente dependentes do microbioma do rúmen para a manutenção de suas vidas, já que, na ausência microbiana, seria impossível a desconstrução da biomassa vegetal mais recalcitrante e o aproveitamento do alimento de sua dieta exclusivamente herbívora (DUNCAN & POPPI, 2008).

Para a adaptação a esta dieta inteiramente à base de plantas, ocorreu uma evolução no sistema enterogástrico dos ruminantes, que culminou na divisão de seu estômago e surgimento do rúmen. Como a biomassa vegetal é composta por moléculas de difícil decomposição, principalmente a lignina e a celulose encontradas na parede celular vegetal (COSGROVE, 2005), e os animais não são capazes de produzir enzimas atuantes na degradação desses compostos, iniciou-se um processo de co-evolução com micro-organismos capazes de executar aquelas funções. Para tal, o estômago se dividiu de modo a criar uma “câmara” (o rúmen) com condições ideais para abrigar os micro-organismos essenciais na

desconstrução da fibra vegetal (JANIS, 1976; ROSENBERG et al., 2010). Por outro lado, os micro-organismos que passaram a estar associados ao rúmen sofreram uma pressão de seleção para a utilização do material ligno-celulósico, o que promoveu o aumento da eficácia do microbioma na degradação desses compostos (TROYER, 1984).

Portanto, a partir deste metagenoma (LEY et al., 2008), ou segundo genoma do organismo, como designado por Zhao (2010), conceitos que se referem ao conjunto de todos os genes microbianos a ele associados, existe uma forte probabilidade de serem encontrados novos genes codificadores de enzimas ligno-celulolíticas com capacidade de uso industrial, como, por exemplo, para aplicação na produção de etanol de segunda geração (DUAN & FENG, 2010; SELINGER et al., 1996). Alguns estudos já identificaram novos genes candidatos, relacionados à degradação de fibra, tanto em microbiomas intestinais (POPE et al., 2010; WARNECKE et al., 2007), como em microbiomas ruminais (POPE et al., 2012; BRULC et al., 2009; HESS et al., 2011), o que reforça este potencial de descoberta.

Tradicionalmente, ensaios funcionais *in vitro* eram realizados com o intuito de encontrar isolados ativos no processo de degradação da celulose, e algumas bactérias com atividade celulolítica foram descobertas e descritas (SUEN et al., 2011a; BRULC et al., 2011; SUEN et al., 2011b). No entanto, estas técnicas apresentam vários impedimentos que limitam a descoberta de novas enzimas eficientes. O primeiro obstáculo é que a grande maioria dos micro-organismos não é cultivável (RAPPE e GIOVANNI, 2003), o que significa que não se conhecem as condições ideais para a produção de meios de cultura para a maioria deles. Sendo assim, essa grande parcela microbiana não consegue crescer e se desenvolver nos meios produzidos. Desta forma, tal empecilho age como um grande filtro para a descoberta de isolados capazes de degradar a ligno-celulose. O segundo desafio decorre do fato de que é bastante complicado simular as condições do ambiente ruminal, mantendo as condições corretas de temperatura, de movimentos do órgão, de pH, e, principalmente, de anaerobiose.

Todavia, abordagens mais eficientes têm evoluído bastante, principalmente as baseadas em análises metagenômicas. Tanto a metagenômica por meio de clonagem, quanto a baseada em sequenciamento direto. Ambas são técnicas moleculares que permitem o acesso aos genes microbianos, mesmo que esses sejam provenientes de micro-organismos ainda não cultiváveis (HANDELSMAN, 2004). Alguns estudos de microbioma do rúmen foram e estão sendo realizados, utilizando essas metodologias, tanto com sequenciamento de bibliotecas de clones (BRULC et al., 2009; PERUMBAKKAM et al., 2011; SHIN et al., 2004; SINGH et al., 2011), quanto com sequenciamento de última geração (POPE et al., 2012; HESS et al.,

2011; LI et al., 2012; CALLAWAY et al., 2010; PITTA et al., 2010; LEE et al., 2012; BRULC et al., 2009).

As abordagens de sequenciamento massivo de última geração, como, por exemplo, a do pirosequenciamento (PETROSINO et al., 2009), permitem uma maior chance de sucesso na busca por genes codificadores de enzimas eficazes na degradação da biomassa vegetal, já que o número de DNA acessado pela metagenômica baseada em clonagem é limitado, dependente do tamanho da biblioteca de clones. Este problema não existe na metagenômica baseada em sequenciamento direto, pois o DNA é inteiramente sequenciado. A vantagem do sequenciamento de última geração é a maior quantidade de sequências produzidas, permitindo assim, neste tipo de análise, uma melhor representação de todo o DNA metagenômico (SENDURE & JI, 2008).

Além do supracitado pirosequenciamento, outras abordagens de sequenciamento de última geração têm surgido, como a do Ion Torrent Personal Genome Machine™ (PGM), a qual garante uma quantidade de até 1G de *reads* com a utilização do Ion 316 micro-chip. Esta é uma técnica nova, e alguns estudos já começaram a fazer uso deste tipo de análise, obtendo resultados satisfatórios (WHITELEY et al., 2012; JÜNEMANN et al., 2012).

O presente estudo utilizou o Ion Torrent PGM™ para o sequenciamento metagenômico do microbioma do rúmen de ovinos, sendo, salve engano, o primeiro a usar esta abordagem em estudos de microbiologia em ruminantes.

Os objetivos deste estudo são descrever a composição taxonômica bacteriana no microbioma do rúmen de ovinos da raça Santa Inês submetidos à mesma dieta; comparar a estrutura da comunidade avaliada por duas metodologias diferentes; buscar correlações entre os grupos bacterianos e funções importantes no rúmen, a fim de compreender melhor a ecologia deste ambiente; e procurar novos genes relacionados à degradação da ligno-celulose em tal metagenoma, investindo na alta acurácia desta nova abordagem de sequenciamento.

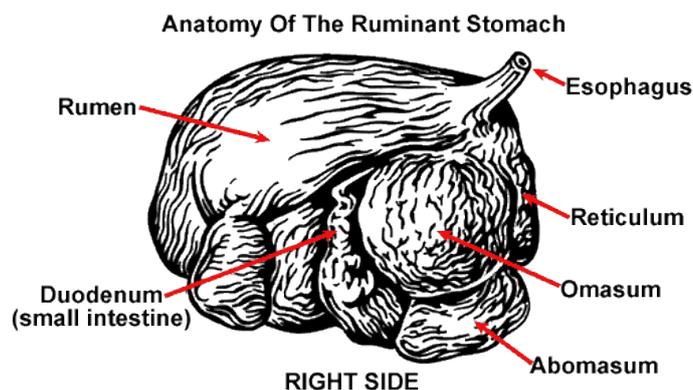


Figura 1- Representação esquemática dos compartimentos estomacais dos ruminantes



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Coevolução entre ruminantes e micro-organismos**

A interação mutualística entre os sistemas digestivos dos animais e os micro-organismos é de fundamental importância para a vida dos hospedeiros. A presença e a ação microbiana expande o espectro de funções e capacidades metabólicas possíveis no interior deles. Os estudos a respeito da dependência dos animais aos seus microbiomas mostram cada vez mais a interferência microbiana na evolução e desenvolvimento desses seres (KARASOV & KAREY, 2009; LEY et al., 2008; ROSENBERG et al., 2010).

Os ruminantes são os animais que levaram este tipo de relação simbiótica a um nível mais elevado, podendo ser considerados como os possuidores do sistema digestivo mais complexo entre os animais. Talvez eles tenham chegado, com essa associação, ao estágio mais “evoluído” entre os mamíferos, no quesito aproveitamento nutricional, em um processo de coevolução que gerou um compartimento especial para abrigar a comunidade microbiana, o rúmen (HUNGATE, 1966).

A coevolução é definida como as adaptações evolutivas recíprocas que ocorrem entre espécies que estão interagindo, a fim de manter e/ou aperfeiçoar essa relação (MORAN, 2006). Ela ocorreu no processo evolutivo dos ruminantes exatamente como esta definição sugere, com os micro-organismos afetando a evolução dos ruminantes, e com os ruminantes afetando a evolução das espécies microbianas que abrigam, gerando, a partir de então, uma interdependência entre eles (TROYER, 1984).

Os ruminantes são da ordem Artiodactyla, e a subdivisão do ancestral comum que deu origem a essa ordem e à ordem Perissodactyla (cavalos, rinocerontes, etc.) remonta ao início do antigamente chamado período Terciário, da era Cenozóica, mais precisamente nomeado hoje em dia de período Paleógeno. Foi nessa época que mudanças climáticas começaram a acontecer no planeta e os animais que deram origem aos ruminantes do presente iniciaram a evolução de modificação em seus sistemas digestivos, a fim de se adaptar a tais mudanças (JANIS, 1976).

No Eoceno, a segunda fase do período mencionado (Paleógeno), o clima na América do Norte e na Eurásia era úmido e tropical. Entretanto, com o início da fase seguinte (Oligoceno), o clima no planeta começou a se modificar, ficando cada vez mais frio e seco. Esta mudança se alongou lenta e progressivamente durante o resto do Paleógeno e continuou no Neógeno (JANIS, 1976).

Nas florestas tropicais do início do Eoceno, os proto-ruminantes selecionavam por todo o ano dietas a base de estruturas reprodutivas e de estágios iniciais de crescimento das plantas, que possuem muito baixo teor de celulose em sua composição. Porém, com a posterior mudança do clima para mais frio e seco, o desenvolvimento das plantas se tornou mais sazonal, não disponibilizando mais aquelas estruturas com baixo teor celulósico por todo o ano. Ao invés disso, os animais se depararam com a única opção de consumir uma dieta que era mais fibrosa durante algumas partes do ano, isto é, mais rica em celulose. Esta nova dieta necessitava de algum tipo de fermentação microbiana, já que os animais eram incapazes de sintetizar enzimas celulolíticas para aproveitar o novo alimento fibroso (JANIS, 1976).

Qualquer animal submetido a uma dieta fibrosa necessita entrar em algum tipo de relação simbiótica com bactérias produtoras de celulases, e desenvolver em seu aparelho digestivo algum sítio de fermentação, onde essas bactérias possam degradar a celulose. Além dos ruminantes, outros herbívoros desenvolveram diferentes tipos de modificação no sistema digestivo e interação com bactérias celulolíticas. Como exemplo, podemos citar os equinos e os roedores, que possuem o ceco gástrico desenvolvido, abrigando grande quantidade de micro-organismos que degradam a fibra (JANIS, 1976).

Todavia, os artiodáctilos ruminantes são ditos como mais eficientes do que os herbívoros não-ruminantes, por duas razões: tanto pelo fato de terem desenvolvido uma enorme câmara de fermentação (rúmen), o que lhes permitiu evitar melhor os predadores, por não precisarem digerir o alimento no local de consumo; quanto pelo fato de terem a câmara de fermentação anterior à digestão química, permitindo assim maior aproveitamento da proteína microbiana, não sendo necessário praticar coprofagia, como observado em outros herbívoros (ALEXANDER, 2009; JANIS, 1976).

Mesmo sendo a degradação da biomassa vegetal fibrosa a principal função do rúmen, ou seja, a ciclagem do carbono (C), Janis (1976) sugere que o início do surgimento do órgão estava mais relacionado à ciclagem do nitrogênio (N).

A mudança climática durante este período se deu de forma gradual, e não catastrófica, de forma que duas pressões de seleção puderam agir vagarosamente para o aumento do tamanho dos animais. A primeira pressão seletiva se caracterizava pela necessidade de um maior volume de alimento passar pelo sistema digestivo, já que grande parte do alimento ainda não era bem aproveitada. Já a segunda, foi baseada na necessidade de desenvolver maior tolerância ao clima que se resfriava continuamente, ou seja, necessidade de conservar o calor (JANIS, 1976).

O aumento no tamanho corporal, a dieta fibrosa e o clima mais seco, podem ter levado a uma maior necessidade de reciclar o nitrogênio. A proteína que chega ao estômago é convertida em amônia, que é absorvida pelo organismo, e parte dela se transforma em ureia. A ureia não é quebrada pelas enzimas do animal, porém, se houvessem bactérias capazes de quebrar essas moléculas e incorporar em sua biomassa, depois poderiam disponibilizar a proteína microbiana para a assimilação pelo animal, resolvendo dois problemas simultaneamente. O primeiro é a reciclagem do N, que cada vez se tornava mais escasso e indisponível, e o segundo é a diminuição da perda de água, já que a ureia é expelida dos animais via urina, que é à base de água (JANIS, 1976).

Estes fatores podem ter levado ao início da colonização microbiana nos animais, que depois foram lentamente induzindo no animal a formação de uma câmara que favorecesse condições ideais para a realização da atividade microbiana, como o pH próximo da neutralidade. Com o aumento gradual do conteúdo fibroso da dieta, uma seleção concomitante possivelmente ocorreu no sentido de micro-organismos celulolíticos, e, pouco a pouco, o rúmen como é hoje conhecido, surgiu, adaptado às exigências dos ciclos do C e N nas novas condições do ecossistema em que os animais viviam (JANIS, 1976).

Para outros autores, como Foote (1974), o alargamento e a divisão do estômago dos ruminantes primeiramente se deram pela pressão de seleção que agia sobre a necessidade de bactérias desintoxicantes, e não pela reciclagem do N, já que as plantas que serviam de dieta aos proto-ruminantes do Eoceno tinham um alto conteúdo de toxinas.

Mas ainda existiu outro tipo de evolução nesta interação, como mencionado no início, que é aquela observada do outro lado da coevolução, ou seja, do ponto de vista microbiano. HUNGATE (1966) discorre sobre como a aquisição e evolução microbiana ocorreu nos ruminantes. A água naturalmente possui micro-organismos anaeróbicos capazes de degradar a matéria orgânica, assim, é sugerido que as primeiras aquisições microbianas se deram através da ingestão dela. Após uma primeira absorção e início de associação, a seleção natural favoreceu os micro-organismos mais capazes de utilizar os substratos ingeridos na dieta dos animais, com maior potencial bioquímico.

Com o incremento de uma dieta mais fibrosa, uma pressão de seleção agiu sobre os micro-organismos para a decomposição dos compostos celulolíticos, aumentando gradativamente o potencial microbiano na degradação da biomassa fibrosa. Seguindo a evolução, algumas espécies ficaram mais eficientes em certas vias metabólicas, perdendo características a partir de então não mais necessárias (como a tolerância a  $O_2$ ), e um intrincado sistema de *cross-feeding* e especializações metabólicas se desenvolveram nesse ecossistema,

criando uma interdependência tanto entre as espécies microbianas, quanto entre a comunidade microbiana e os animais (HUNGATE, 1966).

Para finalizar o levantamento sobre a coevolução ocorrida entre a comunidade microbiana e os ruminantes, resta apenas o dado de como a comunidade microbiana é passada para as gerações seguintes. Existem diferentes métodos de inoculação da prole após o nascimento, que ocorre tanto via amamentação, quanto pela saliva, eructação, e até mesmo ingestão das fezes do progenitor (TROYER, 1984). Este mesmo autor também sugere que uma evolução no comportamento social foi necessária para manter a transmissão microbiana entre as gerações, inclusive apontando como este o principal fator que levou os herbívoros a viverem em sociedade (TROYER, 1984).

## **2.2 Ecologia microbiana no rúmen**

A ecologia e a diversidade dos diferentes tipos microbianos no ambiente do rúmen são moldadas pelas características peculiares deste sistema. As condições em um ovino saudável são de pH em torno de 6,8 a 7,0, garantido pela ação tamponante da contínua entrada de saliva; temperatura do animal em condições normais por volta dos 39°C; constante umidade; baixo potencial redox, causado pela diminuta concentração de O<sub>2</sub>; presença de alta quantidade de ácidos orgânicos, derivados da lise de carboidratos pelos micro-organismos; liberação de diversas toxinas provindas dos alimentos, ou mesmo de alguns membros da comunidade microbiana que lá vivem; e as diferentes dietas que os animais podem consumir (MARDEN et al., 2005; KAMRA, 2005; PITTA et al., 2010).

Apesar de estas características restringirem os habitantes que consigam viver em tais condições, o rúmen é um ambiente com uma grande diversidade microbiana, sendo encontrado lá uma grande riqueza de espécies de bactérias, além de archaeas, fungos, protozoários e bacteriófagos (KAMRA, 2005; SIROHI et al., 2012; CHAUCHEYRAS-DURAND & DURAND, 2010).

### **2.2.1 Bactérias**

As bactérias são os micro-organismos que apresentam maior riqueza de espécies e abundância no rúmen, chegando a ter mais de 10<sup>10</sup> células por grama de conteúdo ruminal (RUSSEL e RICHLIK, 2001). Atuam de forma fundamental tanto no ciclo do C, quanto no do N. No ciclo do C, produzem enzimas que agem na quebra de diversos polissacarídeos, incluindo as moléculas mais recalcitrantes, como celulose e lignina. Os animais são

inteiramente dependentes das bactérias para a execução destas atividades (KOIKE e KOBAYASHI, 2009).

Assim, alimentos fibrosos e com alta relação C:N podem ser aproveitados. O consórcio e a ação consecutiva das bactérias, na degradação dos polissacarídeos, geram ácidos graxos voláteis de cadeia curta (acetato, propionato, butirato), que podem ser absorvidos e assimilados pelo organismo do animal (KARAOV & CAREY, 2009; RUSSEL & RICHLIK, 2001). Algumas espécies de bactérias têm conhecida atividade na degradação dos compostos fibrosos, como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens* e *Eubacterium ruminantium* (STEWART et al., 1997; KOIKE & KOBAYASHI, 2009).

No ciclo do N, as bactérias também executam um papel fundamental. A proteína absorvida é quebrada em peptídeos, aminoácidos e finalmente amônia. A amônia é absorvida pelo animal ou imobilizada na biomassa microbiana. A reação de absorção da amônia pelo organismo do animal libera ureia. Parte da ureia volta para o rúmen através da saliva ou simples difusão pelos vasos sanguíneos da parede do rúmen. Como os animais não produzem ureases, e várias bactérias sim, o papel crucial delas reside justamente na quebra dessas moléculas e incorporação em sua biomassa, disponibilizando mais tarde ao animal através da digestão peptídica microbiana no abomaso, fazendo assim com que o nitrogênio reciclado seja mais bem aproveitado pelo hospedeiro (CHERDTHONG & VANAPATH, 2010). Alguns exemplos de espécies de bactérias ureolíticas conhecidas do rúmen são *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Treponema* spp., *Ruminococcus bromii*, *Butyrivibrio* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides ruminicola* e *P. productus* (WOZNY et al., 1977).

### 2.2.2 Archaeas

Outro grupo microbiano bastante importante no rúmen é o do domínio *Archaea*, embora a principal função delas nesse ambiente seja a produção de metano, que é uma atividade indesejada tanto do ponto de vista da perda de carbono para a nutrição animal, quanto por esse gás ser um dos contribuintes do efeito estufa global (JOHNSON & JOHNSON, 1995). As archaeas metanogênicas podem produzir metano de três formas conhecidas, todas elas utilizando compostos derivados da fermentação bacteriana.

Na primeira delas (hidrogenotróficas), oxidam o H<sub>2</sub> e utilizam principalmente o CO<sub>2</sub> comoceptor final de elétrons, para reduzi-lo a CH<sub>4</sub>. A segunda forma é utilizando compostos metílicos, como metanol, trimetilamina ou dimetil-sulfeto, para formar metano. E a terceira delas é utilizando o acetato com a liberação final de metano (ATTWOOD & MCSWEENEY,

2008). As archaeas metanogênicas se encontram inseridas no filo Euryarchaeota (WOESE et al., 1990), e as ordens pela qual estão distribuídas são Methanobacteriales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanococcales e Methanopyrales (ATTWOOD e MCSWEENEY, 2008).

### **2.2.3 Fungos**

Em se tratando dos fungos que habitam o rúmen, os mais importantes são aqueles do filo Neocallimastigomycota (LIGGENSTOFFER et al., 2010; GRIFFITH et al., 2010; KAMRA et al., 2005). Estes fungos fazem respiração anaeróbica, e antes de sua descoberta, se acreditava que não existiam fungos capazes de executar este tipo de metabolismo (GRIFFITH et al., 2010). Por esta característica, foram então colocados em um filo à parte, o Neocallimastigomycota, embora primeiramente classificados dentro do filo Chitridiomycota (GRIFFITH et al., 2010). Inicialmente, foram confundidos com protozoários, por seus esporos serem flagelados. Porém, ao serem observadas as estruturas vegetativas, foi constatado que se tratava de fungos, e não de protozoários (ORPIN, 1975).

Os fungos deste filo são conhecidos por sua atividade celulolítica (GRIFFITH et al., 2010, LIGGENSTOFFER et al., 2010), inclusive análises moleculares identificaram a presença de genes relacionados à produção de celulosomas (STENBAKKERS et al., 2001). Os celulosomas são complexos multi-enzimáticos relacionados à aderência à fibra vegetal e produção de enzimas celulolíticas (BAYER et al., 2004), mas só haviam sido encontradas, até então, em bactérias. Por este fato, estudos sugerem que a aquisição desses genes pelos fungos do filo Neocallimastigomycota se deu por transferência horizontal com bactérias (GARCIA-VALLVE et al., 2000).

### **2.2.4 Protozoários**

Uma das razões pela qual os fungos anaeróbicos foram inicialmente confundidos com os protozoários, é que o rúmen abriga uma grande quantidade destes últimos, tanto que já foram descritas mais de 250 espécies de protozoários habitantes do rúmen (WILLIAMS & COLEMAN, 1992). A maioria destes micro-organismos que vive neste ambiente é composta por ciliados, e estão ligados e/ou executam funções de considerável importância para os animais.

A função com que mais se relacionam é à metanogênese, já que se sabe da relação endossimbiótica existente entre eles e algumas archaeas metanogênicas (CHAGAN et al., 1999; MORGAVI et al., 2012; OHENE-ADJEI et al., 2007). Alguns protozoários ciliados

possuem hidrogenossomos, que são organelas responsáveis pela produção de ATP em meio anaeróbico, com a conseqüente liberação de H<sub>2</sub>, sendo esta a principal razão porque as archaeas metanogênicas se encontram intimamente relacionadas a eles (HACKSTEIN et al., 2001). Os protozoários do rúmen ainda são conhecidos pela atividade de fagocitar bactérias (BONHOMME et al., 1990) e degradar carboidratos, inclusive celulose (FIDLEY et al., 2011). O estudo de Ricard et al. (2006) sugere que a aquisição dos genes relacionados à degradação de carboidratos dos ciliados do rúmen se deu por transferência horizontal de genes bacterianos.

### **2.2.5 Bacteriófagos**

Um último grupo de micro-organismos, ou de unidades biológicas, que pode se encontrar no rúmen, é o de bacteriófagos. Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias. O número de partículas virais ultrapassa o número de células bacterianas ( $3 \times 10^9 - 1,6 \times 10^{10}$ ) por mililitro de fluido ruminal (KLIEVE & SWAIN, 1993). Os primeiros estudos de bacteriófagos no rúmen identificaram 26 tipos morfológicos em rúmens de bovinos e ovinos (KLIEVE & BAUCHOP, 1988) e três famílias virais: Myoviridae, Siphoviridae e Podoviridae (KLIEVE et al., 1996).

Um estudo mais recente de metagenômica viral (virômica) no rúmen de bovinos encontrou mais de 28.000 genótipos virais diferentes, sendo a grande maioria das partículas sequenciadas (~78%) pertencentes a vírus ainda não descritos. Este estudo também demonstrou que a maioria das sequências virais do microbioma acessado pertence a prófagos (fragmentos de DNA bacterianos de origem viral), superando o número de sequências de fagos líticos numa proporção de 2:1. Eles ainda constataram que os prófagos e bacteriófagos encontrados estão mais associados aos filos dominantes no rúmen dos bovinos estudados, ou seja, a Proteobacteria e Firmicutes (MILLER et al., 2012).

Os bacteriófagos são de suma importância na ecologia do rúmen, principalmente por regular a dinâmica da comunidade bacteriana (SIROHI et al., 2012; ROSENBERG et al., 2010; MILLER et al., 2012) e facilitar a transferência horizontal de genes dentro dela (MILLER et al., 2012). A transferência horizontal de genes é um fator essencial na evolução bacteriana, sendo responsável por manter uma estabilidade na comunidade microbiana frente a variações no sistema, tanto do ponto de vista da manutenção das espécies, quanto do ponto de vista funcional (AMINOV, 2011).

O papel dos bacteriófagos na dinâmica bacteriana também é bastante necessário, e o mecanismo de regulação no rúmen é o mesmo que em outros microbiomas animais, como o

intestinal. Ele se baseia na hipótese “*killing the winner*” (“matando o vencedor”) (THINGSTAD e LIGNELL, 1997), que sugere que as espécies bacterianas mais abundantes são lisadas mais rapidamente do que as menos abundantes.

Com a intensa infecção, o número de indivíduos desta espécie mais abundante começa a cair, e outra espécie com um nicho semelhante inicia um acréscimo no número de células, até atingir uma abundância dominante, começar a ser mais infectada pelos fagos correspondentes, e ter o mesmo destino da primeira espécie, com um decréscimo em sua abundância. Uma terceira espécie então continuaria o processo, e assim por diante. A espécie infectada diminui o número de organismos (pela lise viral), até chegar a um ponto onde a quantidade dos bacteriófagos correspondentes também cai consideravelmente, permitindo então um novo acréscimo na população, reiniciando o ciclo. Ao serem infectadas, as espécies têm seus números reduzidos, mas não chegam a se extinguir. Assim, os bacteriófagos agem tanto promovendo uma maior diversidade bacteriana, quanto induzindo uma redundância funcional no sistema (ROSENBERG et al., 2010).

### **2.3 Microbioma do rúmen como fonte de enzimas celulolíticas**

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

Todos os argumentos que mostram porque o rúmen é um ambiente naturalmente enriquecido para a decomposição da biomassa vegetal lignocelulósica foram apresentados acima, sendo clara a fonte potencial que esse sistema fornece para a descoberta de novas enzimas ativas e eficazes na degradação da fibra. As populações microbianas do microbioma do rúmen constituem uma rica e, até recentemente, subutilizada fonte de novas enzimas com um potencial tremendo para aplicações industriais (SELINGER et al., 1996).

A biomassa vegetal recalcitrante é basicamente constituída pelo conteúdo da parede celular vegetal. Mais especificamente, pela lignina, celulose e hemicelulose. Estes três componentes interagem entre si, se entrelaçando e formando uma estrutura rígida que aumenta a dificuldade de degradação da biomassa lignocelulósica (YWE et al., 2012; COSGROVE, 2005).

A celulose é um polímero de glicoses ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. As hemiceluloses possuem cadeias que se assemelham à da celulose, porém são ligadas por ligações  $\beta$ -1,4 entre xiloses, formando a xilana, que é o principal tipo de hemicelulose. Outros tipos de hemiceluloses são formados por cadeias de arabinosil, glucuronil ou acetil em substituição à xilana (KOYKE & KOBAYASHI, 2009; COSGROVE, 2005). A lignina possui uma cadeia bastante heterogênea, ramificada e com grande quantidade de anéis aromáticos. As enzimas lignolíticas geralmente funcionam em processos oxidativos, e, portanto, não funcionam bem em um ambiente anaeróbico como o rúmen, sendo assim mais difíceis de serem encontradas neste ambiente (SELINGER et al., 1996).

Depois da lignina, a celulose é a molécula de mais difícil decomposição, e as principais enzimas celulasas conhecidas relacionadas à sua degradação são  $\beta$ -1,4-endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolases e celodextrinases) e  $\beta$ -glucosidases, cada uma delas relacionada a uma etapa específica na quebra da molécula (DUAN & FENG, 2010).

A maior parte dos genes relacionados à degradação de celulose no rúmen (pelo menos 100 genes), estudados através de clonagem de genes, foi proveniente de bactérias. A maioria foi isolada de poucas espécies bacterianas, principalmente *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*. Uma quantidade muito inferior foi isolada de protozoários e fungos (SELINGER et al., 1996).

No ambiente do rúmen, existem quatro localidades principais onde as bactérias permanecem em atividade. Existem as bactérias de “vida livre” que se localizam na fase líquida; as que ficam aderidas às partículas de alimentos; as associadas ao epitélio do rúmen; e as que ficam ligadas à superfície dos protozoários. As populações bacterianas associadas às partículas de alimento são numericamente predominantes, representando até mais de 75% de toda a comunidade microbiana (KOYKE & KOBAYASHI, 2009).

As abordagens que estão sendo mais utilizadas atualmente para acessar o microbioma do rúmen com o propósito da descoberta de genes que codificam enzimas celulolíticas são baseadas em metagenômica. Tanto a metagenômica clássica, baseada em clonagem e triagem, quanto a metagenômica baseada em sequenciamento direto e bioinformática, além de sequenciamentos de genes relativos ao RNA de subunidades ribossômicas 16S/18S/ITS, com objetivos de descrição taxonômica (DUAN e FENG, 2010).

Alguns estudos atuais mostram resultados satisfatórios na busca por novas enzimas celulolíticas, utilizando como fonte o rúmen de alguns animais. O sequenciamento massivo do

DNA metagenômico dos micro-organismos aderidos à fibra vegetal incubada no rúmen de bovinos, revelou mais de 27 mil genes candidatos relacionados à degradação de carboidratos (HESS et al., 2011).

A abordagem metagenômica foi usada com sucesso para estudar o microbioma do rúmen de bovinos, usando tanto amostras da fase líquida, quanto da aderida à fibra vegetal, com a utilização do pirosequenciamento 454. Neste estudo, diferentes glicosídeo hidrolases foram encontradas, comparando com as encontradas no microbioma do sistema digestivo de térmitas. Eles também concluíram que a colonização inicial da fibra é realizada por micro-organismos que degradam as cadeias laterais disponíveis e facilmente degradáveis, ao invés das frações mais recalcitrantes, como celulose (BRULC et al., 2009).

Pope et al. (2012) fizeram sequenciamento metagenômico, usando pirosequenciamento FLX, para acessar o microbioma ruminal da rena de Svalbard, um ruminante do ártico. Eles encontraram mais de 20 glicosídeo hidrolases e outros genes relativos a enzimas carboidrato ativas. Eles também fizeram triagem funcional e detectaram alta atividade celulolítica em alguns clones analisados. No mesmo ano, um conjunto de clones com atividade celulolítica, extraídos de uma biblioteca de clones do rúmen de bovinos, foi utilizado para a identificação dos genes codificadores de enzimas celulolíticas. Após a identificação, um gene predito como eficiente foi expresso em altas quantidades em *E. coli*. A enzima mostrou alta eficiência em degradar ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 de polissacarídeos, assim como celulose microcristalina e papel filtro (GONG et al., 2012).

As descobertas recentes mostram a grande possibilidade de utilização de enzimas extraídas do sistema ruminal para aplicação industrial. Muito ainda está para ser descoberto, e o microbioma do rúmen de ovinos é uma fonte que continua inexplorada por meios das técnicas recentes de metagenômica, e, portanto, é o alvo deste estudo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Experimentação animal e amostragem

O experimento foi conduzido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP), Piracicaba, Brasil, onde quatro ovinos (sexo masculino, raça Santa Inês) fistulados foram alimentados com uma dieta composta de 60% de concentrado (~40% de grão de milho + ~20% farelo de soja) e 40% de volumoso (feno de capim Tifton-85, *Cynodon* spp.). Depois deste período, as amostras de rúmen foram coletadas e levadas para a incubação no laboratório e demais análises.

A fase sólida (fibrosa) e a fase líquida de cada animal foram coletadas separadamente. A fase fluida foi coletada através da fístula do animal, com o auxílio de uma mangueira acoplada numa seringa, usadas para puxar o líquido ruminal, que foi armazenado numa garrafa térmica (previamente aquecida com água a 39°C) para manter a temperatura do rúmen e evitar o choque térmico e consequente morte microbiana. A fase sólida foi coletada com pinça através da fístula e colocada em um isopor, para também evitar o choque térmico. O conteúdo ruminal coletado de cada animal foi homogeneizado (fase sólida e líquida) e imediatamente incubado para as análises posteriores.



Figura 2- Condução dos quatro animais da raça Santa Inês submetidos à mesma dieta



Figura 3- Detalhe da fístula, por onde foram retiradas as amostras líquidas e fibrosas do rúmen de cada animal

### 3.2 Incubação e análises químicas

Para a realização das análises químicas, 25 mL das amostras de rúmen homogeneizadas foram transferidas para garrafas de 160 mL com sacos ANKOM® (ANKOM Technology, USA), contendo 0,5 g da mesma proporção da dieta usada durante a condução animal e 50 mL de uma solução tampão (pH= 6,8-7,0) (Tabela 1) que continha resazurim, indicador de anaerobiose. As garrafas foram incubadas anaerobicamente (tanto o inóculo ruminal quanto a solução tampão foram mantidas com injeção de CO<sub>2</sub> antes de serem colocadas para incubação) por 24h a 39°C em incubadora de circulação forçada de ar (Marconi MA35, Piracicaba, SP). Esses parâmetros refletem as condições normais de temperatura e pH do rúmen do animal e o tempo suficiente para medir a degradabilidade do substrato utilizado (MAKKAR, 2004).

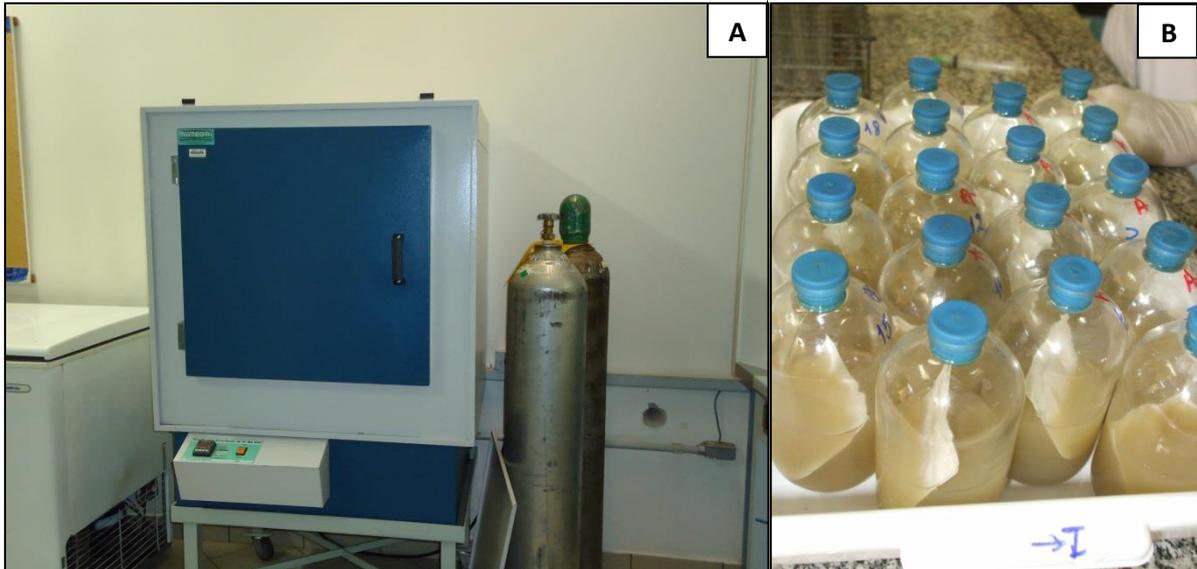


Figura 4- Estufa onde foi realizada a incubação (A) das garrafas contendo o inóculo do fluido do rúmen homogeneizado e os sacos com a dieta (B)

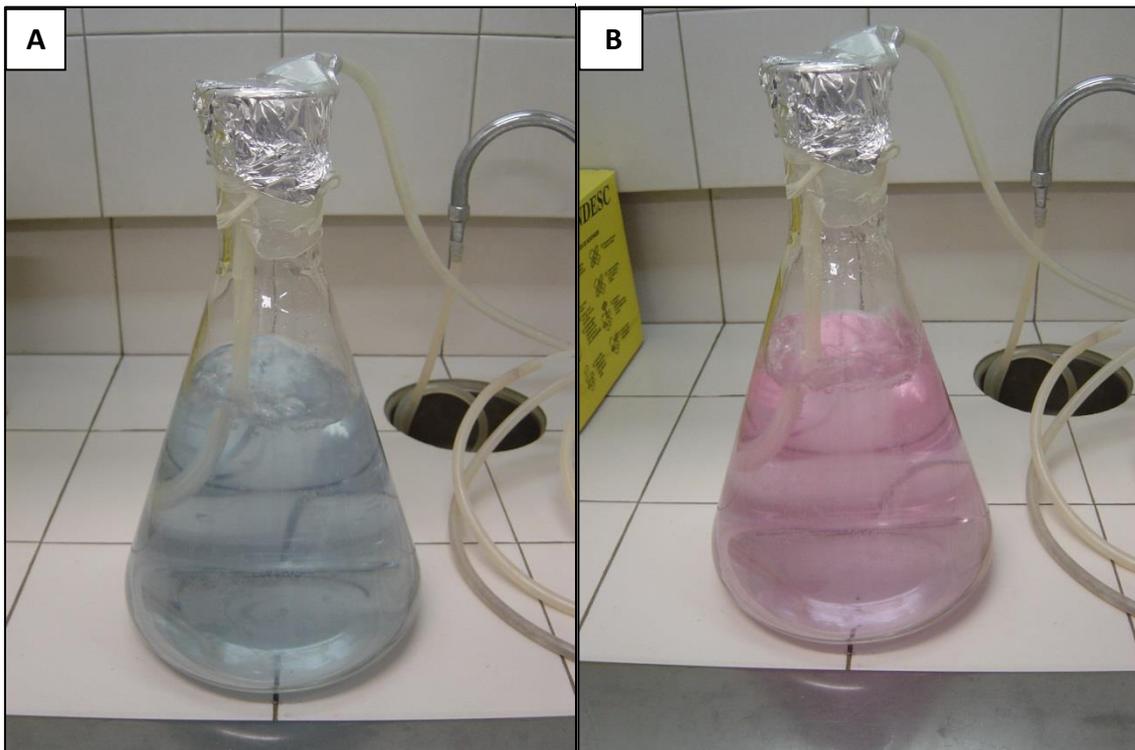


Figura 5- Solução tampão utilizada para incubação. Indicador de anaerobiose resazurim oxidado (A) e reduzido, sob adição de  $\text{CO}_2$  (B)

Depois da incubação, as garrafas foram postas no gelo com o objetivo de parar a reação de todas as amostras simultaneamente. Os saquinhos foram coletados para as análises de degradabilidade do substrato (OMD) e amostras de gás foram coletadas com seringa pela tampa de borracha das garrafas no início da incubação (0h) e após 24h para análises da

produção total de gás (GP) e concentração de metano ( $\text{CH}_4$ ). Após a retirada dos saquinhos, o pH foi mensurado em cada garrafa utilizando um pHmetro digital TECNAL (TECNAL, Piracicaba, SP), à temperatura ambiente.

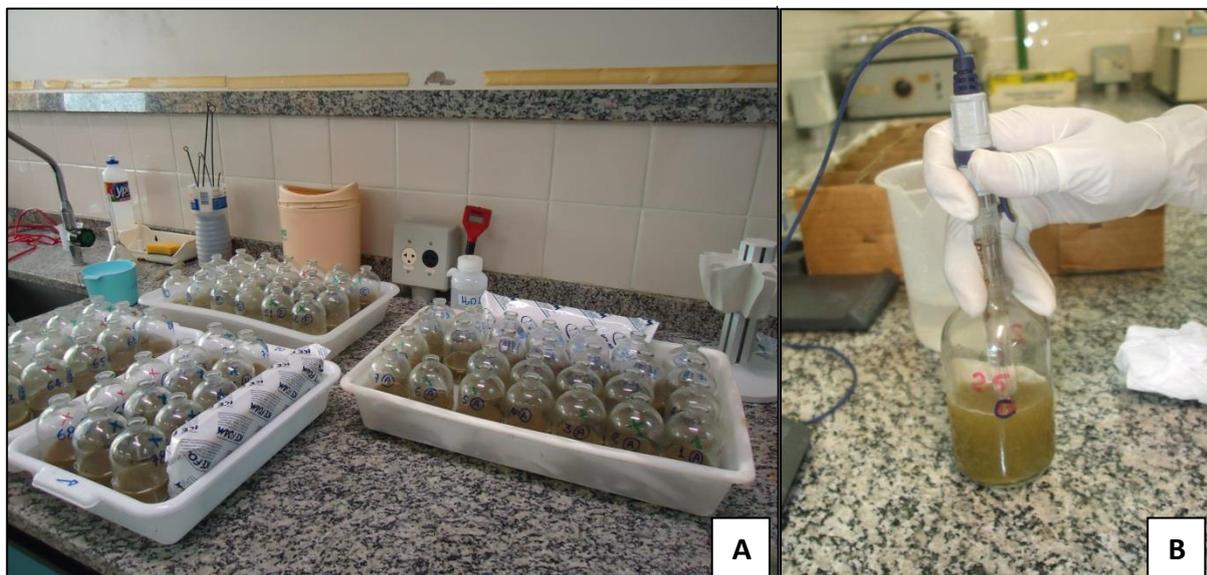


Figura 6- Coleta do fluido ruminal incubado. Parâmetros químicos coletados sob quebra de reação com adição de gelo (A) e mensuração de pH (B).

Neste ponto, 6 mL do fluido ruminal de cada garrafa foi coletado, armazenado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente ser usado na extração de DNA. O material dentro dos sacos foi usado para determinação da degradabilidade da matéria seca, e a degradabilidade real da matéria orgânica foi obtida através de incineração dos resíduos, segundo método de Van Soest et al. (1991). A produção total de gás e a concentração de metano foram determinados por cromatografia gasosa (Shimadzu 2014 GC), com uma coluna Shincarbon ST micro packed a  $60^{\circ}\text{C}$  e detector de chamas FID a  $240^{\circ}\text{C}$ , utilizando um sistema semi-automatizado (BUENO et al., 2005; LONGO et al., 2006).

Tabela 1- Solução tampão, contendo macro e micronutrientes e indicador de anaerobiose (resazurim)

Solução final	Microminerais (A)	Macrominerais (B)	Solução Tampão (C)	Meio B (D)	Sol. Resazurim (E)	
A	0,61 mL	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6,6g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 4,2921g	$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 4,5782g	Cistein HCl 2,145 g	
B	1144,55 mL	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 3,7965g	$\text{NaHCO}_3$ 40,0593g	Água dest 326,04 g	
C	1144,55 mL	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5g	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,687g		$\text{NaOH}$ 1M 13,72 mL	
D	343,2 mL	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4g			$\text{Na}_2\text{SO}_3$ 1,621 g	
E	5,5 mL					
Água	2861,65 mL					
Total	5500,055 mL	50 mL	1144,55 mL	1144,55 mL	343,2 mL	100 mL

### 3.3 Análise da comunidade bacteriana utilizando Ion Tags

O DNA total utilizado para a análise de PCR do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA) foi extraído do mesmo material ruminal incubado para análise das variáveis ambientais. Um total de 3 mL de fluido ruminal de cada animal foi usado para 4 extrações independentes de DNA, usando o kit de extração Power Soil DNA da MoBio (Geneworks, Australia), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, foi feita quantificação e checagem de pureza do DNA total na faixa de A260/A280 nm, usando NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA).

Foi realizada amplificação da região hipervariável V6 do gene rRNA 16S de bactéria usando o DNA extraído do fluido ruminal de cada animal. A amplificação foi realizada utilizando os primers A967F e 1046R (Sogin et al., 2006), e o *primer forward* foi modificado pela adição de um PGM *sequencing adapter* e um *barcode*, separados por um espaçador “GT”. Os produtos de PCR de cada um dos animais foram marcados diferentemente usando quatro barcodes diferentes (GATC; ACACT; CACAC; AGATG) e checados em eletroforese de gel de agarose (2% w/v) quanto ao tamanho e especificidade do fragmento.

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

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

### 3.4 Análise metagenômica

O mesmo DNA genômico total (gDNA) usado para a análise de PCR foi usado para a análise metagenômica. As amostras de DNA extraídas do fluido ruminal dos quatro animais foram combinadas em uma amostra única para sequenciamento. O gDNA foi submetido a uma fragmentação utilizando o BioRuptor Sonication System (Life Technologies, USA) e *ligate adapters* foram conectados aos fragmentos para a preparação da biblioteca de sequências, usando o kit Ion Plus Fragment Library. Para a seleção de fragmentos de tamanho

adequado, foi feita uma corrida em gel de agarose (2%), seguido de corte do gel na região correspondente a localização dos fragmentos de ~250 pb, e purificação com a utilização do kit PureLink™ (Invitrogen, USA).

Com o tamanho do fragmento padronizado, a biblioteca foi submetida a uma etapa de amplificação, usando o kit Ion Plus Fragment Library. Após a amplificação, o produto foi diluído até uma concentração de ~26 pM e o DNA molde foi preparado com o Ion PGM™ 200 Xpress Template Kit, antes de ser colocado no Ion-316 micro-chip. O micro-chip foi então introduzido no Ion Torrent PGM para sequenciamento (Life Technologies, USA) por 130 ciclos (520 fluxos), usando o kit Ion Sequencing. *Reads* policlonais e de baixa qualidade foram filtrados pelo software PGM, e os dados filtrados por qualidade foram exportados como arquivos FastQ e Sff.



Figura 7- Sequenciador Ion Torrent (PGM)

### 3.5 Processamento de dados, anotação e análises estatísticas

As sequências geradas tanto no sequenciamento rRNA 16S, quanto no sequenciamento do DNA total (metagenômica), foram coletadas como arquivos FastQ e inseridas na plataforma Galaxy (<https://main.g2.bx.psu.edu/>) (GOECKS et al., 2010). Uma vez nesta plataforma, os arquivos foram convertidos ao formato FastQ 33, através do comando “Quality format converter”, localizado no tópico “NGS: QC and manipulation” e subtópico “FASTX-TOOLKIT FOR FASTQ DATA” (BLANKENBERG et al., 2010). Este comando foi necessário para uniformizar o formato dos arquivos FastQ para análise na plataforma Galaxy.

A fim de realizar um filtro de qualidade nas sequências, os arquivos FastQ foram transformados com o comando “FASTQ groomer convert”, seguido por “FASTQ quality trimmer by sliding window”, ambos localizados no subtópico “FASTX-TOOLKIT FOR FASTQ DATA”. Neste mesmo tópico, um gráfico de qualidade das bases ao longo dos reads foi gerado para cada abordagem de sequenciamento (rRNA 16S e metagenômica), pelo comando “FastQC: read QC reports”. Neste ponto, as sequências da metagenômica foram baixadas e exportadas para o servidor Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology (MG-RAST) (<http://metagenomics.anl.gov/>) (MEYER et al., 2008), onde apenas a opção “dereplication” foi selecionada, já que o controle de qualidade já havia sido realizado, na plataforma Galaxy.

Já as sequências de rRNA 16S continuaram a ser trabalhadas, a fim de retirar os *primers forward* e *reverse*. Os *reads* deste sequenciamento tiveram primeiramente o *primer reverse* removido através do comando “Clip adapter sequences”, onde foi informada a sequência reversa do complementar do primer. Para separar as sequências em quatro diferentes arquivos (cada um correspondendo a um animal), foi primeiramente utilizado o comando “FASTQ to FASTA coverter”, para transformar as sequências no formato .fasta, seguido do comando “Barcode splitter”, onde as diferentes sequências de *barcodes* foram informadas com um arquivo .txt.

Os arquivos separados foram baixados, e foi feito um *upload* das sequências, que agora estavam no formato .fasta, na plataforma Galaxy. Os *tags* e os *primers forward* foram retirados através do comando “Trim sequences” (NGS: QC and manipulation). Para padronizar o tamanho das sequências e eliminar as sequências muito curtas, foi dado um último comando neste programa, “Filter sequences by length”, onde foi selecionado um tamanho mínimo de 50 bases por sequência.

Ao final disto tudo, as sequências estavam prontas para o *upload* no servidor MG-RAST, onde novamente apenas a opção “dereplication” foi selecionada, pois toda a limpeza e controle de qualidade já haviam sido realizados na plataforma Galaxy.

Uma vez no MG-RAST, os parâmetros padrão foram usados para a classificação taxonômica e funcional, com *Max. E-value Cutoff* de  $1e-5$ , *Min. % Identity Cutoff* de 60% e *Min. Alignment Cutoff* de 15 (MEYER et al., 2008). O banco de dados do Ribosomal Database Project (RDP) foi usado para anotação e classificação taxonômica para ambos os sequenciamentos, enquanto o banco de dados de proteína Subsystems foi usado para a anotação e classificação funcional da metagenômica.

Para a busca de sequências de celulasas fora do servidor MG-RAST, foram montados *contigs* a partir dos 2.254.551 *reads* obtidos por sequenciamento *shotgun*. Os *contigs* com tamanho superior a 500 pb foram utilizados no Blastx contra o banco de dados do Swissprot.

No servidor MG-RAST, as amostras do sequenciamento rRNA 16S foram utilizadas para a construção de um gráfico de curvas de rarefação, cujo resultado também forneceu os índices de diversidade de Shannon. A classificação, nos diversos níveis taxonômicos, foi extraída do servidor MG-RAST através de tabelas. Os resultados funcionais na busca por enzimas lignocelulolíticas se fez na opção “Krona-Graph”, gerado no item “table”.

A fim de identificar correlações entre a estrutura da comunidade bacteriana e as variáveis das análises químicas, foi feita uma análise de correlação no software Past (HAMMER et al., 2001). Lá, os dados taxonômicos foram normalizados, e todos os dados (incluindo os das análises químicas) sofreram uma transformação log. A análise de correlação foi executada através de um teste de correlação de Pearson, e os resultados com significância estatística ( $p < 0,1$ ) foram identificados.

Para uma melhor visualização das correlações detectadas pela análise no Past, os mesmos dados submetidos à análise deste software foram enviados a outro software, o CANOCO 4.5 (TER BRAAK e SMILAUER, 2002), onde foi feita uma análise de componentes principais (PCA). Lá, os dados também sofreram uma transformação log e primeiramente se fez uma análise de correspondência canônica (CCA), para observar o “gradient length”. Como o “gradient length” foi  $< 3SD$ , modelos lineares puderam ser utilizados (Ramette, 2007), e finalmente se fez as PCAs nos vários níveis taxonômicos desejados.

Para finalizar as análises estatísticas, foram realizadas comparações da estrutura taxonômica da comunidade bacteriana entre os dois tipos de sequenciamento, no software

Statistical Analyses of Metagenomic Profiles (STAMP) (PARKS e BEIKO, 2010). Para a identificação de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos níveis de gênero e de filo entre as duas abordagens, foi feito um teste exato de Fisher dentro do mesmo software.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Qualidade dos resultados dos sequenciamentos

Ambos os sequenciamentos produziram uma quantidade alta e adequada de sequências, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2- Resumo das sequências após saída do sequenciador, após os filtros de qualidade (quality control, QC) e após anotação. Filtro de sequências realizado na plataforma Galaxy e anotação realizada no servidor MG-RAST, para ambos os sequenciamentos (rRNA 16S e metagenômica).

	rRNA 16S tags				DNA total
	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	(Amostra composta)
Contagem de sequências de saída do PGM	188.272	233.442	212.754	221.150	2.254.551
Após QC: Contagem de Sequências	74.532	122.360	110.455	118.081	1.401.420
Após QC: Tamanho Médio das Sequências (pb)	58 +/- 3	58 +/- 3	58 +/- 3	58 +/- 3	99 +/- 25
Após QC: Percentual Médio de GC (%)	54 +/- 8	55 +/- 7	56 +/- 7	55 +/- 7	50 +/- 10
Processado: Funcionalidade de Proteínas Preditas	-	-	-	-	1.057.446
Anotação: Categorias Funcionais Identificadas	-	-	-	-	263.121
Anotado com o banco de dados do RDP (Ao nível de filós bacterianos)					
Classificadas (total de sequências)	2.262	2.265	6.731	2.673	1.166
Não classificadas (total de sequências)	1.837	724	2.454	715	64

A metagenômica gerou uma quantidade maior de sequências, já que foi feito uso de um chip (316) inteiro para este fim, por ser uma amostra composta, contendo uma mistura de DNA de todos os quatro animais. Já no sequenciamento rRNA 16S, todas as amostras de DNA provenientes de cada animal foram sequenciadas com *barcodes* em um único chip, tendo sido o número de sequências de cada animal reduzido devido a esta limitação. Mesmo assim, uma quantidade satisfatória de sequências foi gerada por ambas as metodologias, tendo apresentado a metagenômica um total de mais de dois milhões de sequências, após a saída do software PGM Ion Torrent, enquanto o sequenciamento rRNA 16S resultou em uma quantidade de quase um milhão de sequências. Após todos os filtros, limpezas e retirada de *primers* das sequências realizados na plataforma Galaxy, a quantidade de sequências ainda se manteve alta, tendo até mesmo o animal com menor quantidade de sequências, mais de 70.000 *reads* em perfeitas condições para a anotação e posteriores análises.

Após a anotação taxonômica realizada no servidor MG-RAST com base no banco de dados do RDP, em geral, mais de 2.000 sequências foram classificadas em algum filo

bacteriano. Várias sequências, apesar de terem sido classificadas no domínio *Bacteria*, não foram afiliadas a nenhum filo, recebendo a denominação de não-classificadas. Com relação à anotação funcional da metagenômica, um total de 263.121 categorias funcionais foram identificadas.

Para checar a qualidade dos sequenciamentos, foram construídos gráficos de qualidade das bases ao longo dos *reads* na plataforma Galaxy, tanto para o sequenciamento do DNA total (metagenômica), quanto para o sequenciamento rRNA 16S (Figura 8). As sequências de ambas as metodologias foram submetidas a um “quality trimming”, o que melhorou bastante o score de qualidade dos sequenciamentos. Em média, as sequências de rRNA 16S tiveram um score de qualidade de 27-28. Um resultado muito semelhante foi alcançado para as sequências da metagenômica, que também apresentaram um score médio de 27. As bases com maiores *scores* de qualidade geralmente se situaram no início do *read*, e uma gradual queda de qualidade pode ser observada no sentido da aproximação do final dos *reads*.

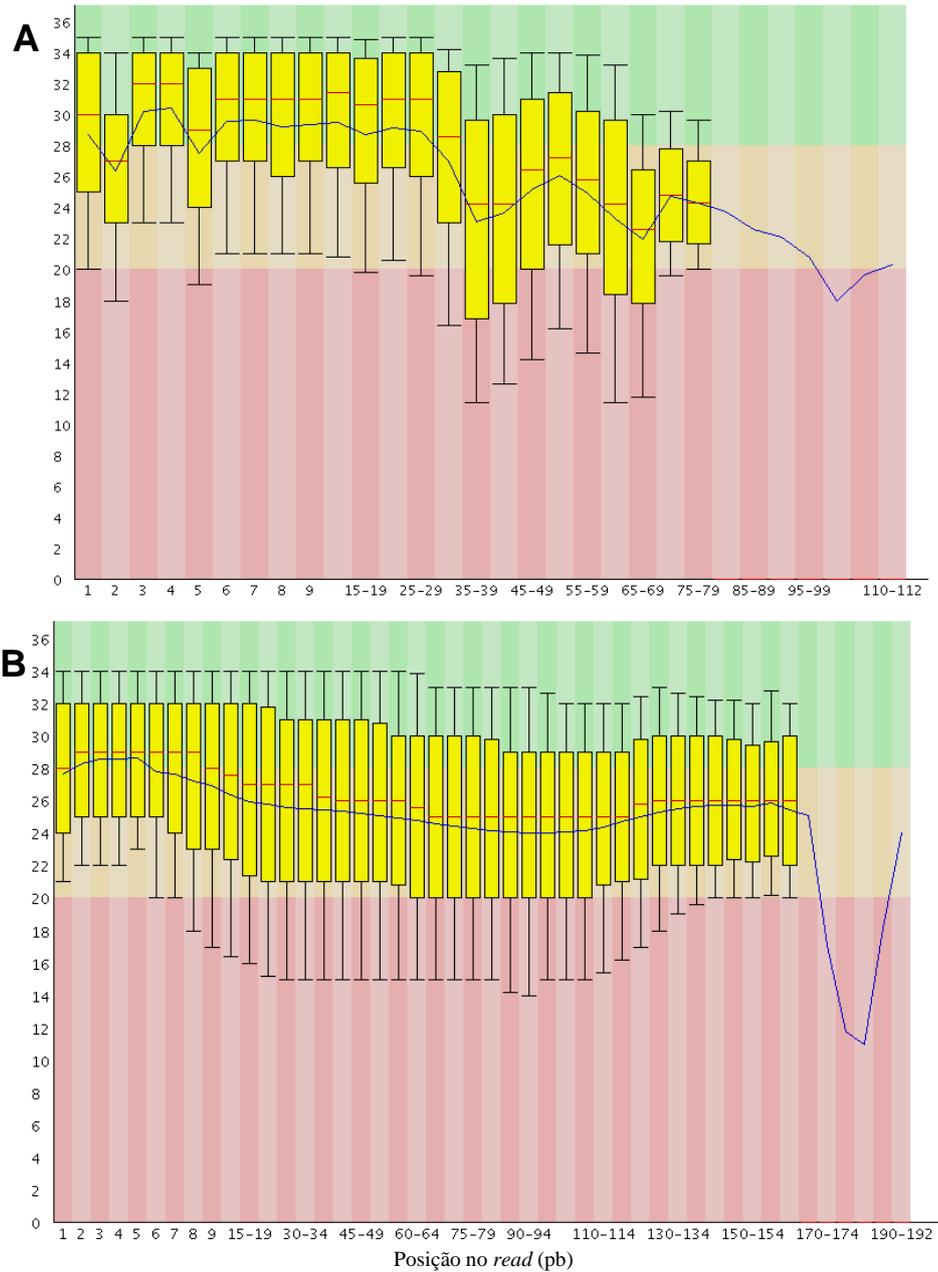
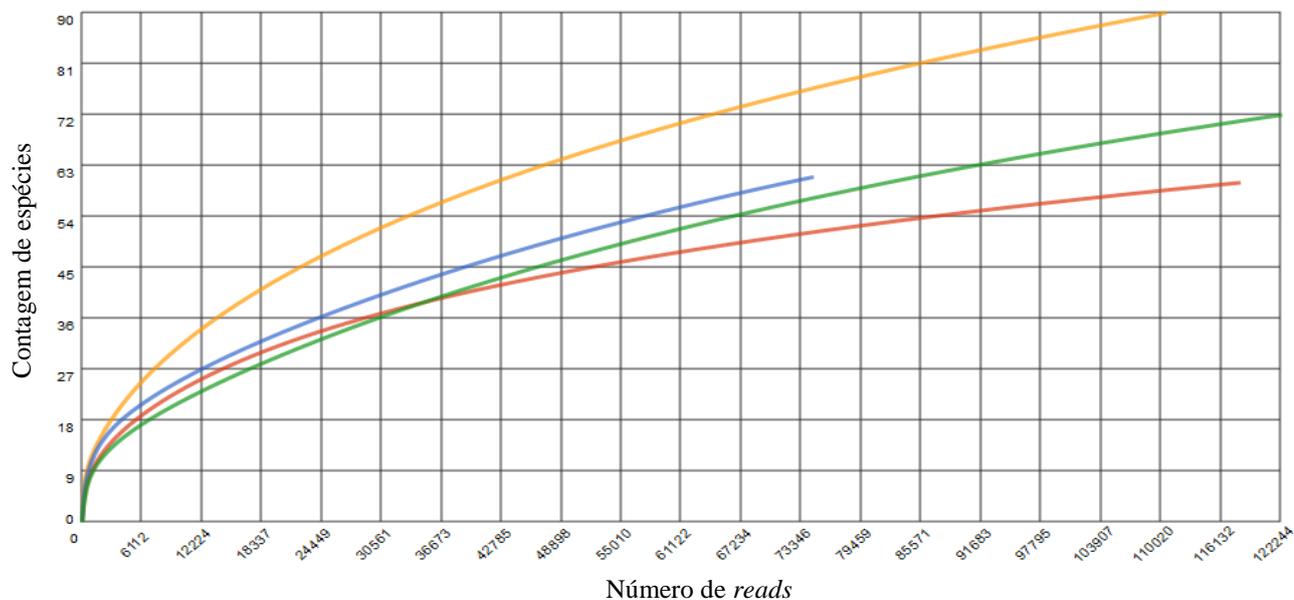


Figura 8- *Score* de qualidade por posição no *read* de sequenciamento de rRNA 16S (A) e metagenômica (B), extraído da plataforma Galaxy

Após a anotação das sequências no servidor MG-RAST, foi feita uma curva de rarefação, ainda neste servidor, com o objetivo de se verificar a variação na riqueza de espécies e na diversidade microbiana entre os rúmens dos animais estudados (Figura 9).



Legenda:

	<b>Animal 1</b>
	<b>Animal 2</b>
	<b>Animal 3</b>
	<b>Animal 4</b>

Figura 9 - Curvas de rarefação extraídas do servidor MG-RAST, mostrando a disposição dos *reads* do sequenciamento rRNA 16S entre os 4 animais. Diversidade alfa calculada a partir do índice de diversidade de Shannon, sendo Animal 1= 7,32, Animal 2= 9,46; Animal 3= 7,89 e Animal 4= 9,63

Tanto a contagem de espécies, quanto o índice de diversidade calculado em cada amostra, tiveram valores distintos, mas aproximados. No rúmen do animal 3, foi encontrado o maior número na contagem de espécies, isto é, maior riqueza, seguido respectivamente pelo animal 2, animal 1 e animal 4 (Figura 9). Um padrão quase oposto foi observado para o índice de diversidade de Shannon, onde o animal 4, que apresentou menor riqueza, mostrou o maior índice de diversidade (9,63), e o animal 3, aquele com maior riqueza de espécies dentre os quatro, apresentou o segundo menor índice de diversidade (7,89), ficando na frente apenas do animal 1 (7,32) (Figura 9). O único animal cujo rúmen preservou uma colocação semelhante a respeito dos dois índices ecológicos entre os animais, foi o animal 2, que mostrou o segundo mais rico e mais diverso ecossistema ruminal entre os quatro animais estudados.

Todas as amostras (animais) mostraram curvas de rarefação pouco íngremes à esquerda e quase planas à direita, indicando que a amostragem e o sequenciamento foram responsáveis por uma boa cobertura das espécies que compõem esse habitat.

#### 4.2 Estrutura da comunidade bacteriana baseada nos sequenciamentos rRNA 16S e DNA total (metagenômica)

A estrutura da comunidade bacteriana pode ser observada no gráfico da Figura 10, que contempla tanto a composição baseada no sequenciamento rRNA 16S em cada animal, quanto a baseada na metagenômica. Apesar da abundância dos grupos bacterianos ter se apresentado diferenciada em cada uma das amostras, os grupos dominantes são sempre os mesmos. Nas amostras individuais de cada animal (rRNA 16S) e na amostra composta (metagenômica), o filo com maior abundância foi, em geral, Bacteroidetes. A maior diferença se observa não entre os diferentes animais, mas entre as duas metodologias utilizadas. O filo Bacteroidetes apresentou uma abundância mais dominante na metagenômica, se comparado às amostras do sequenciamento rRNA 16S, sendo constatado uma quantidade de quase 80% das sequências totais desta abordagem, em contraposição a um máximo de ~55% observado nas amostras individuais. Além da maior dominância do filo citado, pode-se observar também uma maior quantidade de filios detectados na metagenômica do que na abordagem de PCR.

Apesar destas pequenas diferenças, um padrão semelhante pode ser observado entre todas as amostras, onde os filios Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria são sempre encontrados, quase sempre nesta respectiva ordem decrescente de maior abundância. Os filios Fibrobacteres e Spirochaetes também estiveram presentes em quase todas as amostras, porém, com uma abundância relativamente menor do que os filios anteriormente citados. Alguns filios foram encontrados apenas na abordagem metagenômica, como Synergistetes, Cyanobacteria, Tenericutes, Verrucomicrobia e Nitrospirae.

No nível taxonômico de gênero, o mais abundante em todas as amostras, em ambas as metodologias, foi o gênero *Prevotella*. Entre as amostras analisadas, tal gênero possuiu mais de 50% do total de sequências em duas delas (animal 4 e animal 2), 41% na amostra da metagenômica e 38% na amostra do animal 3. Apenas o animal 1 mostrou uma quantidade relativamente menor, com 20% do total de suas sequências, todavia, ainda assim, o comentado gênero foi o mais dominante nesta amostra, juntamente com *Ruminobacter*. Este último também apresentou alta quantidade de sequências em outras amostras.

Embora com uma quantidade baixa de sequências em relação aos já mencionados, os gêneros *Fibrobacter* e *Ruminococcus* foram detectados no rúmen de todos os animais e nas duas abordagens.

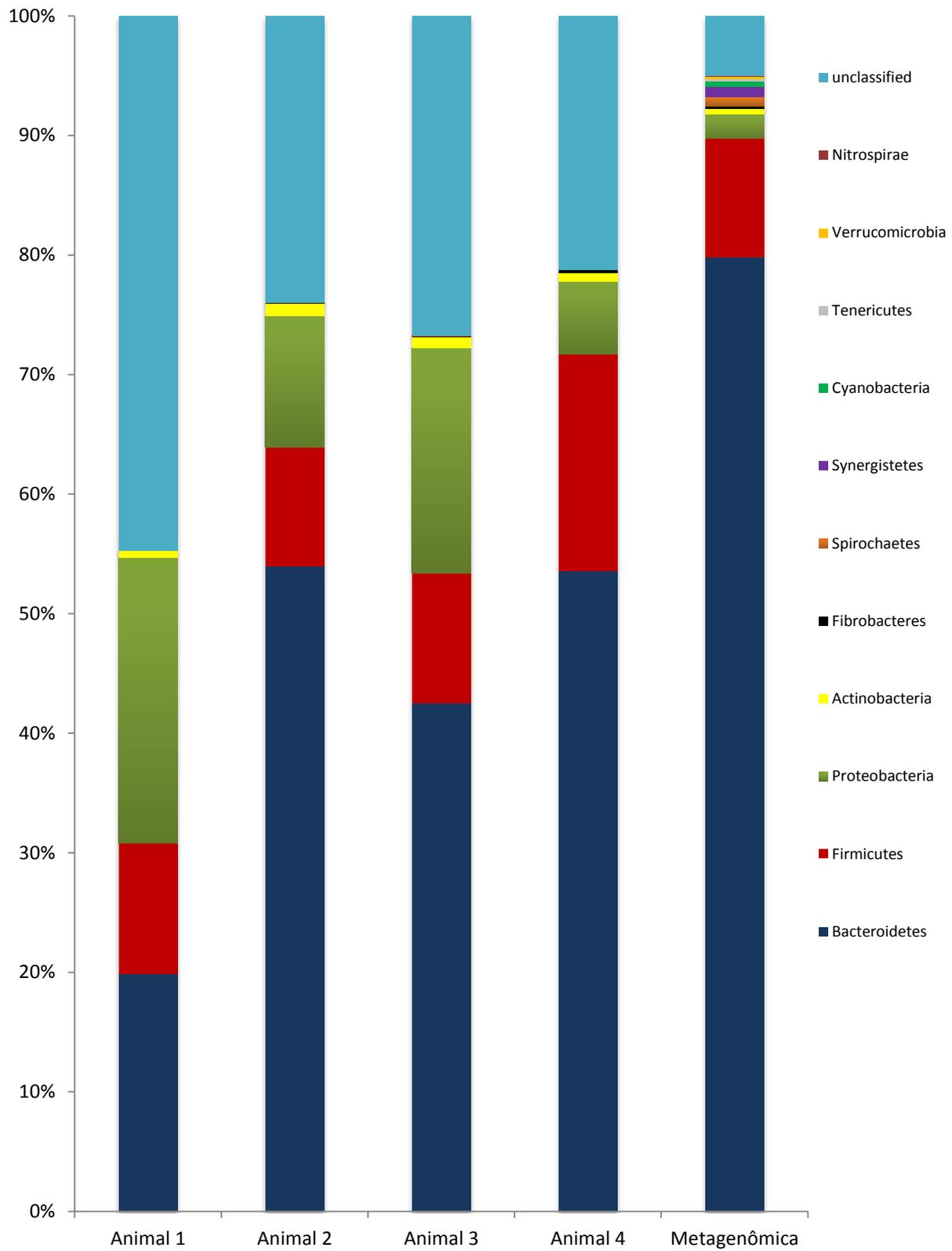


Figura 10- Estrutura da comunidade bacteriana baseada no sequenciamento rRNA 16S (Animal 1, Animal 2, Animal 3 e Animal 4) e metagenômica. Frequências relativas das sequências de filós entre os 4 animais e a amostra agrupada (DNA total). Dados extraídos do Krona Graph na plataforma MG-RAST, utilizando anotação no banco de dados do RDP

### 4.3 Análises Químicas

Os resultados das análises químicas do inóculo e do substrato incubado, medidas ao final do período de incubação, podem ser vistos nos gráficos da Figura 11. O gráfico de produção total de gás (Figura 11A) mostra um padrão semelhante ao observado no gráfico de emissão de metano (Figura 11B), assim como ao do gráfico de degradabilidade da matéria orgânica (Figura 11D), apesar deste último gráfico ter mostrado altos desvios padrão na maioria das amostras. Pode-se perceber que o animal 3 mostrou os maiores valores para as três variáveis, enquanto o animal 2 possuiu os valores mais baixos. O animal 1 e o animal 4 apresentaram sempre os valores intermediários. Por outro lado, o padrão visto para as demais variáveis não ocorre para pH (Figura 11C). Ao contrário das outras variáveis, o fluido ruminal incubado do animal 2 foi o que possuiu o valor de pH mais elevado, enquanto o do animal 3 teve o valor mais reduzido.

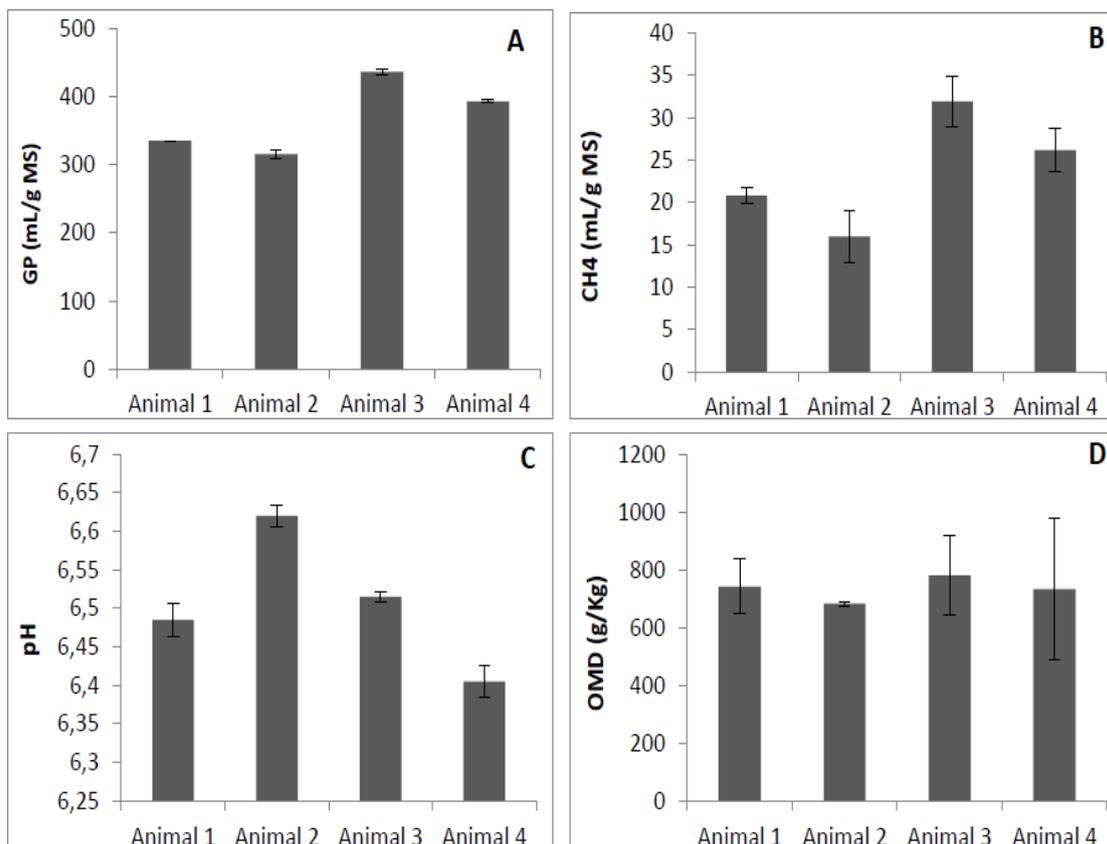


Figura 11- Análises químicas provenientes dos inóculos e substratos incubados. A: Produção total de gás (GP), mensurado em mL/ g de matéria seca; B: Emissão do gás metano (CH<sub>4</sub>), mensurado em mL/g de matéria seca; C: pH; D: Degradabilidade da Matéria Orgânica (OMD), medido em g/kg

#### 4.4 Correlações entre as variáveis químicas (CH<sub>4</sub>; GP; pH e OMD) e taxonômicas (sequenciamento rRNA 16S)

Já que o sequenciamento rRNA 16S forneceu a classificação em diferentes unidades taxonômicas (filo, classe, ordem, etc) para o rúmen de cada animal, e também foram feitas análises químicas para o inóculo e substrato incubado de cada um deles, houve a possibilidade de se fazer uma análise de correlação entre todas as variáveis químicas e as diferentes unidades taxonômicas. Devido à limitação do tamanho do fragmento, estas análises foram feitas até o nível de família, para evitar a possibilidade de inferências errôneas sobre a interpretação dos resultados desta análise a níveis taxonômicos inferiores. Na Tabela 3, é possível verificar todas as correlações significativas obtidas entre as variáveis ambientais (químicas) e taxonômicas (de filo a família). Ainda nesta tabela, é fornecido o valor probabilístico mínimo admitido para a correlação ser considerada significativa ( $p < 0,1$ ), assim como o valor de  $r$ , o coeficiente de correlação, seja ela positiva ou negativa.

As primeiras correlações observadas, em todos os níveis taxonômicos, são entre as próprias variáveis químicas, confirmando o padrão observado na Figura 11. A variável emissão de metano foi sempre positivamente correlacionada ( $p < 0,1$ ) com degradabilidade do substrato, nas análises em todos os níveis taxonômicos. Da mesma forma, emissão de metano também foi positivamente correlacionada com produção total de gás em todos os níveis, porém, a um nível de significância ainda maior ( $p < 0,5$ ). Apesar do padrão semelhante, não foi observada nenhuma correlação significativa entre degradabilidade e produção de gás.

A variável pH foi negativamente correlacionada com as bactérias do filo Fibrobacteres a todos os níveis analisados, desde o mencionado filo, passando por classe (Fibrobacteria), ordem (Fibrobacterales), até família (Fibrobacteraceae). Também foi observada correlação, mas positiva desta vez, entre pH e Actinobacteria. Porém, nos níveis taxonômicos mais inferiores, esta correlação não foi detectada, sendo a última correlação entre pH e as actinobactérias vista a nível de classe. A variável pH ainda foi negativamente correlacionada com o filo Firmicutes, contudo, a correlação foi observada apenas a este nível taxonômico.

A produção total de gás foi positivamente correlacionada à ordem Vibrionales, assim como a uma família pertencente a esta ordem, Vibrionaceae. A outra correlação vista com a produção de gás, foi com a família Streptomyetaceae, membro das actinobactérias. Esta correlação negativa foi a mais significativa de toda a análise ( $p < 0,01$ ). Esta mesma família também apresentou correlação negativa ( $p < 0,5$ ) com a variável emissão de metano, que foi

sempre positivamente correlacionada com produção de gás. A variável emissão de metano apresentou outra correlação negativa, com a família Mycobacteriaceae.

A variável degradabilidade da matéria orgânica apresentou várias correlações, sendo todas no nível taxonômico mais inferior analisado, ou seja, o de família. As famílias Mycobacteriaceae, Myxococcaceae e Acidaminococcaceae, apresentaram correlações negativas ( $p < 0,1$ ) com esta variável, enquanto as famílias Streptococcaceae e Corynebacteriaceae apresentaram correlações positivas, com maior significância estatística ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3- Grupos bacterianos que apresentaram correlação com as variáveis ambientais (químicas), a diferentes níveis taxonômicos, de Filo a Família. Análise de correlação (teste de Pearson) realizada no software PAST, sendo demonstrados na tabela os valores de  $r$ , com o sinal de (-) designando correlação negativa, e ausência de sinal designando correlação positiva.

Filo	$r$	$p$	Família	$R$	$P$
pH x Fibrobacteres	-0,91	0,08*	OMD x Corynebacteriaceae	0,96	0,03**
pH x Actinobacteria	0,92	0,07*	OMD x Mycobacteriaceae	-0,93	0,08*
pH x Firmicutes	-0,95	0,04**	OMD x Streptococcaceae	0,94	0,05**
OMD x CH4	0,91	0,08*	OMD x Acidaminococcaceae	-0,93	0,06*
GP x CH4	0,98	0,02**	OMD x Myxococcaceae	-0,91	0,06*
Classe	$r$	$p$	pH x Fibrobacteraceae	-0,92	0,08*
pH x Actinobacteria	0,92	0,07*	GP x Streptomycetaceae	-0,98	0,01***
pH x Fibrobacteria	-0,91	0,08*	GP x Vibrionaceae	0,93	0,06*
OMD x CH4	0,91	0,08*	CH4 x Streptomycetaceae	-0,97	0,03**
GP x CH4	0,97	0,02**	CH4 x Mycobacteriaceae	-0,96	0,07*
Ordem	$r$	$p$	CH4 x OMD	0,91	0,08*
pH x Fibrobacterales	-0,91	0,08*	CH4 x GP	0,97	0,02**
GP x Vibrionales	0,93	0,06*			
CH4 x OMD	0,92	0,08*			
CH4 x GP	0,97	0,02**			

Legenda: OMD= Degradabilidade da Matéria Orgânica (g/kg); GP= Produção de Gás Total (mL/g de Matéria Seca); CH4= Produção de Metano (mL/g de Matéria Seca).

\*: significativo com  $p < 0,1$

\*\* : significativo com  $p < 0,05$

\*\*\*: significativo com  $p < 0,01$

Para ilustrar as correlações detectadas, foram feitas análises de componentes principais (PCA) para todos os níveis taxonômicos analisados (Figuras 12, 13 e 14), a fim de facilitar a visualização de como as variáveis taxonômicas se comportam em relação às químicas. Na

Figura 12, pode-se ver claramente a correlação negativa entre a variável pH e os filos Fibrobacteres e Firmicutes, que se encontram em sentidos diametralmente opostos. Já o filo Actinobacteria está numa posição muito próxima à do pH, confirmando a correlação positiva. As variáveis emissões de metano, produção de gás e degradabilidade também estão muito próximas no gráfico.

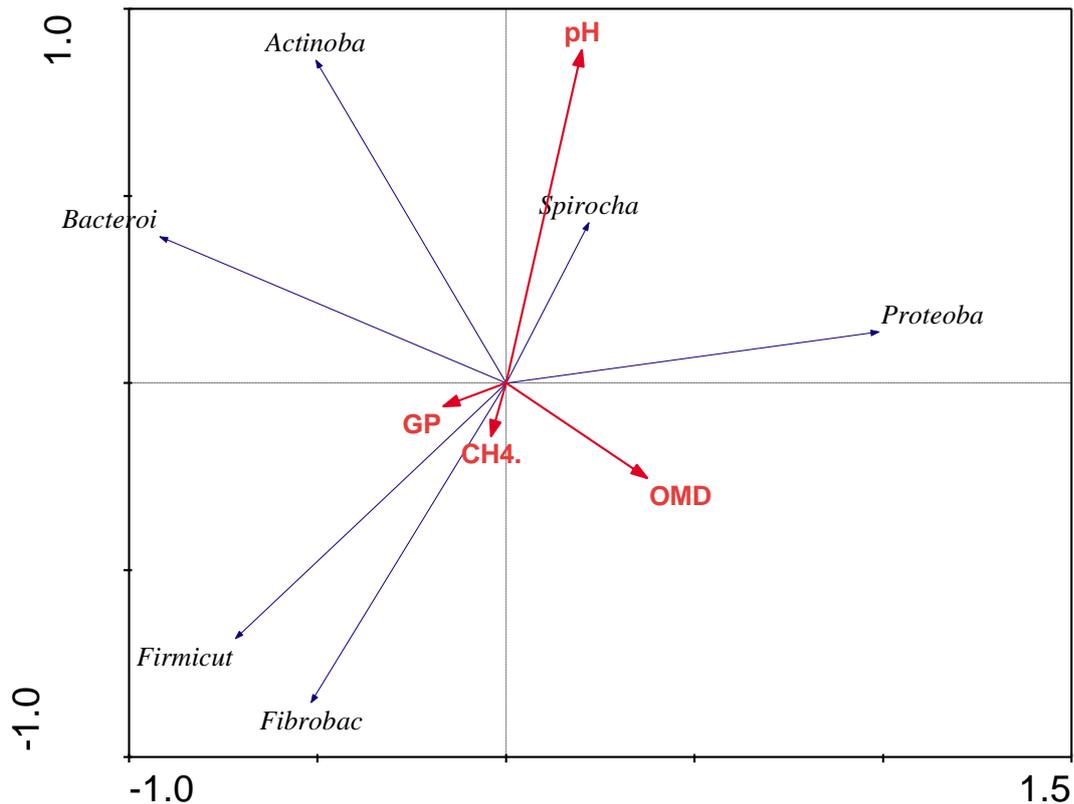


Figura 12- Análise de Componentes Principais (PCA), mostrando a disposição das variáveis químicas (CH<sub>4</sub>; OMD; GP; pH) e variáveis taxonômicas (UTOs de filos) no software CANOCO 4.5

A correlação negativa das fibrobactérias com o pH continua bastante evidente nos gráficos no nível de classe e de ordem (Figura 13), estando sempre em sentidos opostos. A classe Actinobacteria apresenta-se no mesmo sentido que a variável pH, mas no nível taxonômico seguinte já não se observa nenhuma ordem de actinobactérias próxima a tal variável. A proximidade entre a ordem Vibrionales e a produção de gás também demonstra a correlação positiva encontrada entre as duas variáveis abordadas.

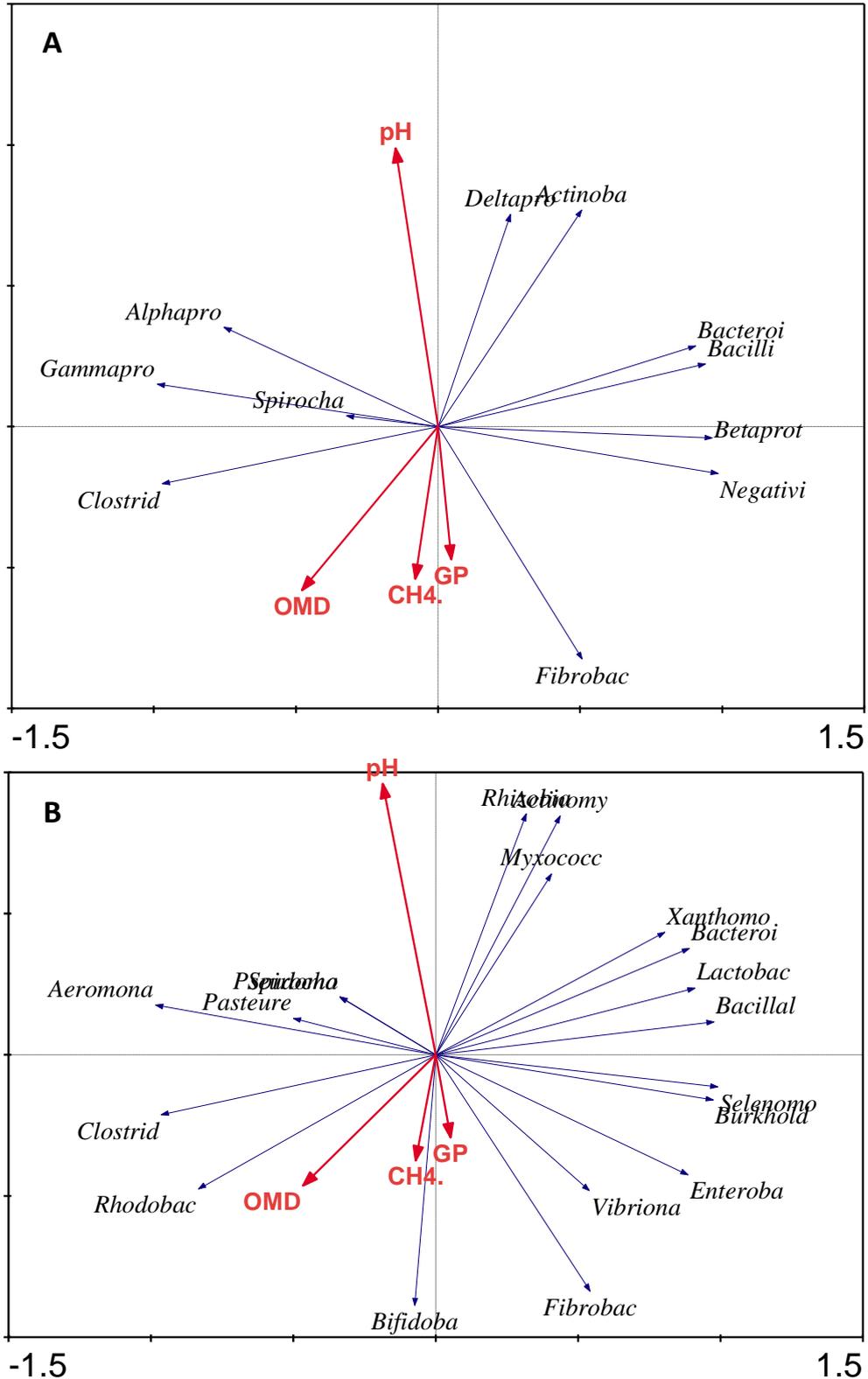


Figura 13- Análise de Componentes Principais (PCA), mostrando a disposição das variáveis químicas (CH<sub>4</sub>; OMD; GP; pH) e variáveis taxonômicas no software CANOCO 4.5. A: UTOs classificadas no nível de Classe e B: UTOs classificadas no nível de Ordem

No nível taxonômico de família, a dificuldade em se observar as correlações detectadas aumenta, devido a grande quantidade de famílias em estudo. Porém, ainda assim, algumas delas são facilmente observáveis, como é o caso da correlação negativa entre pH e Fibrobacteraceae; da correlação positiva entre as variáveis químicas emissão de metano com degradabilidade e com produção de gás; da correlação positiva entre a variável degradabilidade com as famílias Corynebacteriaceae e Streptococcaceae; e da correlação negativa entre degradabilidade com as famílias Mycobacteraceae e Acidaminococcaceae (Figura 14).

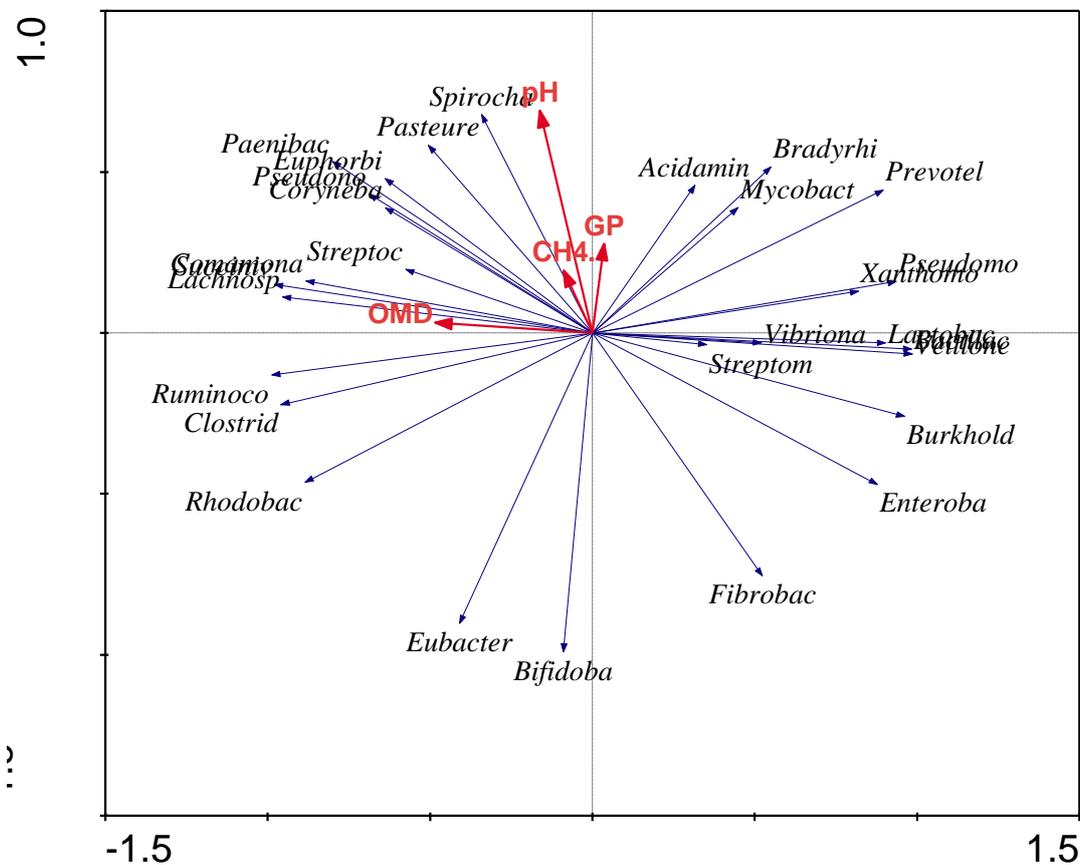


Figura 14 - Análise de Componentes Principais (PCA), mostrando a disposição das variáveis químicas no software CANOCO 4.5 (CH<sub>4</sub>; OMD; GP; pH) e variáveis taxonômicas (UTOs classificadas no nível de Família)

#### 4.5 Comparação da estrutura da comunidade bacteriana acessada pelos métodos de sequenciamento rRNA 16S e metagenômica

Ao se comparar a abordagem metagenômica (DNA total) com a baseada no sequenciamento rRNA 16S, pode-se observar que o número de sequências não-classificadas foi, proporcionalmente, muito maior na análise de rRNA 16S do que na de DNA total. Em geral, por volta de 30% das sequências bacterianas não tiveram classificação no nível taxonômico de filo (ou táxons inferiores) na abordagem de PCR, contra apenas 5% na metagenômica (figura 16).

Dos filios encontrados nos dois sequenciamentos, apenas Actinobacteria e Fibrobacteres não apresentaram diferenças significativas entre as duas abordagens. Os filios Bacteroidetes e Spirochaetes foram encontrados em maior abundância na análise metagenômica, enquanto os filios Firmicutes e Proteobacteria foram significativamente mais abundantes na análise de rRNA 16S.

A predominância dos gêneros bacterianos de acordo com a abordagem também seguiu, logicamente, o mesmo padrão que o de filo. Sendo assim, vários dos gêneros componentes do filo Bacteroidetes (*Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Porphiromonas*, *Barnesiella*, *Alistipes*, *Pedobacter*, *Paraprevotella*, *Sphingobacterium*) foram significativamente mais abundantes na abordagem metagenômica, com exceção da *Prevotella*, o gênero claramente mais abundante em ambos os sequenciamentos, que não apresentou diferenças significativas entre as duas abordagens. A maioria das sequências com diferenças significativas ao nível de gênero no filo Firmicutes (*Butyrivibrio*, *Selenomonas*) apresentaram maior abundância no sequenciamento rRNA 16S, enquanto outros gêneros, como *Ruminococcus* e *Pseudobutyrvibrio*, assim como a maioria dos gêneros deste filo, não apresentaram diferenças significativas entre as duas metodologias.

Os únicos gêneros do filo Proteobacteria que apresentaram diferenças significativas entre as abordagens foram *Succinivibrio* e *Desulfohalobium*, que tiveram uma proporção de sequências maior no sequenciamento rRNA 16S, em relação à metagenômica. Ainda neste filo, vários outros gêneros, com uma quantidade inferior a 1% das sequências, não apresentaram diferenças significativas entre os dois tipos de análise (Figura 15).

Assim como o filo Actinobacteria, os gêneros que compõem este filo também não apresentaram diferenças significativas entre as abordagens, com a exclusiva exceção de *Microbacterium*, mais abundante na análise metagenômica.



Figura 15 - Principais gêneros bacterianos encontrados nos sequenciamentos, comparados por proporções relativas de seqüências entre a abordagem de rRNA 16S (laranja) e metagenômica (azul) no software STAMP

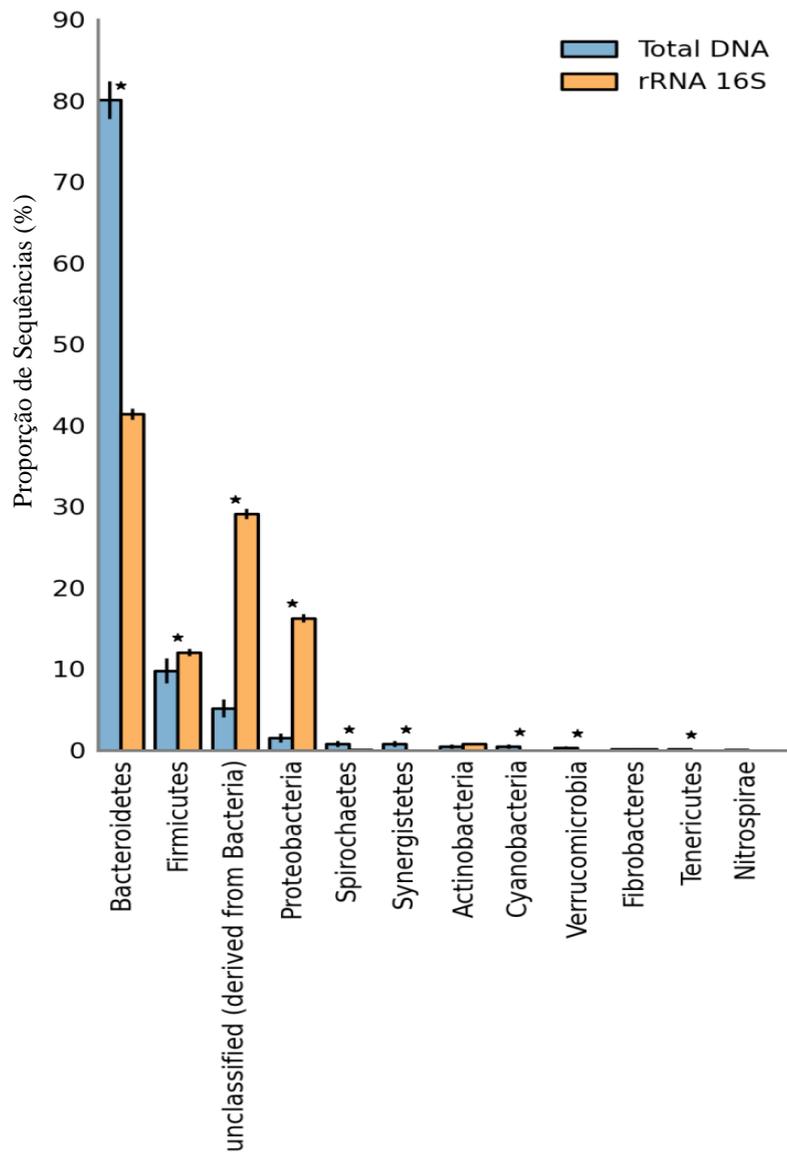


Figura 16 - Comparação entre os filos bacterianos encontrados no sequenciamento rRNA 16S (laranja) e metagenômica (azul), representados por proporções relativas de sequências no software STAMP

#### 4.6 Genes lignocelulolíticos identificados no microbioma do rúmen

As análises de metagenômica funcional foram feitas utilizando dois bancos de dados diferentes. Uma delas foi feita no próprio servidor MG-RAST, onde também foram realizadas as análises de classificação taxonômica. Neste servidor, foi utilizado o banco de dados de proteína Subsystems. Paralelamente, foi realizada uma análise tendo como alvo específico a identificação de celulases. Para a busca de sequências de celulases foram montados *contigs* a partir dos 2.254.551 *reads* obtidos por sequenciamento *shotgun*. Os *contigs* com tamanho superior a 500 pb foram utilizados no Blastx contra o banco de dados do Swissprot. As sequências de celulases foram selecionadas e estão apresentadas na Tabela 4.

Os resultados destas análises revelaram várias sequências codificadoras de enzimas relacionadas à degradação da ligno-celulose. Algumas das enzimas já são conhecidas, enquanto outras são desconhecidas, ao que se atribuiu os termos “provável”, “putativa”, “hipotética” ou “predita”.

A Tabela 4 lista celulases encontradas na análise que utilizou o banco de dados Swissprot, i.e. relacionadas exclusivamente à desconstrução da celulose, o alvo maior do estudo, no caso, endoglucanases e beta-glicosidases. Não foram encontradas sequências relativas às exoglucanases.

Esta análise detectou três *hits* diferentes para endoglucanases e cinco *hits* diferentes para beta-glicosidases, além de várias outras enzimas relacionadas à quebra de outras frações da biomassa vegetal, como xilanases (hemicelulose) e amilases (amido).

Tabela 4 - Celulases identificadas na metagenômica considerando o Blastx no banco de dados do Swissprot utilizando *contigs* maiores de 500 pb

Enzima	No acesso (E- value)	Descrição	Família CAZy
Endoglucanase (3.2.1.4)	P22534	Endo-1,4-beta-glucanase A	GH9, GH48
Endoglucanase (3.2.1.4)	P15704	Endo-1,4-beta-glucanase	GH5
Endoglucanase (3.2.1.4)	Q5NAT0	Endo-1,4-beta glucanase 2	GH9, CBM49
beta-glicosidase (3.2.1.21)	A1DCV5	Beta-D-glucoside glucohydrolase L	-
beta-glicosidase (3.2.1.21)	P16084	Beta-D-glucoside glucohydrolase	GH3
beta-glicosidase (3.2.1.21)	Q2UMV7	Probable glucan 1,3-beta-glicosidase D	-
beta-glicosidase (3.2.1.21)	P27034	Beta-D-glucoside glucohydrolase	GH3
beta-glicosidase (3.2.1.21)	Q2UTX5	Beta-D-glucoside glucohydrolase E	-

Já a análise funcional no servidor MG-RAST detectou outras enzimas, relativas à degradação de celulose e lignina. Assim como na análise anterior, esta análise também encontrou enzimas já conhecidas e outras ainda desconhecidas, classificadas como putativas. Os gráficos da Figura 17 demonstram algumas das enzimas encontradas nesta análise.

Sobre as enzimas relacionadas à quebra de celulose, foram encontrados 33 *reads* classificados como beta-glicosidases, 1.126 *reads* de glicosil hidrolases família 13 (Figura 17A); 763 *reads* de glicosil hidrolases putativas de funções desconhecidas (Figura 17B); 13 *reads* de glicosil hidrolases família 43 hipotéticas (figura 17C); e 135 *reads* de glicosil hidrolases preditas (não representado).

Em se tratando de degradação da lignina, foram encontrados 90 *reads* de multi-cobre oxidase, enzima relacionada à quebra de compostos fenólicos, e assim associada à atividade lignolítica (Figura 17D).

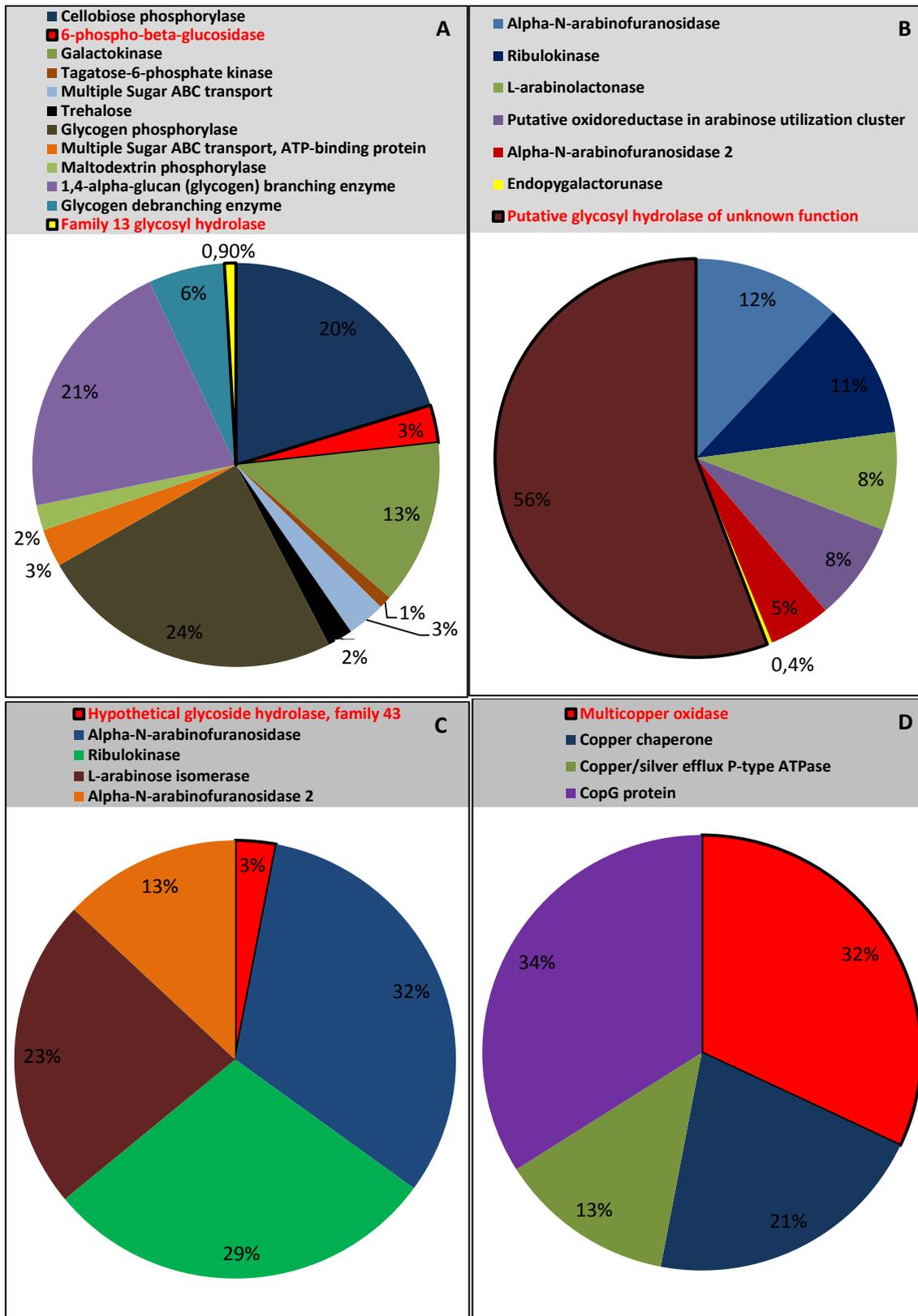


Figura 17- Funções relacionadas à degradação de celulose e lignina. Dados extraídos do MG-RAST (Krona Graph), com anotação no banco de dados de proteínas Subsystems. A: beta-glicosidase e glicosil hidrolase encontradas dentro do sub-grupo “Di and Oligosaccharides”; B: glicosil hidrolase putativa encontrada dentro do sub-grupo “Miscellaneous”; C: Hipotética glicosil hidrolase encontrada dentro do sub-grupo “L-Arabinose utilization”; D: multi-cobre oxidase encontrada dentro do sub-grupo “Cobre homeostasis”

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Eficiência dos sequenciamentos e inferências ecológicas preliminares

Tanto o sequenciamento do DNA total, também conhecido como “shotgun metagenomics”, quanto o sequenciamento da região hipervariável V6 do gene rRNA 16S, produziram quantidades satisfatórias de *reads*. Ambos os chips 316 utilizados tiveram eficiências de sequenciamentos dentro ou até maiores do que o esperado para este tipo de análise.

Whiteley et al. (2012), realizaram sequenciamento metagenômico (*shotgun* e rRNA 16S) com o PGM Ion Torrent, utilizando tanto o chip 314, quanto o 316 para acessar a comunidade microbiana em digestores anaeróbicos de dejetos suínos. Eles obtiveram uma quantidade de mais de 650.000 *reads* na saída bruta do chip 314 e por volta de 2,5 milhões de sequências com o chip 316. Após os filtros de qualidade, o número de *reads* foi reduzido para 350.000 com o chip 314 e 1,2 milhão para o chip 316.

O estudo presente, utilizando o chip 316, gerou uma quantidade bruta de *reads* próxima ao mencionado acima para o sequenciamento do DNA total (2,25 milhões de sequências) e um pouco menos para o sequenciamento dos *amplicons* (quase 1 milhão de sequências) (Tabela 2). Entretanto, após os filtros de qualidade, na metagenômica (DNA total), a quantidade final de *reads* supera ao observado no estudo de Whiteley et al. (2012) (1,4 milhão vs. 1,2 milhão), indicando que além de uma alta quantidade de sequências, a qualidade do sequenciamento também foi elevada.

Outro trabalho utilizando o PGM Ion Torrent, para estudar mudanças na comunidade bacteriana em placas subgingivais de pacientes submetidos a diferentes tratamentos (JÜNEMANN et al., 2012) também gerou uma quantidade alta de sequências com o chip 314. Neste trabalho não foi feito sequenciamento do DNA total, apenas de rRNA 16S. Utilizaram um chip 314 para cada amostra a ser sequenciada, e obtiveram uma quantidade muito próxima (~600.000 *reads* por amostra) ao encontrado no sequenciamento deste trabalho, que utilizou o chip 316 (~1 milhão de *reads*). Contudo, os *reads* de rRNA 16S exibidos na Tabela 2, reflete apenas metade do total de sequências produzidas, visto que foi utilizada apenas a metade do chip, pois a outra metade da capacidade do chip foi compartilhada para o sequenciamento de um outro experimento. Portanto, em relação aos outros estudos utilizando o PGM Ion Torrent, os sequenciamentos deste estudo se mostraram altamente produtivos e acurados.

Já outros estudos, utilizando diferentes abordagens, como a do pirosequenciamento, não conseguem gerar uma quantidade em iguais proporções às dessas análises, por limitações

da técnica, que não possui a mesma capacidade de geração de *reads* que o Ion Torrent. Brulc et al. (2009), estudando metagenômica do rúmen de bovinos, gerou uma quantidade muito alta de sequências com o pirosequenciamento 454 (~1 milhão de sequências em uma corrida). Ainda assim, tal sequenciamento gerou apenas a metade da quantidade do sequenciamento que produziu menos *reads* deste trabalho, como já especificado, o do rRNA 16S (quase 1 milhão de sequências em metade de um chip 316). É importante notar que no estudo de Brulc et al. (2009) ele gerou fragmentos com comprimento médio de 100 pb, tamanho similar ao obtido em nosso experimento usando a abordagem metagenômica (Tabela 2).

Em outro estudo com rúmen de bezerros, também foram usadas duas metodologias de sequenciamento, da mesma forma que o abordado aqui. Sequenciaram tanto uma região alvo do gene rRNA 16S, quanto o DNA total (metagenômica), porém, com a abordagem de pirosequenciamento Roche/454 FLX (LI et al., 2012). Tanto a metagenômica, quanto o sequenciamento rRNA 16S, produziram quantidades de *reads* bem inferiores ao atingido neste estudo.

De forma semelhante, Steven et al. (2012) utilizaram as mesmas abordagens, mas com o propósito de verificar alterações na comunidade microbiana de dois diferentes solos estudados, e também obteve quantidades de sequências muito próximas ao último trabalho mencionado (LI et al., 2012).

Porém, além do número de sequências é importante se levar em conta a qualidade das mesmas. Para tanto, comparações com alguns estudos também puderam ser feitas, já que gráficos de qualidade das bases nos *reads* produzidos nos sequenciamentos foram construídos na plataforma Galaxy.

Whiteley et al. (2012), conseguiram um score de qualidade de mais ou menos 20, para a região V6, com a química de sequenciamento de 100 pb. Este estudo, que utilizou exatamente os mesmos critérios (região V6 e química de 100 pb), obteve um score de qualidade de ~28, muito superior ao estudo sob comparação. A abordagem de metagenômica, onde também foi utilizada a química de 100 pb, mostrou um score de qualidade muito semelhante, de ~27 (Figura 7). Até mesmo o melhor *score* de qualidade conseguido no trabalho de Whiteley et al. (2012) não supera os valores de *score* aqui encontrados (região V3, química 200), o que demonstra a alta qualidade dos sequenciamentos deste trabalho.

Para reforçar ainda mais a qualidade aqui atingida, mesmo se comparando com um estudo de pirosequenciamento 454, onde teoricamente a qualidade das sequências é maior do

que na da metodologia Ion Torrent, os *scores* de qualidade dos *reads* aqui alcançados ainda se mostraram mais elevados (BRULC et al., 2009).

Saindo da discussão sobre a qualidade metodológica e experimental, e falando a respeito da qualidade relativa ao estudo de ecologia microbiana, o sequenciamento também mostrou uma alta robustez, como poder ser visto na Figura 9. O gráfico das curvas de rarefação incluiu as amostras dos quatro animais da análise de rRNA 16S. Como a metagenômica foi contemplada com uma mistura das amostras de DNA de todos os animais, ela não foi incluída no gráfico das curvas de rarefação.

Assim como salientado nos resultados, as curvas de rarefação mostraram boa cobertura das espécies que compõem o ambiente do rúmen dos ovinos. A única amostra que poderia ter uma cobertura melhor, pois mostrou riqueza de espécies e diversidade mais baixas em relação às outras, foi a do animal 1. As curvas mostram diferenças na estrutura da comunidade bacteriana entre os diferentes animais, com valores de riqueza e índices de diversidade distintos, ainda que próximos. Em um estudo onde o pirosequenciamento de *amplicons* foi usado para caracterizar a comunidade bacteriana do rúmen de dezesseis vacas em lactação, uma perceptível diferença entre os animais avaliados também foi observada. (JAMI e MIZRAHI, 2012). 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 & MIZRAHI, 2012).

O fato de o animal 4 ter apresentado a maior diversidade e menor riqueza, sugere a presença de menos espécies raras, possuindo maior regularidade na abundância das espécies que contém. Seguindo o mesmo raciocínio, a amostra do animal 3, que tem a maior riqueza, apresentou um baixo valor de diversidade, se comparado às demais, o que reitera o fato de que as espécies adicionais que promovem uma maior riqueza no rúmen deste animal, são espécies raras e com pouca abundância e regularidade. Como no algoritmo do índice de diversidade de Shannon é levada 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 baixa diversidade nas amostras com alta riqueza só podem ser explicados por uma maior quantidade de espécies raras na amostra de maior riqueza, sendo a recíproca verdadeira.

## 5.2 Composição da comunidade bacteriana no microbioma do rúmen

Como observado na Figura 9, que apresenta os principais filos bacterianos entre todas as amostras de rRNA 16S e a amostra metagenômica, foi possível perceber a dominância do filo Bacteroidetes, seguido, em geral, pelos filos Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria, além da presença de outros filos com baixa quantidade de sequências.

Alguns estudos foram e estão sendo realizados a respeito da ecologia microbiana no rúmen e composição taxonômica nos mais variados ruminantes. Apesar de algumas diferenças entre os diversos ruminantes e entre os tratamentos aplicados aos animais em cada estudo, em geral, a classificação dos principais grupos microbianos aqui encontrados são compartilhados pela grande parte dos ruminantes que foram estudados até o momento.

A maioria dos estudos utiliza os bovinos (LEE et al., 2012; LI et al., 2012; BRULC et al., 2009; JAMI e MIRAZHI, 2012), por serem os mais populares ruminantes, e talvez de maior importância econômica. Porém, outros ruminantes também são alvos deste tipo de estudo, como os caprinos (LEE et al., 2012), os ovinos aqui estudados, ou até mesmo búfalos (SINGH et al., 2012) e renas (POPE et al., 2012).

Um estudo conduzido na Coreia com duas raças de bovinos (Hanwoo e Holstein Friesian) e uma raça de caprino nativo da Coreia utilizou o pirosequenciamento 454 FLX para analisar a variação taxonômica entre os diferentes animais (LEE et al., 2012). As análises estatísticas mostraram que houve diferença entre a estrutura da comunidade bacteriana, principalmente dos caprinos em relação aos bovinos. Porém, todos os animais apresentaram uma dominância de Bacteroidetes, seguida de Firmicutes, assim como aqui visto.

Entretanto, há uma nítida diferença entre os filos menos abundantes, que estão sempre presentes. No rúmen dos caprinos, houve menor presença de Fibrobacteres e maior presença de Proteobacteria e Actinobacteria em relação aos bovinos. Esta característica também pode ser observada nos ovinos aqui estudados, o que sugere uma maior proximidade entre a composição taxonômica no rúmen de caprinos e ovinos, do que com a do rúmen de bovinos.

Outro trabalho, que acessou o rúmen de renas Svalbard, nativas de Bjørndalen, na Noruega, através de sequenciamento metagenômico de bibliotecas de clones, demonstrou outra vez a dominância na abundância bacteriana exercida pelo filo Bacteroidetes, e secundariamente pelo filo Firmicutes (POPE et al., 2012). Apesar de se tratar de um ruminante bem diferente dos convencionalmente estudados, estes grupos também foram os mais abundantes neste animal. Também foi detectada a presença de Actinobacteria e

Proteobacteria, mesmo que em quantidades significativamente mais baixas (POPE et al., 2012).

Li et al. (2012) acessaram o microbioma ruminal, através do pirosequenciamento 454 FLX, de bezerros Holstein submetidos a uma mesma dieta, em duas épocas amostrais, aos 14 e aos 42 dias de vida. Neste ponto, este trabalho possui uma grande semelhança com o aqui apresentado, pois todos os animais receberam a mesma dieta base. A dieta fornecida aos animais substituiu o leite materno. Assim como aqui visto, os animais quase não tiveram variações na composição taxonômica, mesmo que em idades diferentes. O que mais variou foi a abundância entre os grupos, mas sempre foi observada a sequência decrescente de maior abundância dos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria (LI et al., 2012).

O trabalho de metagenômica de Brulc et al. (2009) também utilizou apenas uma dieta, e avaliou-se o comportamento da composição bacteriana em 3 animais, através de duas técnicas diferentes. A primeira abordagem foi similar à utilizada aqui, i.e. sequenciamento do DNA total (shotgun), embora tenha utilizado a técnica de pirosequenciamento. A segunda foi a metagenômica através da clonagem e sequenciamento das bibliotecas. Através das duas técnicas, resultados muito semelhantes foram encontrados. Porém, desta vez, o filo mais abundante não foi Bacteroidetes, mas sim Firmicutes, a ordem se inverteu. Proteobacteria foi o terceiro filo mais abundante em todos os animais, com exceção de um deles, que se comportou como *outlier*, resultando numa dominância de Proteobacteria fora do comum.

Fazendo uma comparação com um último estudo acerca deste tema (JAMI & MIRAZHI, 2012), onde o microbioma de bovinos da raça Holstein Friesian israelita foi amostrado e sequenciado, pode-se perceber uma semelhança ainda maior com os resultados aqui encontrados. Neste estudo, executado através do pirosequenciamento 454, os animais foram submetidos à mesma dieta e mostraram os quatro principais filos mais abundantes exatamente na mesma ordem que os ovinos utilizados neste trabalho. Porém, o mais interessante a ser ressaltado deste trabalho, é que os animais apresentaram um “core” microbiano em seus rúmens, com os principais grupos variando em abundância, mas estando sempre presentes.

Da mesma forma, aqui pode ser observado um *core* microbiano, sempre compartilhado pelos animais, onde os grupos variam apenas as suas abundâncias (Figura 10). No *core* microbiano dos ovinos estudados, podemos destacar a presença sistemática dos gêneros *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Bacteroides*, *Ruminobacter*, *Corynebacterium*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus* e outros.

O gênero mais abundante em todos os animais, nas duas abordagens, e em vários outros estudos, é quase sempre *Prevotella*, talvez devendo este ser considerado o gênero mais associado à microbiologia ruminal. Existem vários trabalhos que encontraram o gênero *Prevotella* como o mais abundante do microbioma do rúmen em diferentes ruminantes (CALLAWAY et al., 2010; LI et al., 2012; PITTA et al., 2010; LEE et al., 2012; STEVENSEN e WEIMER, 2007).

Outros menos abundantes, mas de suma importância pelo fato de terem sido identificados no *core* do microbioma dos ovinos, são os gêneros *Ruminococcus* (SUEN et al., 2011) e *Fibrobacter* (JONES et al., 2012), pois são os mais conhecidos quando se trata de bactérias celulolíticas do rúmen. A evidência da participação destes gêneros no *core* microbiano, fortalece a possibilidade de serem encontradas enzimas eficientes na degradação da biomassa recalcitrante neste ambiente.

Como sugerido por Jami & Mirashi (2012), ou até mesmo pelas pesquisas do microbioma humano (TURNBAUGH et al., 2007), a existência de um microbioma *core* é quase incontestável. Os micro-organismos deste *core* são sempre presentes, porque o hospedeiro é dependente de suas atividades. Assim, mesmo com a ocorrência de grande redundância funcional, como no ambiente do rúmen ou do intestino humano, alguns filos, famílias, gêneros e possivelmente espécies, serão sempre observados na comunidade microbiana do hospedeiro. No caso do rúmen, em todos os trabalhos aqui citados, independente de qual ruminante seja, sempre foram observados os filos Bacteroidetes e Firmicutes. Estas observações mostram que o *core* microbiano do rúmen tem, pelo menos, esses dois filos como componentes básicos.

### **5.3 Interpretações ecológicas baseadas nas correlações entre a estrutura taxonômica da comunidade bacteriana (rRNA 16S) e as variáveis químicas**

Baseado nas correlações observadas entre a estrutura da comunidade bacteriana, descrita pelo sequenciamento rRNA 16S, e as variáveis químicas mensuradas, pode-se inferir sobre os nichos que algumas bactérias provavelmente ocupam no ambiente do rúmen. Algumas correlações são claramente explicadas pela bibliografia, enquanto outras têm poucas ou até mesmo nenhuma evidência na literatura que suporte os resultados obtidos na análise de correlação, exibidos na Tabela 3.

Começando pelo nível taxonômico mais alto, isto é, o de filo, foi encontrada a correlação negativa entre a variável pH e o filo Fibrobacteres. Como descrito nos resultados, esta correlação é vista em todos os outros níveis taxonômicos, até o nível mais baixo

analisado, ou seja, o da família Fibrobacteraceae. Fazendo um filtro na plataforma MG-RAST, foi observado que todos os *reads* encontrados nesta família são do gênero *Fibrobacter*. A espécie *Fibrobacter succinogenes* é conhecida por sua alta atividade celulolítica (JONES et al., 2012), sendo de grande importância o entendimento das condições ideais para o seu crescimento, e o pH é uma delas.

Em um estudo *in vitro* que utilizou bactérias da espécie *Fibrobacter succinogenes* para a degradação de milho, foi observado um pH ótimo de 6,0 para a hidrólise do substrato em questão (MUTALIK et al., 2012). No presente estudo, a faixa de variação de pH foi de ~6,4 a ~6,63 (figura 10C), e o substrato utilizado também foi à base de milho. Desta forma, a atividade e o crescimento da *F. succinogenes* para degradar o substrato estariam mais relacionados ao menor valor de pH medido no presente estudo, e, portanto, este grupo microbiano apresentaria correlação negativa com a variável pH.

Outro estudo, utilizando a mesma espécie mencionada, avaliou a influência do pH sobre a taxa de crescimento destas bactérias, dentre outras análises (CHOW & RUSSEL, 1993). Os autores concluíram que um decréscimo de pH de 7,0 para 5,0 resulta na diminuição da taxa de crescimento da *F. succinogenes*. Todavia, verificou-se que da faixa 7,0 até 6,5 há um leve aumento na taxa de crescimento destas bactérias (CHOW & RUSSEL, 1993), concordando com a correlação aqui mostrada. Para as outras correlações detectadas para a variável pH, não foram encontradas evidências que as suportem na literatura.

No nível de ordem, além da já comentada correlação da variável pH com Fibrobacterales, outra correlação foi encontrada. A ordem Vibrionales foi positivamente correlacionada com a variável produção total de gás (GP). A mesma correlação foi vista para a família Vibrionaceae, neste outro nível taxonômico. Um filtro no MG-RAST mostrou que todas as sequências correspondentes a esta ordem (e, portanto, também à respectiva família) foram classificadas dentro do gênero *Vibrio*. Sabe-se que as bactérias deste gênero são anaeróbicas facultativas. Na presença de O<sub>2</sub>, utilizam esta molécula como receptora final de elétrons, e, na ausência dele, realizam fermentação etílica (BAUMANN et al., 1994). Ambas as atividades são responsáveis pela produção de CO<sub>2</sub>, e, portanto, pela maior produção de gás. Eis uma possível explicação para a correlação encontrada entre esses grupos bacterianos e a variável GP. A maior presença destas bactérias, tanto num meio com ausência total, como num meio com baixa concentração de O<sub>2</sub>, pode resultar numa maior produção de CO<sub>2</sub>.

A maior parte das correlações foi vista no nível de família, principalmente porque quanto mais baixo o nível taxonômico, maior a quantidade de subdivisões encontradas, aumentando a probabilidade de se encontrarem correlações. Além das já mencionadas, mais

algumas foram localizadas. A correlação positiva observada entre a família *Corynebacteriaceae* e a variável degradabilidade da matéria orgânica (OMD) pode ser explicada pela atividade celulolítica de algumas bactérias desta família (SAKTHIVEL et al., 2010; BÉGUIN, 1990). Como a celulose é o composto mais abundante da parede celular vegetal (COSGROVE, 2005), uma maior atividade celulolítica promove um incremento na degradabilidade da matéria orgânica total (OMD). Uma grande proporção de *Corynebacterium* foi encontrada no rúmen de bovinos (LENG et al., 2011), o mesmo gênero que o presente estudo encontrou como representante da família citada. Pouca atenção tem sido dada a esse grupo microbiano, mas tais constatações revelam que pode se tratar de um grupo importante na degradação da fibra.

Outra correlação vista, para a variável degradabilidade da matéria orgânica, foi com a família *Mycobacteriaceae*, porém, desta vez, a correlação foi negativa. Esta mesma família ainda mostrou correlação negativa com a variável emissão de metano ( $\text{CH}_4$ ). As mycobactérias são conhecidas por serem patógenas, tanto de humanos (COMAS et al., 2010), quanto de outros mamíferos, inclusive de ruminantes como os ovinos (MCGREGOR et al., 2012; STEVENSON et al., 2009). Uma possível explicação para as duas correlações negativas encontradas, é que uma maior presença de micobactérias infectantes no animal provoca alterações em todo o sistema, reduzindo a atividade microbiana. Isto resulta em uma diminuição da degradação do substrato e, conseqüentemente, da produção de gases, como o  $\text{CH}_4$ .

Algumas espécies do gênero *Streptococcus* que habitam o rúmen possuem atividade amilolítica, ou seja, produzem enzimas que degradam o amido (NARITA et al., 2004; CLARK et al., 1991; FREER et al., 1993; WHITFORD et al., 2001). Isto explica a correlação encontrada entre a variável OMD e a família *Streptococcaceae*, já que a matéria orgânica da dieta dos animais era basicamente composta de grãos de milho, alimento rico em amido, e a maior parte das sequências da família *Streptococcaceae* pertenceu ao gênero *Streptococcus*.

Ainda apresentaram correlações negativas com a variável OMD, as famílias *Acidaminococcaceae* e *Myxococcaceae*. Não foram encontrados trabalhos na literatura que suportem a primeira correlação. Já para a segunda, algumas suposições podem ser levantadas. A OMD pode ter sido negativamente correlacionada com esta família porque as myxobactérias são conhecidas pela predação de outras bactérias (MARTIN, 2002; REICHENBACH, 1999; SINGH, 1947). Como a maioria absoluta dos micro-organismos que habitam o rúmen está relacionada à degradação da matéria orgânica, uma maior presença de myxobactérias pode causar uma diminuição desta atividade. Apesar de sempre ser atribuída a

classificação de aeróbicas para as myxobactérias, algumas delas são anaeróbicas facultativas (SANFORD et al., 2002), fato que permite a sua existência no ambiente do rúmen.

Todas as sequências classificadas na família Streptomyetaceae foram também classificadas no gênero *Streptomyces*. Algumas espécies desse gênero são capazes de produzir ionóforos, principalmente monensinas. Essa substância atua como bacteriocina e inibe as bactérias acetogênicas. Com essa atividade inibitória, a produção de butirato aumenta, enquanto a produção de acetato diminui no rúmen. Indiretamente, as archaeas metanogênicas são afetadas pela diminuição no suprimento de acetato, que é um dos compostos que elas oxidam com a consequente redução do CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> (HOOK et al., 2010; RUSSELL & STROBEL, 1989; BERGEN e BATES, 1984). Assim, a quantidade de CH<sub>4</sub> e produção de gás total diminuem ao se aumentar a quantidade de *Streptomyces*. Desta forma, as correlações encontradas entre a família Streptomyetaceae e as variáveis CH<sub>4</sub> e GP são explicadas.

Embora muita atenção seja dada aos grupos bacterianos mais abundantes, ou de atividades mais conhecidas, este estudo mostrou que grupos de menor abundância também podem estar relacionados a importantes funções no ecossistema do rúmen. A complexidade deste ambiente mostra que ainda há muito a se descobrir e estudar a respeito da ecologia no rúmen, tanto sobre as inter-relações entre as espécies microbianas, quanto sobre as funções que cada grupo microbiano executa.

#### **5.4 Comparação da diversidade microbiana acessada pelo sequenciamento do rRNA 16S e por metagenômica**

As duas abordagens aqui utilizadas apresentaram vantagens e desvantagens, e a dupla observação garantiu um maior suporte para as conclusões obtidas no estudo. Com o objetivo de exploração do trabalho e de buscar um melhor entendimento sobre as características das metodologias utilizadas, discutimos as prováveis explicações sobre as divergências nos resultados que naturalmente as duas técnicas apresentaram, como também pode ser visto em outros estudos.

Primeiramente, observa-se que houve um número maior de sequências anotadas na abordagem de PCR do que na de sequenciamento do DNA na íntegra. Apesar de o sequenciamento metagenômico ter gerado um número maior de sequências, é necessário lembrar que a maior parte das sequências geradas não era relativa ao RNA ribossomal, mas sim a todo o DNA cromossômico. Como o banco de dados utilizado para a classificação taxonômica (RDP) foi o da sub-unidade do RNA ribossômico 16S, muitas sequências foram “perdidas” na anotação. Por outro lado, o sequenciamento rRNA 16S, por meio da

amplificação de PCR, só gera sequências relativas a essa região, o que explica a maior anotação por meio desta metodologia. Apesar de a última abordagem mencionada ter tal vantagem, possui a desvantagem de não poder explorar o lado funcional do metagenoma, enquanto a metagenômica *shotgun* é capaz (PETROSINO et al., 2009).

Embora tenha anotado um menor número de sequências, o sequenciamento metagenômico resultou num número de *reads* não classificados proporcionalmente muito menor do que o rRNA 16S. A explicação para isto talvez resida no fato de um fragmento de menor tamanho ter sido gerado pelo sequenciamento rRNA 16S, de em média 60 pb, relativas à pequena região hipervariável V6 (SOGIN et al., 2006; CHAKRAVORTY et al., 2008). O sequenciamento do DNA total gerou *reads* de em média 99 pb, garantindo mais nucleotídeos a serem comparados com o banco de dados, de forma que mais sequências foram então classificadas (SAITOU & NEI, 1987). Whiteley et al. (2012) utilizou tanto a abordagem de sequenciamento rRNA 16S, tendo como alvo a região V6 (mais curta) e V3 (mais longa), quanto a da metagenômica, ambas com o Ion Torrent, e observou o mesmo que o visto aqui. O sequenciamento da região V6 gerou o maior número de sequências não classificadas, tanto quando comparado com a região V3, quanto com a metagenômica.

Outra diferença registrada entre os resultados das duas metodologias foi o maior número de filós, e, conseqüentemente, de todos os outros táxons seguintes, na abordagem metagenômica. Há uma controvérsia a respeito deste tema. Alguns autores mostram resultados e defendem a ideia de que o sequenciamento de regiões hipervariáveis do gene rRNA 16S dão uma maior cobertura taxonômica, sendo uma estratégia mais eficiente para explorar a biodiversidade microbiana rara (SOGIN et al., 2006; STEVEN et al., 2012; SHAH et al., 2010). Os argumentos se pautam principalmente na geração de sequências exclusivamente para classificação taxonômica por esta metodologia (rRNA 16S), enquanto o sequenciamento inteiro do DNA acaba gerando uma quantidade muito grande de sequências de DNA não ribossomal, e desta forma subestima as espécies raras da amostra.

Por outro lado, alguns autores defendem o oposto. Argumentam que a reação de PCR discrimina os grupos menos abundantes da amostra. Isto decorre do fato de que a PCR funciona como uma progressão geométrica, fazendo com que as espécies em maior abundância no início da reação sejam superestimadas, enquanto as de menor abundância sofram o inverso. Além disso, devido à anelamentos seletivos dos *primers*, os diferentes grupos microbianos são amplificados em diferentes proporções, modificando a real abundância inicial de cada grupo. Para completar o problema dos *primers*, as espécies com sequências menos conservadas acabam sendo negligenciadas, podendo inclusive não ser

detectadas devido a esta limitação, e assim a biodiversidade rara é subestimada por esta metodologia (PETROSINO et al., 2009; LIESACK et al., 1997). A segunda argumentação é a que concorda com o encontrado neste estudo, e talvez seja a que realmente faça mais sentido.

Salvo engano, nenhum estudo encontrado na literatura seguiu exatamente a mesma estratégia adotada aqui, o mais próximo entre eles, foi o de Brulc et al. (2009), que compara o sequenciamento baseado em clonagem do gene rRNA 16S e a metagenômica através de pirosequenciamento 454 do rúmen de bovinos. No referido trabalho, foram encontradas algumas semelhanças com o presente estudo. Apesar de o filo mais abundante ter sido Firmicutes e o segundo Bacteroidetes, o inverso do encontrado aqui, se observa a mesma diferença dentro de cada filo, ao se comparar as duas abordagens.

Nos dois trabalhos podemos constatar que Bacteroidetes teve maior proporção de sequências na metagenômica, enquanto Firmicutes teve maior proporção no sequenciamento do gene rRNA 16S. No entanto, o filo Proteobacteria mostra um resultado contrastante entre os dois estudos. No trabalho de Brulc et al. (2009), há uma maior proporção de sequências deste filo na abordagem metagenômica, enquanto no presente trabalho há uma maior proporção no sequenciamento rRNA 16S.

Dentre os outros filios que apareceram com diferenças significativas entre as abordagens, o que mais chama atenção é Cyanobacteria, filo que foi encontrado apenas através da metagenômica. Ele também foi encontrado em outros estudos de rúmen, mas nenhum outro trabalho discutiu a razão deste filo ter sido detectado neste ambiente (PERUMBAKKAM et al., 2011; JAMI & MIZRAHI, 2012; BRULC et al., 2009). Os únicos dois motivos que podem ser atribuídos à detecção de um filo bacteriano fotossintetizante em um ambiente totalmente sem luz, como o rúmen, são:

1) Possíveis contaminações, que tanto podem ter ocorrido na amostragem, quanto na ingestão dos alimentos pelos animais; ou 2) devido ao reduzido tamanho dos fragmentos utilizados para amplificação de regiões específicas do gene rRNA 16S, que pode ter gerado classificações erradas pelo banco de dados. Este engano pode ter classificado os cloroplastos das células vegetais, provenientes das dietas dos animais, como cianobactérias, já que há uma proximidade muito grande entre o RNA ribossomal destas bactérias com a referida organela, por compartilharem o mesmo ancestral comum do filo Cyanobacteria (FALCÓN et al., 2010).

### **5.5 O rúmen de ovinos como fonte de descoberta de genes relacionados à degradação da fibra vegetal**

Levando em consideração os genes codificadores de enzimas relacionados à degradação de celulose encontrados na busca com os dois bancos de dados utilizados (Tabela 4 e Figura 16), foram encontradas enzimas conhecidas das famílias GH3, GH5, GH9, GH13, GH43, GH48 (Glycoside Hydrolases) e CBM 49 (Carbohydrate Binding Module), além das putativas, preditas ou hipotéticas, cuja classificação ao certo ainda é desconhecida.

Wang et al. (2009), analisando bibliotecas de amostras de rúmen bovino, esterco de elefante, solo de floresta e árvores apodrecidas, encontrou celulases e beta-glicosidases das famílias GH3, GH5 e GH9, todas também encontradas neste estudo.

Já Pope et al. (2012), estudando o rúmen de renas Svalbard, encontraram celulases e beta-glicosidases de outras famílias aqui não vistas, da família GH44 e GH 1, respectivamente. O mesmo grupo, dois anos antes (POPE et al., 2010), acessou o microbioma intestinal do pequeno canguru Wallaby e encontrou diferentes glicosil hidrolases neste animal. Muitas das enzimas aqui vistas também foram encontradas neste herbívoro.

O microbioma do sistema digestivo de cupins, ou térmitas, também foi acessado com a mesma finalidade (WARNECKE et al., 2007). Neste artrópode, foram encontradas todas as enzimas aqui vistas, com exceção das da família GH 48 e CBM49, em soma a várias outras aqui não encontradas. Este se constitui em uma das fontes mais enriquecidas para a degradação de celulose, já que o cupim se alimenta, literalmente, de madeira, graças a bactérias celulolíticas muito eficientes que vivem em seu trato digestivo. Mesmo assim, as citadas enzimas aqui detectadas não foram vistas no microbioma do térmita.

O comentado trabalho de metagenômica de Brulc et al. (2009), que utilizou amostras tanto da fração líquida, quanto da fibrosa do rúmen de bovinos, encontrou diversas enzimas aqui não vistas, além das aqui encontradas. Contudo, também não apresentou nenhuma da família CBM49 e apenas uma da família GH48, em um único animal do estudo. As enzimas destas duas famílias não foram encontradas em nenhum metagenoma dos estudos aqui comparados, com exceção deste único hit no último trabalho citado.

A presença de enzimas celulolíticas de famílias não detectadas no microbioma de outros ruminantes, de outros animais e até mesmo de outros ambientes, além da presença de enzimas celulolíticas desconhecidas, mostra que o microbioma do rúmen de ovinos é uma fonte promissora para a descoberta de novas enzimas eficientes na degradação de fibra. Logicamente, estudos de metagenômica mais profundos são necessários para uma maior

cobertura e detecção das enzimas componentes deste metagenoma, além de futuros testes de expressão heteróloga. Porém, este estudo mostrou que há uma alta quantidade de enzimas celulolíticas neste ambiente, e que há várias enzimas desconhecidas que podem ser de grande importância biotecnológica.



## 6 CONCLUSÕES

Apesar de haver uma variação na abundância entre os grupos componentes do microbioma, existe um *core* microbiano compartilhado por todos os animais estudados. Este *core* microbiano do rúmen de ovinos é composto basicamente pelos filos Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Fibrobacteres. Em geral, as maiores abundâncias são encontradas nos filos citados, respectivamente, em ordem decrescente. Estendendo as conclusões para o observado em outros trabalhos que investigaram o microbioma do rúmen, é possível perceber que há um *core* microbiano compartilhado entre os diversos tipos de ruminantes, também dominado pelos filos Bacteroidetes e Firmicutes.

As diversas correlações entre as variáveis químicas e taxonômicas detectadas neste trabalho ajudaram a compreender a ecologia do sistema estudado, mostrando que mais atenção deve ser dada àqueles grupos microbianos menos visados, pois grande parte das importantes funções realizadas no rúmen pode estar relacionada às suas atividades.

As metodologias de sequenciamento rRNA 16S e metagenômica mostraram o mesmo padrão nos resultados sobre a composição bacteriana no microbioma do rúmen, embora tenha existido divergências na estrutura da comunidade apresentada pelas duas abordagens. O sequenciamento dos fragmentos rRNA 16S utilizando uma única corrida, i.e. um único chip, para identificar as diferentes amostras através dos *tags*, resultou em uma maior quantidade de sequências anotadas. A metagenômica permitiu a exploração da parte funcional e rendeu um maior percentual de sequências classificadas, além de detectar a biodiversidade microbiana mais rara. A observação dos resultados que as duas técnicas oferecem em comum fortalece as conclusões a respeito do que está sendo estudado.

O metagenoma do rúmen de ovinos possui diversas enzimas relacionadas à degradação de fibra, tendo sido encontradas tanto enzimas conhecidas, como desconhecidas. Esta constatação comprova a potencialidade deste sistema para a descoberta de enzimas lignocelulolíticas com possíveis aplicações biotecnológicas. Contudo, estudos mais profundos de metagenômica são necessários para acessar os genes microbianos relacionados à desconstrução da biomassa recalcitrante, seguido de estudos com testes de expressão funcional.



## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, R.M. The energetics of coprophagy: a theoretical analysis. **Journal of Zoology**, London, v.20, n.4, p.629-637, 2009.
- AMINOV, R.I. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.2, n.158, p.1-19, 2011.
- ATTWOOD, G.; MCSWEENEY, C. Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H<sub>2</sub> utilisation in the rumen. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.48, p.28-37, 2008.
- BAUMANN, P.; BRENNER, D.J.; FARMER, J.J.; FREDERIKSEN, W.; SHEWAN, J.M. facultatively anaerobic gram-negative rods. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, USA: Williams and Wilkins, 1984, v.1, p.409-598.
- BAYER, E.A.; BELAICH, J.P.; SHOHAM, Y.; LAMED, R. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v.58, p.521-554, 2004.
- BEGUÍN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annuals Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v.44, p.219-248, 1990.
- BERGEN, W.G.; BATES, D.B. Ionophores: their effects on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.58, p. 1465-1483, 1984.
- BLANKENBERG, D.; GORDON, A.; VON KUSTER, G.; CORAOR, N.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A.; GALAXY TEAM. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics**, Oxford, v.26, n.14, p.1783- 1785, 2010.
- BONHOMME, A. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.30, p.203-266, 1990.
- BUDDLE, B.M.; DENIS, M.; ATTWOOD, G.T.; ALTERMANN, E.; JANSSEN, P.H.; RONIMUS, R.S.; -PATIÑO, C.S.P.; MUETZEL, S.; WEDLOCK, D.N. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **The Veterinary Journal**, London, v.188, p.11-17, 2011.
- BUENO, I.C.S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D.M.S.S.; ABDALLA, A.L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.123/124, p.95-105, 2005.
- BROOKS, M.A.; HARVEY, R.M.; JOHNSON, N.F.; KERLEY, M.S. Rumen degradable protein supply affects microbial efficiency in continuous culture and growth in steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, published online, July 24, 2012.

- BRULC, J.M.; ANTONOPOULOS, D.A.; MILLER, M.E.B.; WILSON, M.K.; YANNARELL, A.C.; DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.E.; FRANK, E.D.; EMERSON, J.B.; WACKLIN, P.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; NELSON, K.E.; WHITE, B.A. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedures of National Academy of Sciences**, Washington, v.106, n.6, p. 1948-1953, 2009.
- BRULC, J.M.; YEOMAN, C.J.; WILSON, M.K.; MILLER, M.E.B.; JERALDO, P.; JINDOU, S.; GOLDENFELD, N.; FLINT, H.J.; LAMED, R.; BOROVOK, I.; VODOVNIK, M.; NELSON, K.E.; BAYER, E.A.; WHITE, B.A. Cellulosomics, a gene-centric approach to investigating the intraspecific diversity and adaptation of *Ruminococcus flavefaciens* within the rumen. **PLoS ONE**, San Francisco, v.6, n.10, e25329, 2011.
- CALLAWAY, T.R.; DOWD, S.E.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; KRUEGER, N.; BAUER, N.; KONONOFF, P.J.; NISBET, D.J. Evaluation of bacterial diversity in rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.88, p.3977-3983, 2010.
- CHAGAN, I.; TOKURA, M.; JOUANY, J.P.; USHIDA, K. Detection of methanogenic archaea associated with rumen ciliate protozoa. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.45, p.305-308, 1999.
- CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNEL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.69, n.2, p.330-339, 2007.
- CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial Microbes**, Wageningen, v.1, n.1, p.3-9, 2010.
- CHERDTHONG, A.; WANAPAT, M.; Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production: a review. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Amman, v.4, n.8, p.2232-2241, 2010.
- CHOW, J.M.; RUSSEL, J.B. Effect of pH and monensin on glucose transport by *Fibrobacter succinogenes*, a cellulolytic ruminal bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.4, p.1115-1120, 1993.
- CLARK, R.G.; HU, Y.-J.; HYNES, M.F.; SALMON, R.K.; CHENG, K.-J. Cloning and expression of an amylase gene from *Streptococcus bovis* in *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.157, p.201-204, 1992.
- COMAS, I.; CHAKRAVARTTI, J.; SMALL, P.M.; GALAGAN, J.; NIEMANN, S.; KREMER, K.; ERNST, J.D.; GAGNEUX, S. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionary hyperconserved. **Nature Genetics**, New York, v.42, n.6, p.498-504, 2010.

COOKSON, S.L.; NOEL, S.J.; KELLY, W.J.; ATTWOOD, G.T. The use of PCR for the identification and characterisation of bacteriocin genes from bacterial strains isolated from the rumen of caecal contents of cattle and sheep. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.48, p.199-207. doi: 10.1016/j.femsec.2004.01.003, 2004.

COSGROVE, D.J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**, London v.6, p.850-861, 2005.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M.L.; RELMAN, D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **PLoS Biology**, Cambridge, v.6, n.11, e280, 2008.

DEWHURST, R.J.; DAVIES, D.R.; MERRY, R.J. Microbial protein supply from the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.85, p.1-21, 2000.

DODD, D.; MOON, Y.H.; SWAMINATHAN, K.; MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O. Transcriptomic analysis of xylan degradation by *Prevotella bryantii* and insights into energy acquisition by xylanolytic Bacteroidetes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.285, n.39, p.30261-30273, 2010.

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.; FENG, J.-X. Mining metagenomes for novel cellulase genes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.32, p.1765-1775, 2010.

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.

FALCÓN, L.I.; MAGALLÓN, S.; CASTILLO, A. Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. **The ISME journal**, Wageningen, v.4, p.777-783, 2010.

FINDLEY, S.D.; MORMILE, M.R.; SOMMER-HURLEY, A.; ZHANG, X-C.; TIPTON, P.; ARNETT, K.; PORTER, J.H.; KERLEY, M.; STACEY, G. Activity-based metagenomic screening and biochemical characterization of bovine ruminal protozoan glycoside hydrolases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.77, n.2, p.8106-8113, 2011.

FLYNT, H.J.; BAYER, E.A. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. **Annals of New York Academy of Sciences**, New York, v.1125, p.280-288, 2008.

FOOSE, T, 1974. 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, v.30, n.4, p.757-774, 1976.

FREER, S.N. Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from *Streptococcus bovis* JB1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.5, p.1398-1402, 1993.

GARCIA-VALLVÉ, S.; ROMEU, A.; PALAU, J. Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.17, n.3, p.352-361, 2000.

GOECKS, J.; NEKRUTENKO, A.; TAYLOR, J.; GALAXY TEAM. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. **Genome Biology**, London, v.11, R86, p.1-13, 2010.

GRIFFITH, G.W.; BAKER, S.; FLIEGEROVA, K.; LIGGENSTOFFER, A.; GIEZEN, M.V.D.; VOIGT, K.; BEAKES, G. Anaerobic fungi: *Neocallimastigomycota*. **IMA Fungus**, Surrey, v.1, n.2, p.181-185, 2010.

GONG, X.; GRUNINGER, R.J.; QI, M.; PATERSON, L.; FORSTER, R.J.; TEATHER, R.M.; McALLISTER, T.A. Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene. **BMC Research Notes**, London, v.5, n.566, p.1-11, 2012.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, California, v.4, p. 1-9, 2001.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.68, n.4, p.669-685, 2004.

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

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T.-W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D.S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R.I.; PENNACHIO, L.A.; TRINGE, S.G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E.M. Metagenomic discovery of biomass degrading genes and genomes on cow rumen. **Science**, Washington, v.331, p.463-467, 2011.

HOOK, S.E.; WRIGHT, A.D.G.; MCBRIDE, B.W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, New York, ID 945785, doi:10.1155/2010/945785, 2010.

HOOPER, L.V.; GORDON, J.I. Commensal host bacterial relationships in the gut. **Science**, Washington, v.292, p.1115-1118, 2011.

HUNGATE, R.E. **The Rumen and Its Microbes**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic press, 1966. 533p.

- HUSE, S.M.; DETHLEFSEN, L.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; RELMAN, D.A.; SOGIN, M.L. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **PLoS Genetics**, San Francisco, v.4, n.11, e1000255, 2008.
- 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**, St. Louis, v.30, p.757-774, 1976.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, p.2483-2492, 1995.
- JONES, E.R.; JONES, D.L.; McCARTHY, A.J.; McDONALD, J.E. The *Fibrobacteres*: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. **Microbial Ecology**, New York, v.63, p.267-281, 2012.
- JÜNEMANN, S.; PRIOR, K.; SZCEPANOWSKI, R.; HARKS, I.; EHMKE, B.; GOESMANN, A.; STOYE, J.; HARMSSEN, D. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by Ion Torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.8, p.e41606, 2012.
- KALMOKOFF, M.L.; BARTLETT, F.; TEATHER, R.M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, p.2297-2306, 1996.
- KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, Bangalore, v.89, p.124-136, 2005.
- KARASOV, W.H.; CAREY, H.V. Metabolic teamwork between gut microbes and hosts. **Microbe**, St. Paul, v.4, n.7, p.323-328, 2009.
- KASPEROWICZ, A.; GLASEK, K.S.; GUCZINSKAW.; PRISTAS, P.; JAVORSKY, P.; VANDZUROVA, A.; MICHALOWSKY, T.  $\beta$ -Fructofuranosidase and sucrose phosphorylase of rumen bacterium *Pseudobutyrvibrio ruminis* strain 3. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.28, p.1271-1279, 2012.
- KIM, E.J.; HUWS, S.A.; LEE, M.R.F.; SCOLLAN, N.D. Dietary Transformation of Lipid in the Rumen Microbial Ecosystem. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v.22, n.9, p.1341-1350, 2009.
- KLIEVE, A.V.; BAUCHOP, T. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.6, p.1637-1641, 1988.
- KLIEVE, A.V.; SWAIN, R.A. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, n.7, p.2299-2303, 1993.

KLIEVE, A.V.; SWAIN, R.A.; NOLAN, J.V. Bacteriophages in the rumen; types present, population size and implications for the efficiency of feed utilisation. **Proceedures of National Academy of Sciences**, Washington, v.21, p.92-94, 1996.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v.22, n.1, p.131-138, 2009.

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

LEE, S.S.; HSU, J.T.; MANTOVANI, H.C.; RUSSEL, J.B. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production *in vitro*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.217, p.51-55, 2002.

LEMOIS, 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.

LENG, J.; XIE, L.; ZHU, R.; YANG, S.; GOU, X.; LI, S.; MAO, H. Dominant bacterial communities in the rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Yaks (*Bos grunniens*) and Yunnan yellow cattle (*Bos taurus*) revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.38, p.4863-4872, 2011.

LEY, R.E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P.J.; RAMEY, R.R.; BIRCHER, S.; SCHLEGEL, M.L.; TUCKER, T.A.; SCHRENZEL, M.D.; KKIGHT, R.; GORDON, J.I. Evolutions of mammals and their gut microbes. **Science**, Washington, v.320, p. 1647-1651, 2008.

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

LIESACK, W.; JANSSEN, P.H.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L.; STACKEBRANDT, E. Microbial Diversity in Soil: The Need for a Combined Approach Using Molecular and Cultivation Techniques. In: ELSAS, J.D. VAN TREVORS, J.T., WELLINGTON, E.M.H. **Modern Soil Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997, p.375-427.

LIGGENSTOFFER, A.S.; YOUSSEF, N.H.; COUGER, M.B.; ELSHAHED, M.S. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum *Neocallimastigomycota*) in ruminant and non-ruminant herbivores. **The ISME Journal**, Wageningen, v.4, p. 1225-1235, 2010.

LONGO, C.; BUENO, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; GODDOY, P.B.; CABRAL FILHO, S.L.S.; ABDALLA, A.L. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v.1293, p. 62-65, 2006.

MAKKAR, H.P.S. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: ASSESSING QUALITY AND SAFETY OF ANIMAL FEEDS. FAO, Rome:FAO, 2004, p.55-88 (**Animal Production and Health Series, 160**).

MARDEN, J.P.; BAYOURTHE, C.; ENJALBERT, F.; MONCOULON, R. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 277-281, 2005.

MARTIN, M.O. Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Basel, v.4, n.5, p.467-477, 2002.

MCGREGOR, H.; DHAND, N.K.; DHUNGYEL, O.P.; WHITTINGTON, R.J. Transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.107, p.76-84, 2012.

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

MILLER, M.E.B.; YEOMAN, C.J.; CHIA, N.; TRINGE, S.G.; ANGLY, F.E.; EDWARDS, R.A.; FLINT, H.J.; LAMED, R.; BAYER, E.A. WHITE, B.A. Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.14, n.1, p.207-227, 2012.

MORAN, N.A. Symbiosis. **Current Biology**, London, v.16, n.20, p.R866-R871, 2006.

MORGAVI, D.P.; MARTIN, C.; JOUANY, J.P.; RANILLA, M.J. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.107, p.388-397, 2012.

MUTALIK, S.; VINODKUMAR, C.S.; SWAMY, S.; MANJAPPA, S. Degradation of lignocellulosic feedstock by *Fibrobacter succinogenes* in the production of anhydrous alcohol. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, Bhopal, v.6, n.3, p.1381-1386, 2012.

NARITA, J.; NAKAHARA, S.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.97, n.6, p.423-425, 2004.

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

OHENE-ADJEI, S.; TEATHER, R.M.; IVAN, M; FORSTER, R.J. Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, n.14, p.4609-4618, 2007.

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

- PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bionformatics**, Oxford, v.26, n.6, p.715-721, 2010.
- 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.
- PETROSINO, J.F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R.A.; GIBBS, R.A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and metagenomic identification. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.55, n.5, p. 856-866, 2009.
- PITTA, D.W.; PINCHAK, W.E.; DOWD, S.E.; OSTERSTOCK, J.; GONTCHAROVA, V.; YOUN, E.; DORTON, K.; YOON, I.; MIN, B.R.; FULFORD, J.D.; WICKERSHAM, T.A.; MALINOWSKI, D.P. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. **Microbial Ecology**, New York, v.59, p.511-522, 2010.
- POPE, P.B.; DENMAN, S.E.; JONES, M.; TRINGE, S.G.; BARRY, K.; MALFATTI, S.A.; MCHARDY, A.C.; CHENG, J.-F.; HUGENHOLTZ, P.; MCSWEENEY, C.S.; MORRISON, M. Adaptation to herbivory by the tammar wallaby includes bacterial and glycoside hydrolase profiles different from other herbivores. **Proceedures of National Academy of Science**, Washington, v.107, p.14793-14798, 2010.
- POPE, P.B.; MACKENZIE, A.K.; GREGOR, I.; SMITH, W.; SUNDSET, M.A.; MCHARDY, A.C.; MORRISON, M.; EIJSINK, V.G.H. Metagenomics of the Svalbard Reindeer rumen microbiome reveals abundance of polysaccharide utilization Loci. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.6, e38571., 2012.
- RAMETTE, A. Multivariate analysis in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.62, p.142-160, 2007.
- RAPPÉ, M.S.; GIOVANNI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v.57, p.369-394, 2003.
- REICHENBACH, H. The ecology of the myxobacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.1, n.1, p.15-21, 1999.
- RICARD, G.; MCEWAN, N.R.; DUTILH, B.E.; JOUANY, J.-P.; MACHEBOEUF, D.; MITSUMORI, M.; MCINTOSH, F.M.; MICHALOWSKI, T.; NAGAMINE, T.; NELSON, N.; NEWBOLD, C.J.; NSABIMANA, E.; TAKENAKA, A.; THOMAS, N.A.; USHIDA, K.; HACKSTEIN, J.H.P.; HUYNEN, M.A. Horizontal gene transfer from bacteria to rumen ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. **BMC Genomics**, London, v.7, n.22, p.1-13, 2006.
- ROSENBERG, E.; SHARON, G.; ATAD, I.; ZILBER-ROSENBEGR, I. The evolution of animal and plants via symbiosis with microorganisms. **Environmental Microbiological Reports**, Oxford, v.2, n.4, p. 500-506, 2010.
- RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, London, v.454, p.841-845, 2008.

RUCKESBUCH, Y. Gastrointestinal motor functions in ruminants. **Comprehensive Physiology**, Washington, v.1, p.1225–1282, 2011.

RUSSEL, J.B.; STRUBEL, H.J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.5, n.1, p.1-6, 1989.

RUSSEL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, Washington, v.292, p.1119-1122, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing 715 phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, p.406-425, 1987.

SAKTHIVEL, M.; KARTHIKEYAN, N.; JAYAVENY, R.; PALANI, P. Optimization of culture conditions for the production of extracellular cellulose from *Corynebacterium lipophiloflavum*. **Journal of Ecobiotechnology**, Humnabad, v.2, n.9, p.2-9, 2010.

SANFORD, R.A.; COLE, J.R.; TIEDJE, J.M. Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an Aryl-Halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.2, p.893-900, 2002.

SAR, C.; MWENYA, B.; SANTOSO, B.; TAKAURA, K.; MORIKAWA, R.; ISOGAI, N.; ASAKURA, Y.; TORIDE, Y.; TAKAHASHI, J. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on in vitro ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.83, p.644-652, 2005.

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

SELVENDRAN, R. The plant cell wall as a source of dietary fiber: chemistry and structure. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v.39, p.320-337, 1984.

SHAH, N.; TANG, H.; DOAK, T.G.; YE, Y. Comparing bacterial communities inferred from 16S rRNA gene sequencing and shotgun metagenomics. **Pacific Symposium in Biocomputing**, Stanford, p.165-176, 2011.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v.26, n.10, p. 1135-1145, 2008.

SHIN, E.C.; CHOI, B.R.; LIM, W.J.; HONG, S.Y.; AN, C.L.; CHO, K.M.; KIM, Y.K.; AN, J.M.; KANG, J.M.; LEE, S.S.; KIM, H.; YUN, H.D. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on 16S rDNA sequence. **Anaerobe**, Ames, v.10, p.313-319, 2004.

SINGH, B.N. Myxobacteria in soils and composts ; their distribution, number and lytic action on bacteria. **Journal of General Microbiology**, London, v.1, n.1, p.1-10, 1947.

- SINGH, K.M.; TRIPATHI, A.K.; PANDYA, P.R.; PARNEKAR, S.; RANK, D.N.; KOTHARI, R.K.; JOSHI, C.G. Methanogen diversity in the rumen of indian surti buffalo (*Bubbalus bubalis*), assessed by 16S rDNA analysis. **Research in Veterinary Science**, London, v.92, p.451-455, 2011.
- 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 (*Bubbalus bubalis*) rumen: a preliminary study. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v.39, p.4841-4848, 2012.
- 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**, Berlin, v.95, p.1135-1154, 2012.
- 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.
- STEENBAKKERS, P.J.M.; LI, X.L.; XIMENES, E.A.; ARTS, J.G.; CHEN, H.; LJUNGDAHL, L.G.; den CAMP, H.J.M.O. Nuncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, n.18, p.5325-5333, 2001.
- STEVEN, B.; GALLEGOS-GRAVES, L.V.; STARKENBURG, S.R.; CHAIN, P.S.; KUSKE, C.R. Targeted and shotgun metagenomic approaches provide different descriptions of dryland soil microbial communities in a manipulated field study. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v.4, n.2, p.248-256, 2012.
- 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 Biotechnology**, Berlin, v.83, n.5, p.987-988, 2009.
- STEWART, C.S.; FLINT, H.J.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic and Professional Publishers, 1997, p. 10-72.
- SUEN, G.; WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; AYLWARD, F.O.; BOYUM, J.; DENEKE, J.; DRINKWATER, C.; IVANOVA, N.N.; MIKHAILOVA, N.; CHERTKOV, O.; GOODWIN, L.A.; CURRIE, C.R.; MEAD, D.; BRUMM, P.J. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. **PLoS ONE**, San Francisco, v.6, n.4, e18814, 2011.
- SUEN, G.; STEVENSON, D.M.; BRUCE, D.C.; CHERTKOV, O.; COPELAND, A.; CHENG, J.F.; DETTER, C.; DETTER, J.C.; GOODWIN, L.A.; HAN, C.S.; HAUSER, L.J.; IVANOVA, N.N.; KYRPIDES, N.C.; LAND, M.L.; LAPIDUS, A.; LUCAS, S.; OVCHINNIKOVA, G.; PITLUCK, S.; TAPIA, R.; WOYKE, T.; BOYUM, J.; MEAD, D.; WEIMER, P.J. Complete genome of cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.193, n.19, p.5574-5575, 2011.

- STEWART, C.S.; FLINT, H.J. *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes*, a cellulolytic anaerobic bacterium of the gastrointestinal tract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.30, p.433-439, 1989.
- 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.
- THINGSTAD, T.F.; LIGNELL, R. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf/Luhe, v.13, p.19-27, 1997.
- TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). **Microcomputer Power**, Ithaca, NY, 2002, 500p.
- TIWARI, K; GUPTA, R.K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 32, n.2, p.108-132, 2012.
- TROYER, K. Microbes, herbivory and the evolution of social behavior. **Journal of Theoretical Biology**, London, v.106, p.157-169, 1984.
- TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGET, C.M.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. The human microbiome project. **Nature**, London, v.449, doi:10.1038, 2007.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarchpolysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p.3583-3597, 1991.
- WARNECKE, Z.; LUGINBUHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T.H.; STEGE, J.T.; CAYOUCETTE, M.; McHARDY, A.C.; DJORDJEVIC, C.; ABOUSHADI, N.; SOREK, R.; TRINGE, S.G.; PODAR, M.; MARTIN, H.G.; KUNIN, V.; DALEVI, D.; MADEJSKA, J.; KIRTON, E.; PLATT, D.; SZETO, E.; SALAMOV, A., BARRY, K., MIKHAILOVA, N., KYRPIDES, N.C., MATSON, E.G., OTTESEN, E.A.; ZHANG, X.; HERNÁNDEZ, M.; MURILLO, C.; ACOSTA, L.G.; RIGOUTSOS, I.; TAMAYO, G.; GREEN, B.D.; CHANG, C.; RUBIN, E.M.; MAHUR, E.J.; ROBERTSON, D.E.; HUGENHOLTZ, P.; LEADBETTER, J.R. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, London, v.22, p.560-569, 2007.
- WANG, F.; LI, F.; CHEN, G.; LIU, W. Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. **Microbiological Research**, Jena, v.164, p.650-657, 2009.
- WHITELEY, 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.; MCPHERSON, M.A.; FORSTER, R.J.; TEATHER, R.M. Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus spp.* and isolation and

characterization of bovicin 255. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.2, p.569-574, 2001.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. **The rumen protozoa**. New York: Springer-Verlag, 1992. 441p.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. **Proceedures of National Academy of Science**, Washington, v.88, p.4576-4579, 1990.

WOZNY, M.A.; BRYANT, M.P.; HOLDEMAN, L.V.; MOORE, W.E. Urease assay and urease-producing species of anaerobes in the bovine rumen and human faeces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.33, n.5, p.1097-1104, 1977.

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.

ZHAO, L. The tale of our other genome. **Nature**, London, v.465, p.879-880, 2010.