

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO *in vitro* DE METANO E ANÁLISE DA  
DIVERSIDADE GENÉTICA DAS Archaea  
METANOGENÉTICAS DO RÚMEN DE BOVINOS**

**Marta de Campos Neves**  
Zootecnista

Jaboticabal - São Paulo - Brasil  
Agosto de 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PRODUÇÃO *in vitro* DE METANO E ANÁLISE DA  
DIVERSIDADE GENÉTICA DAS Archaea  
METANOGENÉTICAS DO RÚMEN DE BOVINOS**

**Marta de Campos Neves**

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Microbiologia - Área de concentração em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL, SP - BRASIL  
Agosto de 2008

Neves, Marta de Campos

N514p      Produção *in vitro* de metano e análise da diversidade genética das  
Archaea metanogênicas do rúmen de bovinos/Marta de Campos  
Neves. -- Jaboticabal, 2008  
xii, 115 f.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Maria Isabel da Silva, Raul Franzolin Neto,  
Janete Aparecida Desidério Sena, Mauro Dal Secco de Oliveira  
Bibliografia

1.Ruminantes. 2.Arqueias, 3. Sequenciamento. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:636.2

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

### **MARTA DE CAMPOS NEVES -**

nascida em 14 de julho de 1974, na cidade de Casa Branca - SP, é Zootecnista, formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-SP (FCAV), em julho de 2001, sendo bolsista na categoria Iniciação Científica (FAPESP) no período de 2000 a 2001. De agosto de 2001 a maio de 2004 e de agosto de 2004 a julho de 2008 fez os Cursos de Pós-Graduação, mestrado e doutorado, respectivamente, em Microbiologia Agropecuária na FCAV. No mestrado foi bolsista da CAPES e no doutorado, da FAPESP.

**"Aqui vive um povo que merece mais respeito  
Sabe, belo é o povo como é belo todo amor  
Aqui vive um povo que é mar e que é rio  
E seu destino é um dia se juntar  
O canto mais belo será sempre mais sincero  
Sabe, tudo quanto é belo será sempre de espantar  
Aqui vive um povo que cultiva a qualidade  
Ser mais sábio que quem o quer governar."**

(Notícias do Brasil, Milton Nascimento/Fernando Brant)

**Dedicatória especial aos amigos:**

**Adriana M., Rose Duda, Gracie F. (Engenharia Rural),  
Kishi, Simone, Gisele, Dani (Tecnologia),  
Josemir, Vanessa, Léo, Viviane, Júnior, Hélio, Andressa, André (Zootecnia),  
Carol, Analu, Band, Sarah, Sam, Dani, Splinter (Zoo97),  
Juliana C., Juliana R., Juliana X., Janaína, Lucília, Viviane (Vi),  
Irlan, Paula, Camila D., Paulo Fenerich,  
Larissa, Suzana, Paulo Sarmanho, Josélia, Byron,  
Vivian, Eliane, Ana Maria, Najara, Michele, Elaine, Natália L.  
Emeline, Fernanda S., Lúcia, Daniel, Rebeca  
D. Edith, Vânia C., Aldo, D.Lucinda**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, porque ele é bom e sua benignidade é para sempre;

Aos meus pais, Gessy e Márcia e aos meus irmãos Ângela, Cristina, Raquel, Cláudia e Marcos por todo carinho, amor e compreensão;

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela orientação e por todos os anos de boa convivência, apoio, confiança e aquisição de conhecimentos e experiência na área científica;

À Prof. Dra. Jane Maria Bertocco Ezequiel, pela co-orientação, participação na banca de exame geral de qualificação, presidindo de forma sábia e objetiva aquela sessão e pelos ensinamentos e sugestões fundamentais ao sucesso deste trabalho;

Aos Professores Doutores Raul Franzolin Neto, Janete Ap. Desidério Sena, Mauro Dal Secco de Oliveira e Maria Isabel da Silva pela participação como membros titulares da banca examinadora do exame da Tese e pelas sugestões e críticas construtivas a este trabalho;

Aos Professores Doutores Roberto Alves de Oliveira, Hélio José Montassier, Lúcia Carareto Alves e Maria Inês Tiraboshi Ferro pela participação no exame geral de qualificação e pelas ideias e sugestões importantes para elaboração do artigo científico;

Aos Professores Doutores Antônio Sérgio Ferraud e Gener Tadeu Pereira pelas contribuições fundamentais nas análises estatísticas deste trabalho;

Aos amigos Josemir S. Gonçalves, Vanessa F. Ruiz, Hélio (Xerok) e André (Mamaki) pela enorme cooperação nos experimentos práticos de produção de metano, na manipulação dos animais e conteúdo ruminal e também pelos momentos divertidos compartilhados;

À Rose Duda, pelo precioso apoio nos cálculos da mensuração dos gases e pela amizade sincera;

À Juliana R. Vieira da Costa pelo excelente auxílio nas prestações de contas à FAPESP e por todo apoio e amizade durante todo o experimento;

Ao Dr. Luciano T. Kishi pela valiosa ajuda prestada nas análises de bioinformática;

Aos Doutores Gabriel e Liandra (Depto de Tecnologia) pelas dicas essenciais à determinação dos ácidos graxos;

À Eliane C. Cunha Alves, pelo auxílio nas construções das bibliotecas genômicas,

além da amizade durante tantos anos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos e ao assessor científico deste trabalho pelas importantes sugestões;

À Dra. Rose Galati pelas ideias e dicas na parte inicial deste trabalho;

Aos funcionários Aldo, D. Lucinda e Sr. Dejair pela ajuda e amizade;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Jaboticabal) e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária pela oportunidade de aprimorar conhecimentos;

Aos queridos animais que se submeteram à nossa vontade e muito contribuíram para este trabalho e para a Ciência.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Caracterização do ambiente ruminal.....	4
2.2. Metanogênese.....	6
2.3. Microrganismos metanogênicos.....	9
2.4. Mensuração de metano.....	13
2.5. Forragens e fibras na alimentação.....	16
2.6. Ácidos graxos de cadeia curta.....	19
2.7. Avaliação das comunidades microbianas no ambiente.....	20
2.7.1. Biotecnologia e bioinformática.....	23
2.7.2. Filogenia dos microrganismos.....	25
2.8. Análise multivariada.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Locais de condução do experimento.....	28
3.2. Manejo alimentar e colheita das amostras.....	28
3.3. Análises Laboratoriais relacionadas à nutrição animal.....	29
3.3.1. Mensuração dos gases.....	29
3.3.2. Incubação ruminal <i>in situ</i> .....	35

3.3.3. Determinação dos AGCC.....	36
3.3.4. Identificação da fase sólida.....	37
3.4. Extração do DNA genômico.....	39
3.4.1. Purificação do DNA.....	40
3.5. Reação em cadeia da polimerase.....	40
3.6. Purificação do DNA amplificado.....	42
3.7. Clonagem e Reação de ligação.....	42
3.7.1. Transformação das células competentes.....	43
3.7.2. Seleção e estoque dos clones.....	44
3.8. Sequenciamento.....	44
3.8.1. Extração do DNA plasmidial.....	44
3.8.2. Sequenciamento de amplicons.....	46
3.8.3. Precipitação e lavagem das reações de sequenciamento.....	46
3.8.4. Preparo da amostra e análise filogenética.....	47
3.9. Análises estatísticas.....	49
3.9.1. Análise estatística multivariada.....	49
3.9.2. Análise estatística univariada.....	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. Análises estatísticas.....	51
4.2. DNA genômico.....	70
4.3. Detecção das ORFs.....	72
4.4. Filogenia das arqueias pela região 16S rDNA.....	76
5. CONCLUSÕES.....	94
6. REFERÊNCIAS.....	95

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACE	.....	ácido acético
AGCC	.....	ácidos graxos de cadeia curta
ATP	.....	adenosinatrifosfato
BLA	.....	bactérias líquido-associadas
BLAST	.....	ferramenta de busca e alinhamento básico
BSA	.....	bactérias sólido-aderidas
BUT	.....	ácido butírico
CHO-MFR	.....	formil metano furano desidrogenase
CNTP	.....	condições normais de temperatura e pressão
CP1	.....	componente principal 1
CP2	.....	componente principal 2
DNA	.....	ácido desoxirribonucléico
dNTP	.....	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DESFDA	.....	desaparecimento da fibra em detergente ácido
DESFDN	.....	desaparecimento da fibra em detergente neutro
DESMO	.....	desaparecimento da matéria orgânica
DESMS	.....	desaparecimento da matéria seca
DESPB	.....	desaparecimento da proteína bruta
FDA	.....	fibra em detergente ácido
FDN	.....	fibra em detergente neutro
Fe30	.....	30% de feno
Fe70	.....	70% de silagem
MO	.....	matéria orgânica
MS	.....	matéria seca
ORF	.....	sequências abertas para leitura
OTU	.....	unidade taxonômica operacional
PCR	.....	reação em cadeia da polimerase
PLA	.....	protozoários líquido-associados
PB	.....	proteína bruta
PROP	.....	ácido propiônico

rDNA	.....	DNA ribossômico
RDP	.....	ribossomal database
RNA	.....	ácido ribonucléico
rRNA	.....	RNA ribossômico
Si30	.....	30% de silagem de milho
Si70	.....	70% de silagem de milho
T1PL01	.....	tratamento 1 placa 1
T2PL01	.....	tratamento 2 placa 1
T3PL02	.....	tratamento 3 placa 2
T4PL02	.....	tratamento 4 placa 2
UV	.....	radiação ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Composição bromatológica dos ingredientes utilizados nas rações contendo feno de Tifton 85 e silagem de milho como volumosos.....	30
<b>Tabela 2.</b> Sequências nucleotídicas dos iniciadores específicos utilizados para a amplificação de genes e de ORFs correspondentes às arqueias metanogênicas do rúmen.....	43
<b>Tabela 3.</b> Valores das médias, desvios-padrão e valores máximos e mínimos dos três centróides dos grupos formados pelo método de agrupamento não hierárquico k-means .....	52
<b>Tabela 4.</b> Valores das médias, desvios-padrão e valores máximos e mínimos dos três centróides dos grupos formados pelo método de agrupamento não hierárquico k-means.....	53
<b>Tabela 5.</b> Correlação entre variável e cada componente principal.....	56
<b>Tabela 6.</b> Correlação entre variável e cada componente principal.....	56
<b>Tabela 7.</b> Concentrações milimolares de CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> e gases totais oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado.....	59

<b>Tabela 8.</b> Concentrações percentuais dos gases metano (CH <sub>4</sub> ) dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ), nitrogênio (N <sub>2</sub> ) e oxigênio (O <sub>2</sub> ) oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado.....	60
<b>Tabela 9.</b> Porcentagens dos desaparecimentos de DESMS, DESMO, DESPB, DESFDN e DESFDA após incubação ruminal <i>in situ</i> .....	64
<b>Tabela 10.</b> Concentrações em µmol/mL dos ácidos acético (ACE) propiônico (PROP), butírico (BUT) e relação acetato:propionato (ACE:PROP) oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado.....	66
<b>Tabela 11.</b> Concentrações percentuais dos ácidos acético (ACE) propiônico (PROP) e butírico (BUT) oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado.....	67
<b>Tabela 12.</b> Classificação das sequências dos tratamentos com feno e silagem analisados no banco de dados RDP.....	83

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estômago bovino.....	5
<b>Figura 2.</b> Parede interna do rúmen.....	5
<b>Figura 3.</b> Esquema da via metabólica da metanogênese.....	10
<b>Figura 4.</b> <i>Methanosphaera stadtmanae</i> .....	11
<b>Figura 5.</b> Animais em baias experimentais.....	29
<b>Figura 6.</b> Esquema para mensuração dos gases.....	32
<b>Figura 7.</b> Garrafas com líquido ruminal colocadas em banho-maria.....	33
<b>Figura 8.</b> Cromatógrafo gasoso e seringa plástica.....	33
<b>Figura 9.</b> Cromatógrafo a gás para determinação de AGCC.....	36
<b>Figura 10.</b> Conteúdo ruminal sendo depositado no interior do stomacher.....	37
<b>Figura 11.</b> Esquema da separação das frações microbianas.....	38
<b>Figura 12.</b> Sequenciador automático.....	47
<b>Figura 13.</b> Dendrograma contendo a estrutura de grupos para feno e silagem nas concentrações de 30% e 70%.....	52

<b>Figura 14.</b> Caracterização dos grupos, definidos pela análise K-means, em função das variáveis utilizadas.....	54
<b>Figura 15.</b> Gráfico biplot resultante da análise de componentes principais mostrando a distribuição dos tratamentos e das variáveis.....	55
<b>Figura 16.</b> Produção de metano (em milimol) em dietas com diferentes relações volumoso:concentrado.....	61
<b>Figura 17.</b> Garrafas com líquido ruminal colocadas em banho com temperatura controlada e os recipientes com o gás armazenado produzido.....	62
<b>Figura 18.</b> Relação C2:C3 (em $\mu\text{mol/mL}$ ) em dietas com diferentes concentrações de volumoso.....	67
<b>Figura 19.</b> Material genético de amostras de microrganismos metanogênicos do rúmen obtido por lise física a partir de “glass beads”.....	70
<b>Figura 20.</b> Material genético de amostras de microrganismos metanogênicos do rúmen obtido por lise física a partir de $\text{N}_2$ .....	71
<b>Figura 21.</b> Amplificação das sequências específicas de arqueias relativas às ORFs Mmp 200, Mmp 508, Mmp 512, MMp 1244, Mmp 1249 e Mmp 1691. Mm: Material genético da linhagem da arqueia <i>M. maripaludis</i> .....	73

- Figura 22.** PCR dos produtos amplificados correspondentes às ORFs Mmp 508, Mmp 1244 e Mmp 1249. MM. Marcador 1 Kb..... 75
- Figura 23.** Cromatograma representando parte da sequência Mmp 1244 do T3, obtida por sequenciamento direto do produto da PCR..... 75
- Figura 24.** Alinhamento da sequência correspondente à ORF Mmp 1244 com outras sequências de metanogênicas, obtido pelo BLAST..... 76
- Figura 25.** Otimização da reação para a região 16S rDNA usando termociclador gradiente, com variação de temperaturas entre 48 °C a 59 °C. MM: Marcador de tamanho molecular 1kb..... 77
- Figura 26.** Amplificação da região 16S rDNA em arqueias metanogênicas do rúmen, correspondentes aos tratamentos T1, T2, T3, e T4. MM: marcador de tamanho molecular 1kb..... 78
- Figura 27.** Fotografia dos transformantes. A seta indica a presença de colônias brancas referentes à linhagem de *E. coli* DH10b transformada..... 79
- Figura 28.** Visualização do DNA plasmidial obtido de amostras de conteúdo ruminal referente aos tratamentos T1, T2, T3 e T4..... 80
- Figura 29.** Cromatograma representando parte da sequência 16S rDNA de um dos tratamentos obtida por meio do sequenciamento do fragmento inserido no vetor, com o primer universal SP6..... 80

<b>Figura 30.</b> Filograma de sequências 16S rDNA do T1, agrupado por filo.....	86
<b>Figura 31.</b> Filograma de sequências 16S rDNA do T2, agrupado por filo.....	87
<b>Figura 32.</b> Filograma de sequências 16S rDNA do T3, agrupado por filo.....	88
<b>Figura 33.</b> Filogramas de sequências 16S rDNA do T3, agrupado por filo.....	89
<b>Figura 34.</b> Filograma de sequências parciais de 16S rDNA do T4, agrupado por filo.....	90
<b>Figura 35.</b> Curva de Rarefação das análises do Dotur usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências 16S (T1) .....	91
<b>Figura 36.</b> Curva de Rarefação das análises do Dotur usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências 16S T2.....	92
<b>Figura 37.</b> Curva de Rarefação usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências 16S (T3).....	92
<b>Figura 38.</b> Curva de Rarefação usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências 16S (T3).....	93

## PRODUÇÃO *in vitro* DE METANO E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DAS Archaea METANOGÊNICAS DO RÚMEN DE BOVINOS

**RESUMO** - estratégias para reduzir o aquecimento da Terra e aumentar a produção animal requerem novos sistemas, onde devem ser consideradas as emissões de metano e de outros gases que possam provocar danos ao meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi a mensuração da produção de metano por arqueias e aplicação da metagenômica para detecção destas na fração sólida do conteúdo ruminal. Para a análise da produção de metano foi colhido o conteúdo ruminal seguido do preparo da solução a ser fermentada e armazenamento dos gases. A amplificação da região 16S rDNA foi obtida por PCR e a seguir foram feitas clonagem, sequenciamento e análise das sequências pelos programas “Sequencing Analysis 3.4” e Phred/Phrap/Consed, submetendo-as ao programa BLAST. Maiores produções de metano e relações C2:C3 foram observadas nos tratamentos contendo 70% de volumoso. As análises do BLAST permitiram identificar nos tratamentos com 70% e 30% de feno, 96 sequências relacionadas à família *Methanobacteriaceae*, 47 sequências a arqueias não cultiváveis e 60 sequências foram de arqueias desconhecidas (T1), 125 sequências relacionadas à família *Methanobacteriaceae*, 42 sequências a arqueias não cultiváveis e 32 sequências foram de arqueias não conhecidas (T2). Para os tratamentos feitos com 70% e 30% de silagem de milho, foram observadas 30 sequências referentes à família *Methanobacteriaceae*, 18 sequências à família *Methanomicrobiaceae*, 43 sequências a arqueias não cultiváveis e 118 sequências foram de arqueias desconhecidas (T3) e 173 sequências referentes à família *Methanobacteriaceae*, 31 sequências a arqueias não cultiváveis e 25 sequências foram de arqueias desconhecidas (T4). As análises deste experimento mostraram variação na produção de metano quanto às diferentes proporções V:C e a metagenômica, a região conservada 16S rDNA e o sequenciamento de arqueias do conteúdo ruminal permitiram detectar maior diversidade filogenética nos tratamentos contendo 70% de volumoso.

**Palavras-Chave:** ruminantes, arqueias, PCR, sequenciamento, análise multivariada

## ***In vitro* METHANE PRODUCTION AND BOVINE RUMEN METHANOGENICS Archaea GENETIC DIVERSITY ANALYSIS**

**SUMMARY** – strategies to reduce the Earth warming and raise animal production require new systems, where it must be considered methane and other gases emission that might cause environmental damages. The aim of this work was to evaluate the archaea methane production and the metagenomic evaluation of these bacteria present on the solid phase of the bovine ruminal content. For methane production analysis the ruminal content was collected followed by the proper manipulation for the fermentation process to take place and produced gas storage. The ribosomal 16S rRNA region was obtained by PCR amplification which was followed by cloning and DNA sequencing. The data was later analyzed by the software Sequencing Analysis 3.4, Phred/Phrap/Consed and BLAST. The highest methane production and acetate:propionate ratios were observed for the treatments containing 70% of roughage. The BLAST analysis allowed to identify 96 DNA sequences related to the *Methanobacteriaceae* family, 47 DNA sequences related to unculturable archaea and 60 DNA sequences were related to unknown archaea (T1), 125 DNA sequences related to *Methanobacteriaceae*, 42 DNA sequences do unculturable archaea and 32 DNA sequences were considered related to unknown archaea (T2) for the treatments containing 70% and 30% of hay. For those containing 70% and 30% of corn silage it was possible to detect 30 DNA sequences related to *Methanobacteriaceae*, 18 DNA sequences related to *Methanomicrobiaceae*, 43 sequences related to unculturable archaea, 118 DNA sequences related to unknown archaea (T3) and 173 DNA sequences related to *Methanobacteriaceae*, 31 sequences related to unculturable archaea, and 25 to unknown archaea (T4). The analysis carried out in this experiment have shown a variation of the methane production as different R:C ratio were used and metagenomic with the rDNA conserved region together with archaea taken from the ruminal content DNA sequencing have permitted a higher phylogenetical diversity on the treatments containing 70% of roughage.

**Keywords:** ruminants, archaea, PCR, sequencing, multivariate analysis

## 1. INTRODUÇÃO

O metano é produzido em condições anaeróbias por microrganismos metanogênicos presentes no ambiente ruminal (LASSEY et al., 1997), sendo influenciado pela idade e nível produtivo do animal. A sua produção é modulada principalmente pela presença de dióxido de carbono e de hidrogênio livres no ambiente ruminal, onde, a partir do hidrogênio livre, ocorre a redução do dióxido de carbono por microrganismos metanogênicos, com conseqüente formação de metano.

Embasado em aspectos de proteção mercadológica o Brasil, por ser detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo e por utilizar forrageiras tropicais como base da alimentação destes animais, tem sido indicado como um importante produtor de metano, fato que pode ser utilizado como embargo aos produtos da pecuária destinados à exportação. Na convenção das nações unidas realizada em 2005, houve comprometimento por parte do governo brasileiro ao assinar o Protocolo de Kyoto em avaliar e executar alternativas para reduzir a emissão dos gases de efeito estufa. Atualmente, as pressões ambientais indicam ser a redução da emissão de metano de origem pecuária, um dos principais fatores para nortear as pesquisas com a produção de ruminantes (MACHMÜLLER, 2006).

Herbívoros ruminantes como bovinos, ovinos, bubalinos e caprinos, por meio da fermentação ruminal produzem metano. As emissões globais desse gás geradas a partir dos processos entéricos são estimadas em 80 milhões de toneladas anuais, correspondendo a cerca de 22% das emissões totais de metano geradas por fontes antropogênicas (U.S.EPA, 2000). Devido a um maior efeito termogênico, a concentração de metano que vem crescendo nos últimos 30 anos cerca de 1% ao ano, poderia ser estabilizada por uma redução de suas emissões de apenas 10 a 20%, comparada com uma redução similar de 80% a 85% de CO<sub>2</sub> e outros gases causadores do efeito estufa (LENG, 1993). Embora o gás que mais se correlacione com o efeito estufa seja o CO<sub>2</sub>, uma molécula de metano contribui 25 vezes mais para este efeito do que uma de CO<sub>2</sub> (MOSS, 2000). Mesmo que todos os ruminantes no planeta produzam apenas 10% a 15% do total das emissões globais de metano (VAN SOEST, 1994), os ruminantes domésticos representam uma das poucas fontes de metano que podem ser manipuladas de alguma forma.

A fermentação de alimentos ingeridos pelos animais ruminantes produz ácidos graxos voláteis, amônia, gases (CO<sub>2</sub> e metano) e células microbianas. Para o ruminante, os ácidos graxos voláteis constituem a maior fonte de energia (65% a 75% da energia metabolizável ingerida). Entretanto, a produção de dióxido de carbono e metano representa uma grande perda de energia ingerida no alimento. A produção de gás metano pelas bactérias ruminais e intestinais (*Methanobrevibacter* spp. e *Methanomicrobium mobile*) corresponde a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido (LANA et al., 1998).

A adoção de estratégias de alimentação baseadas em princípios tecnológicos vem possibilitando o aumento da eficiência de utilização do alimento por unidade de produção de leite, carne ou mesmo trabalho além de contribuir potencialmente para a estabilização da concentração de metano na atmosfera. Desta forma, garantindo boas condições ruminais para o crescimento microbiano e ajustando as rações para que exista o correto balanço de nutrientes absorvidos, o ruminante irá demonstrar seu potencial de produção e, ao mesmo tempo, contribuirá para a estabilização do efeito estufa pela redução da emissão de metano. Para que estes efeitos sejam atingidos, é necessário garantir o uso de soluções tecnológicas que viabilizem a adoção de rações balanceadas em função da dinâmica da microbiota ruminal.

A biotecnologia pode criar alternativas para diversas situações devido às suas características de inovação, impacto atual e potencial mediante problemáticas globais como doenças, nutrição e poluição ambiental (TEN KATE, 1999), estando também relacionada diretamente ao crescimento do processo produtivo. O desenvolvimento tecnológico vem revolucionando as abordagens de exploração tradicionais de recursos biológicos. O processo de descoberta biotecnológica vem apresentando muitas alterações em decorrência das mudanças de modelos desencadeadas pelos avanços em bioinformática e biologia molecular.

Mediante a grande diversidade microbiana representada pelos organismos ainda não-cultivados e às limitações de cultivo e manipulação de microrganismos extremófilos em laboratórios (hipertermófilos, psicrófilos e barofílicos, entre outros), torna-se essencial a adoção de novas estratégias para uma exploração mais abrangente da biodiversidade microbiana. A utilização de ferramentas moleculares que independem do cultivo, como a metagenômica, são fundamentadas na extração direta de ácidos nucleicos de amostras ambientais, associadas às técnicas de

hibridização com sondas grupo-específicas e/ou PCR, clonagem e sequenciamento. Isto vem permitindo uma avaliação mais precisa das comunidades microbianas no ambiente e a descoberta de novos grupos de microrganismos ainda não cultivados (CANHOS & MANFIO, 1998).

É fundamental destacar que boa parte do desenvolvimento tecnológico e agropecuário decorre de descobertas feitas nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos (MANFIO, 1998). Os benefícios científicos esperados de um conhecimento mais abrangente sobre a diversidade microbiana permitem compreender melhor os papéis exercidos pelos microrganismos no ambiente e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade (HUNTER-CEVERA, 1998).

O presente trabalho teve por objetivos a mensuração da produção de metano pelos microrganismos metanogênicos e aplicação da metagenômica para detecção de arqueias presentes na fração sólida do conteúdo ruminal; comparação dos níveis de produção do gás metano com a presença de microrganismos metanogênicos detectados nos sólidos do conteúdo ruminal, por meio das sequências gênicas da região conservada 16S rDNA e das regiões referentes a algumas ORFs associadas à enzima (CHO-MFR), em resposta a dietas experimentais fornecidas aos animais, com diferentes proporções volumoso:concentrado; discriminação quanto à presença de microrganismos metanogênicos no conteúdo ruminal a partir do fornecimento de dietas compostas pelos volumosos feno de capim Tifton 85 e silagem de milho.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Caracterização do ambiente ruminal

Os microrganismos metanogênicos são os mais sensíveis a mudanças no ambiente ruminal e são afetados por muitos fatores dietéticos. Sendo importantes utilizadores de hidrogênio, o equilíbrio de sua população afeta o metabolismo ruminal e o balanço de carbono (VALADARES FILHO & PINA, 2002).

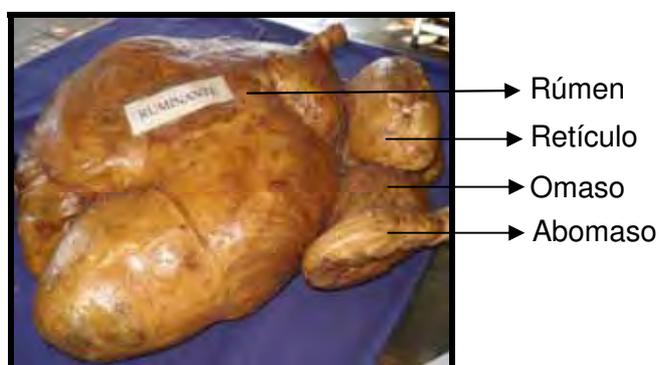
A manutenção de uma população microbiana ruminal ativa depende de algumas características ruminais que são determinadas pelo animal hospedeiro, como o suprimento de alimento mastigado ou ruminado, a remoção dos produtos de fermentação a adição de tamponantes e nutrientes por meio de saliva, a remoção de resíduos indigestíveis dos alimentos e temperatura variando entre 38°C a 42°C (média de 39°C); anaerobiose; pH tampão entre 5,5 a 7,0 (média de 6,8); presença de bactérias, protozoários e fungos; suplemento de nutrientes e contínua remoção de digesta e produtos de fermentação; matéria seca entre 10 a 15%; gravidade específica entre 1,022 e 1,055; tensão superficial do líquido de 50 dinas/cm<sup>3</sup> e pressão osmótica constante, anaerobiose e umidade ideais ao crescimento microbiano (LANA, 2005).

Para o desenvolvimento significativo de uma população microbiana ruminal os animais devem manter o ambiente ruminal em condições adequadas. A fermentação normal se processa numa faixa de osmolaridade que pode variar entre 260 e 340 mOsm, sendo mantida razoavelmente constante e próxima a 280 mOsm (OWENS & GOETSCH, 1993). A fermentação em ruminantes é o resultado das atividades físicas e microbiológicas, que convertem os componentes dietéticos a ácidos graxos voláteis, proteína microbiana, vitaminas do complexo B e vitamina K, metano, entre outros (OWENS & GOETSCH, 1993).

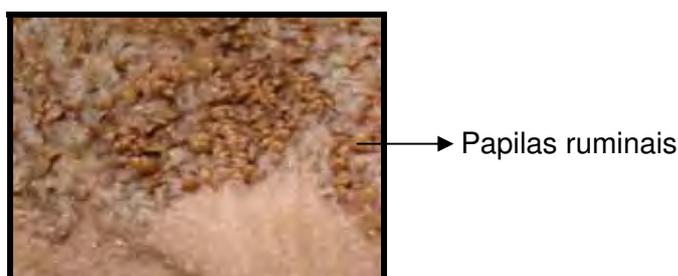
Os ruminantes têm a capacidade de utilizar grande variedade de alimentos como fonte de nutrientes. O sucesso destes animais se deve a relação simbiótica do hospedeiro com microrganismos ruminais que possibilitam o uso da parede celular de vegetais e nitrogênio não protéico como fonte de nutrientes, compostos complexos e não utilizáveis para a maioria dos outros animais. A relação simbiótica

ocorre porque o animal fornece alimento e um ambiente (rúmen) para o crescimento dos microrganismos que por sua parte, suprem o animal com ácidos resultantes da fermentação e proteína microbiana. O ecossistema do rúmen consiste principalmente de bactérias ( $10^{10}$ - $10^{11}$  células/mL), protozoários ( $10^4$ - $10^6$ /mL), fungos anaeróbios ( $10^3$ - $10^5$  zoospóro/mL) e bacteriófagos ( $10^8$ - $10^9$ /mL) (KAMRA, 2005).

Em animais adultos, o rúmen (Figuras 1 e 2) tem um volume aproximado de 100 L para bovinos e 10 L para ovinos, ocupando uma grande proporção da cavidade corporal. (HOBSON & STEWART, 1997). O rúmen apresenta um ecossistema microbiano estável e ao mesmo tempo dinâmico. O ecossistema é estável porque o ruminante saudável não sofre a contaminação do ecossistema, apesar de entrada de milhões de microrganismos no rúmen diariamente por meio dos alimentos, água e ar. É dinâmico pelo fato da população variar consideravelmente por alterações na dieta do animal. O rúmen é considerado um ecossistema aberto e contínuo, que proporciona um ambiente ideal para a manutenção da população microbiana estável, pela evolução de milhões de anos de seleção (KOZLOSKI, 2002).



**Figura 1.** Estômago bovino.



**Figura 2.** Parede interna.

## 2.2. Metanogênese

As diversas reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação apresentam grande complexidade estequiométrica (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000). Sabe-se que imediatamente após a incubação do substrato no rúmen, este é parcialmente solubilizado e os componentes solúveis são rapidamente fermentados. Os componentes insolúveis necessitam primeiramente de hidratação e colonização pelos microrganismos ruminais para serem posteriormente fermentados.

Para obter-se o máximo de rendimento energético por meio da fermentação anaeróbia de carboidratos, é necessário que o hidrogênio produzido seja utilizado para que ocorra a regeneração de  $\text{NAD}^+$  sem interferir no piruvato e nem no acetil-CoA. No rúmen existem outros consumidores de hidrogênio como, por exemplo, as conversões de  $\text{NO}_3$  em  $\text{NH}_3$  e de  $\text{SO}_4$  em  $\text{H}_2\text{S}$  e a saturação de ácidos graxos insaturados. Entretanto, estes outros consumidores de hidrogênio não apresentam grande importância quantitativa (FAHEY & BERGER, 1993).

A reação de formação de metano é considerada consumidora de energia, drenando o hidrogênio procedente de todas as reações químicas que ocorrem no rúmen, permitindo um melhor rendimento total de adenosinatrifosfato (ATP). Esse maior rendimento proporciona a formação de mais células microbianas, aumentando, desta forma, a proteína disponível para o ruminante. Isso indica que a produção de metano traz benefício a estes animais, já que promove uma fermentação mais eficaz e mantém baixa a concentração de hidrogênio no rúmen (CHURCH, 1977).

As perdas energéticas decorrentes da metanogênese ruminal causam prejuízos econômicos, já que de 3% a 13% da energia bruta ingerida pode ser perdida como metano. A sociedade atual exige sistemas de elevada produtividade de alimentos associados a níveis de poluição cada vez menores. Neste aspecto os rebanhos menos produtivos são importantes no processo de produção anual dos gases  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ . Nas últimas décadas, pesquisas na área de microbiologia ruminal vêm sendo desenvolvidas com o intuito de se desviar a energia perdida como  $\text{CH}_4$  para produtos especializados como o leite e a carne, determinando melhor utilização dos nutrientes (NAGAJARA, 2003). Este aspecto, associado à redução da metanogênese, está relacionado à melhoria da qualidade de vida no planeta

(TAMMINGA, 1992).

A redução da metanogênese pode ser conseguida das seguintes formas: inibindo reações que liberam hidrogênio no ambiente ruminal, promovendo reações alternativas que recebem o hidrogênio durante a reoxidação de equivalentes redutores e determinando reações alternativas consumidoras de hidrogênio (HEGARTY, 1999).

Intervenções na ração dos animais parecem ser viáveis, tanto tecnicamente quanto na prática, objetivando reduzir a produção de metano por unidade de produto animal pela otimização do processo de fermentação ruminal (NAGAJARA, 2003). Neste aspecto, sistemas de produção onde os ruminantes recebem rações com forragens de baixa qualidade nutricional, são os que possuem maiores possibilidades de sucesso visando reduzir a sua emissão, considerando que alta porcentagem de suplementação concentrada pode comprometer a específica habilidade desses animais de converter alimentos fibrosos em alimentos de qualidade para a população humana (GASTALDI, 2003).

Para ocorrer uma digestão normal no rúmen com produção de acetato, propionato e butirato como nutrientes para o crescimento animal, a pressão de  $H_2$  no rúmen precisa ser baixa (ULYATT & LASSEY, 2000). No rúmen isto ocorre quando microrganismos metanogênicos altamente eficazes na captura do  $H_2$  livre utilizam o mesmo para produzir metano (JOBLIN, 1999). A forma como o  $H_2$  é utilizado no rúmen é o elemento chave para o controle da emissão de metano por ruminantes devido à produção de metano no rúmen ser diretamente proporcional à concentração de  $H_2$  no mesmo (CZERKAWSKI et al., 1972).

Os microrganismos do rúmen metabolizam os carboidratos para convertê-los principalmente em glicose ou glicose - 1 fosfato que são oxidados à piruvato e posteriormente até acetato. De acordo com NUSSIO et al. (2006), a quantidade de metano gerada necessária para consumir  $H_2$  está relacionada com os produtos finais obtidos mediante a fermentação dos carboidratos.

Os animais ruminantes produzem metano basicamente pela fermentação do alimento no retículo-rúmen. O fator primário que afeta a emissão de metano do trato gastrointestinal é o alimento, pelo fato de fornecer o substrato de forma direta ou indireta às metanogênicas. Sabe-se que atributos fisiológicos do animal interagem com o alimento e arqueias metanogênicas em uma via complexa resultando em

variações na emissão de metano. Os microrganismos metanogênicos, desta forma, também interagem de maneira complexa com outras bactérias e protozoários ruminais em uma competição pelo uso do hidrogênio para produzir metano e outros produtos finais na fermentação ruminal. O tipo de fermentação resultante pode variar de alta emissão de metano, caracterizado por uma alta proporção acetato:propionato, a uma baixa emissão de metano caracterizado por uma baixa proporção acetato:propionato (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

A emissão de metano em relação à produtividade do ruminante depende de fatores como a eficiência fermentativa no rúmen e eficiência de conversão de alimento em produtos animais, que não só depende da eficiência fermentativa como também do balanço de nutrientes absorvidos após a fermentação. Bovinos submetidos a rações de baixa qualidade “desperdiçam” energia digestível na forma de metano, ao passo que o fornecimento de rações balanceadas reduz a emissão de metano para 7% (LENG, 1993).

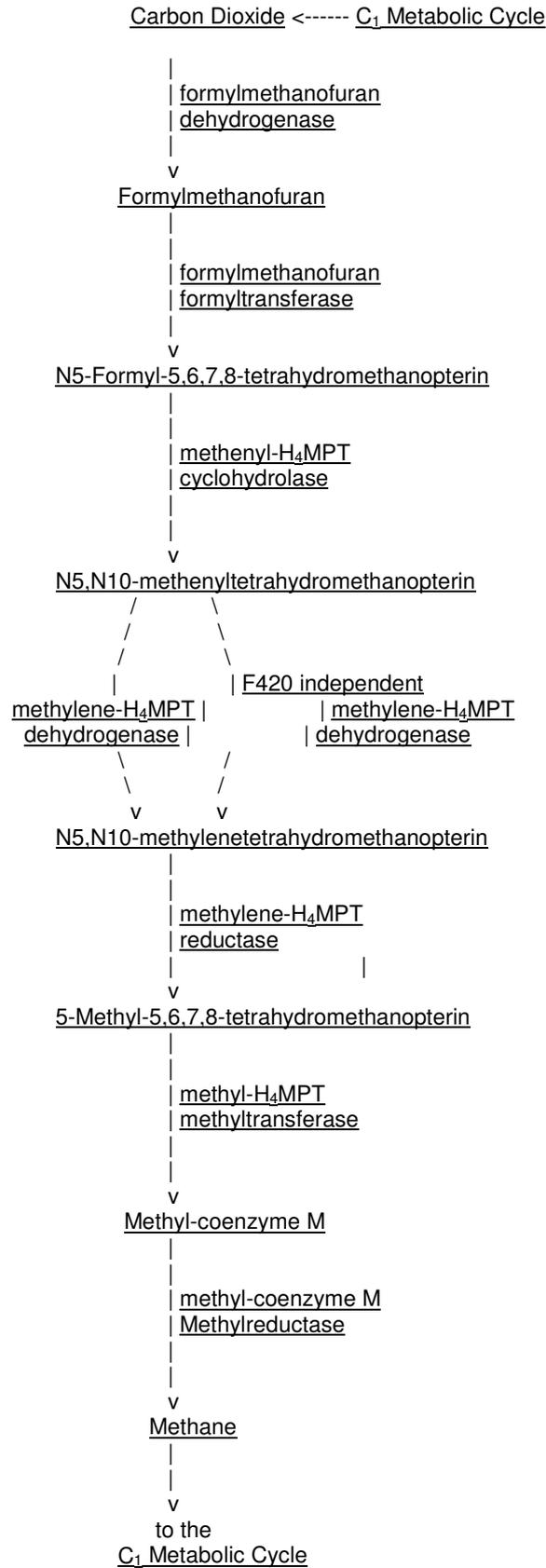
No ambiente ruminal o metano é produzido anaerobicamente por arqueias metanogênicas sendo influenciado pela idade e nível de produção animal (LASSEY et al., 1997). A sua produção é modulada principalmente pela presença de  $\text{CO}_2$  e de  $\text{H}_2$  livres no ambiente ruminal, onde, a partir do  $\text{H}_2$  livre, ocorre a redução do  $\text{CO}_2$  por microrganismos metanogênicos e conseqüentemente formação de metano. Em condições laboratoriais, a produção de metano fundamenta-se na simulação das fermentações ruminais em frascos de vidro inoculados com microrganismos ruminais, sendo que o gás pode ser medido em intervalos pré-determinados (MAURICIO et al., 1998).

Os microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos obtêm energia e carbono de  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  pela via metanogênica. O processo da metanogênese consiste em uma série de reações de redução onde um  $\text{C}_1$  derivado de  $\text{CO}_2$  é ligado ao carreador de  $\text{C}_1$ . A Figura 3 demonstra o esquema da metanogênese contendo todas as etapas metabólicas até chegar à produção de metano. A formação da enzima formil metano furano desidrogenase (CHO-FMR) está entre as reações mais importantes para a metanogênese, em termos de bioenergia. A síntese do formil metano furano é o primeiro passo da metanogênese. Neste passo, o  $\text{CO}_2$  é ligado ao metano furano e reduzido ao estado formil com elétrons derivados de hidrogênio. Esta reação é endergônica sob condições termodinâmicas padrão (THAUER, 1998).

O sequenciamento completo do genoma da *Methanococcus maripaludis* mostrou que neste microrganismo, a enzima CHO-MFR catalisa o primeiro passo na redução de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>, podendo ser encontrada tanto na forma tungstênio (Fwd) e codificada pelas ORFs (Open Reading Frame – sequências abertas para leitura) Mmp 1244, Mmp 1249 e Mmp 1691, como na forma de molibdênio (Fmd) sendo codificada pelas ORFs Mmp 0200, Mmp 0508 e Mmp 0512 (HENDRICKSON et al., 2004).

### **2.3. Microrganismos metanogênicos**

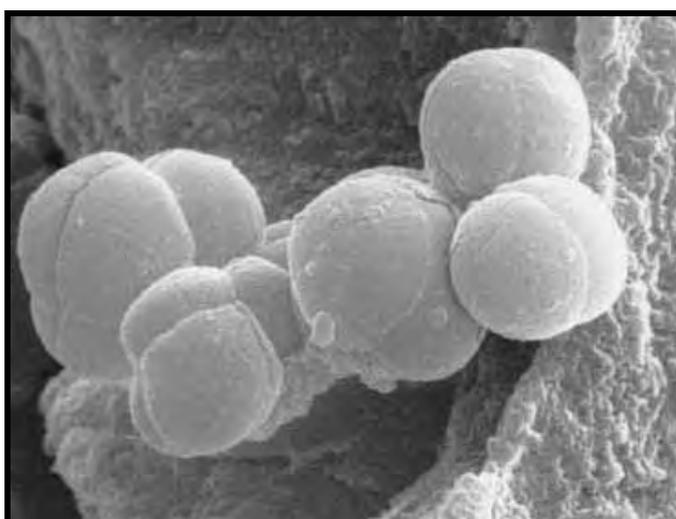
As arqueias metanogênicas ocupam um nicho metabólico exclusivo, são estritamente anaeróbicas e produzem metano, uma fonte de energia útil e um gás de cozinha potente. Estes organismos são encontrados em diversos habitats anaeróbicos, desde sedimentos marinhos e aquáticos a digestores, rúmen e intestino grosso de herbívoros e outros mamíferos. As maiores fontes de emissão de CH<sub>4</sub>, considerando as atividades agrícolas são representadas pela fermentação entérica em ruminantes, produção de arroz em terrenos alagados e fermentação de dejetos da pecuária (OLESEN et al., 2006). A produção de arroz em terrenos alagados contribui com 11% do total de CH<sub>4</sub> liberado para a atmosfera, a fermentação entérica em animais com 16% e a fermentação de dejetos com 17% (HARPER et al., 1999). Nestes habitats, a degradação de matéria orgânica resulta na produção de H<sub>2</sub> e outros intermediários por organismos que fazem a fermentação. Segundo ZINDER (1993), a manutenção de uma pressão parcial de H<sub>2</sub> extremamente baixa permite que as metanogênicas mantenham vias de fermentação bastante favoráveis energeticamente.



**Figura 3.** Esquema da via metabólica da metanogênese (MA et al., 2006).

As arqueias metanogênicas representam um grupo de microrganismos polifilético, compreendendo três ordens, com oito famílias e 21 gêneros. Apresentam morfologia comum às células procarióticas, com forma de bacilos de diferentes tamanhos, cocos, sarcinas e filamentos. Algumas representantes apresentam propriedade de coloração Gram-positiva e outras Gram-negativa, sendo a taxonomia baseada essencialmente em métodos moleculares, por comparação de sequências do 16S rRNA. As Análises morfo-fisiológicas facilitam a classificação primária relacionada a gênero (SOWERS, 1995).

A ordem *Methanobacteriales* compreende a família *Methanobacteriaceae*, com os gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera* (Figura 4), contendo 18 espécies; e a família *Methanothermaceae*, com o gênero *Methanothermusa*, duas espécies. A ordem *Methanococcales* congrega as famílias *Methanococcaceae*, gênero *Methanococcus*, com 7 espécies; *Methanomicrobiaceae*, com os gêneros *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanolacinia*, *Methanomicrobium* e *Methanospirillum*, com 13 espécies; *Methanocorpusculaceae*, gênero *Methanocorpusculum*, com 5 espécies; *Methanoplanaceae*, gênero *Methanoplanus*, com duas espécies; *Methanosarcinaceae*, com os gêneros *Methanococcoides*, *Methanohalobium*, *Methanohalophilus*, *Methanolobus*, *Methanopyrus*, *Methanosaeta*, *Methanosarcina*; e *Methanotherix*, com 19 espécies (SOWERS, 1995).



**Figura 4.** *Methanosphaera stadtmanae*, foto de VAZOLLER (1999).

Segundo KAMRA (2005) oito diferentes espécies representam os cinco gêneros de metanogênicas que têm sido encontradas no rúmen: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium bryanti*, *Methanobacterium vibacter smithii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanoculleus olentangyi*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri* e *Methanomicrobium mobile*. As espécies metanogênicas mais comumente isoladas do rúmen são linhagens de *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* e *Methanosarcina* (JARVIS et al., 2000).

De acordo com MCALLISTER et al. (1996), as arqueias metanogênicas, responsáveis pela produção de CH<sub>4</sub>, formam um grupo distinto de microrganismos, possuindo co-fatores (coenzima M, F 420, F 430) e lipídeos (ésteres de isopranyl glicerol) únicos. A parede celular destes microrganismos é composta principalmente por pseudomureína, proteína, glicoproteína ou heteropolissacarídeos (ISHINO et al., 1998). As arqueias se diferenciam das bactérias quanto à parede celular que pode ser composta por pseudopeptidoglicano ou apenas por proteína, sendo a parede das bactérias composta por peptidoglicano; membrana celular, que nas arqueias é formada por lipídeos de cadeias hidrocarbonadas ramificadas que se ligam ao glicerol por ligações do tipo éter e nas bactérias os lipídeos das cadeias hidrocarbonadas ramificadas se ligam ao glicerol por ligações do tipo éster; quanto ao genoma, que nas arqueias é determinado pela presença de plasmídeos (DNA único, circular) e nas bactérias é constituído por DNA fragmentado em cromossomos múltiplos (RAISMAN & GONZALEZ, 2006).

No rúmen, as arqueias são encontradas intimamente associadas com protozoários ciliados e em justaposição com bactérias, não sendo essa, no entanto, uma localização obrigatória (FINLAY et al., 1994). As metanogênicas podem ser encontradas tanto aderidas na superfície celular dos protozoários, como na fase intracelular dos mesmos (USHIDA & JOUANY, 1996). Considerando que os protozoários ciliados têm um grande potencial de produção de hidrogênio no rúmen, a associação somática das metanogênicas com estes ciliados indica uma relação simbiótica, em que as metanogênicas, por utilizarem o hidrogênio produzido pelos ciliados, favorecem a manutenção de um ambiente ruminal adequado ao desenvolvimento destes microrganismos (VAN SOEST, 1994).

As arqueias metanogênicas são sensíveis às mudanças nas condições da ração do animal. Por exemplo, aumento na taxa de passagem da digesta, aumento

na taxa de fermentação, decréscimo da ruminação ou pH são fatores que conduzem a redução da quantidade de H<sub>2</sub> disponível para a formação de metano. Dessa maneira há menor produção de metano e em consequência disso aumenta o nível de energia metabolizável disponível para o animal (NUSSIO et al., 2006).

Estratégias para reduzir o aquecimento da Terra e aumentar a produção animal requerem novos sistemas, onde devem ser consideradas as emissões de metano e de outros gases que possam provocar danos ao meio ambiente. A garantia de condições ruminais favoráveis ao crescimento microbiano e o ajuste nas rações para que exista o correto balanço de nutrientes absorvidos permitem que o ruminante demonstre seu potencial de produção e, ao mesmo tempo, contribua para a estabilização do efeito estufa pela redução da emissão de metano. Para que estes objetivos sejam atingidos, é necessário garantir o uso de soluções tecnológicas que viabilizem a adoção de rações balanceadas em função da dinâmica da microbiota ruminal (GASTALDI, 2003).

#### **2.4. Mensuração de metano**

A técnica de produção de gases *in vitro* foi descrita há mais de meio século e com o tempo foram desenvolvidas e aperfeiçoadas várias metodologias de produção usadas atualmente por vários grupos de pesquisas (RIVERA, 2006). O princípio desta técnica se baseia na simulação dos processos metabólicos que acontecem normalmente no rúmen onde a degradação do alimento depende dos microrganismos e do ambiente ruminal adequado para se manterem ativos e fermentarem o alimento. Sob essas condições há formação de AGCC, além de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e produção de massa microbiana (BLUMMEL et al., 2005).

O precursor do cromatógrafo gasoso foi feito para analisar os ácidos graxos de cadeia curta do rúmen nas décadas de 1950 e 1960. Desde então esta técnica tem sido muito desenvolvida, assim como os instrumentos utilizados para a sua realização. Estes instrumentos são capazes de analisar quase todos os compostos que podem ser vaporizados e que são encontrados em estado gasoso. A amostra a ser analisada é colocada no aparelho, sendo movida através de uma coluna cromatográfica quente por meio da injeção de um outro gás. Este processo requer

pequenas quantidades de amostra e permite a separação quantitativa de compostos químicos com bastante rapidez (CHURCH & POND, 1977).

De acordo com GASTALDI (2003), muitos métodos estão disponíveis para medir a produção de gás em ruminantes e podem variar de incubações do conteúdo ruminal durante curto período (métodos indiretos) a elaborados sistemas em câmaras calorimétricas (métodos diretos). Em todos os casos existem vantagens e desvantagens. A escolha dependerá, principalmente, se as medidas serão realizadas em grupos de animais ou individualmente, ou se os mesmos poderão ser confinados em câmaras de respiração ou se movimentarem livremente durante as mensurações.

A maioria dos equipamentos utilizados para medir a produção de gases em animais são constituídos por câmaras respiratórias onde permanecem em seu interior por determinado período. Estas câmaras dispõem de meios para introduzir alimentos e água, assim como colher os dejetos. Existe o tipo fechado, onde o ar e os gases produzidos recirculam por meio da câmara, permanecendo no interior do animal por poucas horas. Existe também o sistema aberto, onde o ar exterior circula continuamente pelo interior da câmara, obrigando realizações de medidas criteriosas e sucessivas da quantidade de ar que entra e sai na mesma, assim como avaliações qualitativas. Este método é mais usado em grandes animais, podendo ser obtidas amostras a tempos determinados e analisados automaticamente, sendo as informações obtidas armazenadas e processadas em computador (CHURCH & POND, 1977).

Muitos métodos de mensuração da produção de gases *in vitro* implicam na incubação do alimento com o líquido ruminal e diversas soluções tampão (SMACCHIA et al., 2000). Os elementos utilizados na confecção destas soluções podem modificar a composição da microfauna do líquido ruminal utilizado, considerando que algumas espécies são muito sensíveis (BROUDISCOU et al., 1999).

A mensuração da produção acumulada de gases de maneira alternativa ao desaparecimento do substrato, como indicador do metabolismo do carbono, centrando atenção nos produtos finais da fermentação (CO<sub>2</sub>, metano e ácidos graxos voláteis) foi proposta por Bruni & Chilibroste (2000). Este sistema possui a vantagem de permitir a medição do resultado direto do metabolismo microbiano, ao invés de

registrar o desaparecimento do substrato, além de possibilitar o monitoramento a intervalos de tempos pré-determinados sem interferir no processo fermentativo, promovendo um estudo mais preciso da cinética de fermentação ruminal.

A produção de  $\text{CO}_2$  durante a fermentação de um substrato resulta em duas fontes: uma diretamente dos passos metabólicos como a descarboxilação oxidativa do piruvato e outra das reações dos produtos finais da fermentação (ácidos graxos voláteis) com o bicarbonato da solução tampão e produção indireta de gás (BEUVINK & SPOELTRA, 1992). O  $\text{CO}_2$  gerado no processo fermentativo pode ser capturado pelo  $\text{NH}_4$ , formando  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , levando a uma subestimação da quantidade produzida (MENKE & STEINGASS, 1988).

Diferentes teores de proteína na matéria orgânica fermentada podem resultar na perda de uniformidade entre a produção de gases e o desaparecimento do substrato (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000). Além disso, imediatamente após a incubação, o substrato é parcialmente solubilizado e os componentes solúveis são rapidamente fermentados. Os componentes insolúveis precisam ser fermentados e colonizados pelos microrganismos ruminais, onde diferentes substratos e seus componentes apresentam resistências variadas a estes processos, resultando em perfis de produção de gases distintos. A complexidade da estequiometria das diferentes reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação requer maiores estudos.

A técnica de produção de gás pode ser considerada como um indicador da atividade microbiana já que está associada à energia contida nos alimentos disponíveis no rúmen e assim, conhecendo a produção de gás, é possível estimar a atividade microbiana (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000).

A técnica de mensuração da produção de gases também pode ser usada para determinar o valor nutritivo das plantas forrageiras em processos de melhoramento genético e para auxiliar na compreensão das interações genótipo-ambiente das principais espécies utilizadas nos sistemas de produção (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000). O sistema de produção de gases permite também averiguar diferentes qualidades dos alimentos que não puderam ser detectadas por determinações tradicionais (GASTALDI, 2003).

## 2.5. Forragens e fibras na alimentação

O grande desafio na alimentação de ruminantes de alta produção é aumentar sua capacidade de ingestão de alimento para suprir suas necessidades nutricionais sem prejudicar os processos fisiológicos no rúmen, ou seja, mantendo a atividade de ruminação com consumo adequado de volumoso (VELHO et al., 2007).

As forragens são as importantes fontes de nutrientes na nutrição de ruminantes. Além da proteína e energia, as forragens provêm a fibra necessária nas rações para promover a mastigação, ruminação e condições adequadas ao funcionamento do rúmen. Na formulação de dietas para bovinos, a qualidade e a quantidade de forragens é o primeiro fator a ser analisado no atendimento das exigências nutricionais e de fibra. Os componentes concentrados são usados para complementar as contribuições nutricionais das forragens (BIANCHINI et al., 2007).

A fibra é fonte de carboidratos usados como fonte de energia pelos microrganismos do rúmen. Constitui o componente estrutural das plantas, que é a parede celular, e a fração menos digerível do alimento, ou seja, aquela que não é digerida por enzimas de mamíferos, além de ser componente essencial para estimular a mastigação e ruminação (WEISS, 1999). A definição de fibra está vinculada ao método analítico empregado em sua determinação (MERTENS, 2001), sendo assim, é considerado um termo meramente nutricional. De acordo com MERTENS (1992), quimicamente a fibra é um agregado de compostos no qual a sua composição é dependente de sua fonte e da forma como é medida. A fração de fibra em detergente ácido (FDA) dos alimentos inclui celulose e lignina como componentes primários além de quantidades variáveis de cinza e compostos nitrogenados. A fração de fibra em detergente neutro inclui celulose, hemicelulose e lignina como os componentes principais.

Os carboidratos são os principais constituintes das plantas forrageiras, correspondendo cerca de 50 a 80% da matéria seca das forrageiras e cereais. Os carboidratos não estruturais incluem os carboidratos encontrados no conteúdo celular, como glicose e frutose, e os carboidratos de reserva das plantas, como o amido, a sacarose e as frutanas (VITTORI et al., 2000). Os carboidratos estruturais incluem aqueles encontrados normalmente constituindo a parede celular, representados principalmente pela pectina, hemicelulose e celulose, que são os

elementos mais importantes na determinação da qualidade nutritiva das forragens (VAN SOEST et al., 1991). A natureza e concentração dos carboidratos estruturais da parede celular são os principais determinantes da qualidade dos alimentos volumosos, especialmente de forragens (VAN SOEST, 1994).

As forragens têm papel fundamental na nutrição de bovinos pois representam uma enorme gama de alimentos que permitem a obtenção de produtos de origem animal com os custos mais baixos, fornecimento de fibra necessária para manutenção da função ruminal, consumo de matéria seca e produção de leite ou carne, constituindo ainda a principal fonte de energia a custos mais baixos (MERTENS, 1992).

O capim-Tifton 85 (*Cynodon* spp) é uma forragem com grande massa foliar, rizomas grossos, que são caules subterrâneos que mantêm as reservas de carboidratos e nutrientes e que proporcionam resistência à seca, geada, queimadas e pastejos baixos. É um capim recomendado para fenação e pastejo em decorrência da sua boa relação folha/colmo (RODRIGUES et al., 1998). Esta gramínea é proveniente dos Estados Unidos e foi introduzida ao Brasil no ano de 1993, vem resistindo e se mantendo verde durante as geadas e secas prolongadas.

A planta de milho inteira, verde ou na forma de silagem, permite maior consumo em razão do seu teor relativamente baixo de FDN (menos de 50%), pois quanto menor o teor de FDN maior a taxa de fermentação da FDN, ou seja, ocorre esvaziamento mais rápido do rúmen. A silagem de milho fornece 50 a 100% a mais de energia digestível por hectare que qualquer outra forrageira. Entretanto, o valor nutritivo da silagem de milho pode variar conforme o híbrido, a densidade de cultivo, as condições de crescimento, a maturidade e a umidade no momento da colheita, o tamanho de partícula e as condições de ensilagem (SATTER & REIS, 1997) e desensilagem (VELHO et al., 2006).

A avaliação das forragens para ruminantes depende do seu valor nutritivo, sua composição e outros fatores que simultaneamente contribuem para o desempenho animal, como a estrutura e composição da planta, consumo voluntário, cinética de degradação e digestibilidade do alimento são alguns fatores limitantes para a nutrição e produção animal (HOOVER, 1986).

Na forragem, a quantidade de fibra e as frações que a compõe estão entre os fatores que afetam a ingestão e o desempenho dos ruminantes, uma vez que a

função biológica da fibra é variável e geralmente representada pela baixa digestibilidade, de tal forma que o volume físico ocupado no rúmen afeta a ingestão voluntária e o desempenho animal (VAN SOEST, 1994). A fração da fibra pode conter em sua composição proteína bruta (PB) apresentando-se em concentração altamente variável entre 3 a 15% em forrageiras e 1 a 20% em concentrados (CARRÉ & BRILLOUET, 1986).

A degradabilidade das frações fibrosas dos alimentos aumenta, quanto maior for a participação de alimentos volumosos na dieta dos animais (SOUZA et al., 2000). Contudo, de todos nutrientes necessários às exigências nutricionais para manutenção, crescimento e, ou produção de bovinos, a energia oriunda da degradação ruminal de celulose e hemicelulose constitui a principal contribuição dos volumosos (ÍTAVO et al., 2002).

Segundo CARVALHO et al. (2006), em virtude da variação na composição química e à diversificação de métodos de análises das frações dos alimentos para a determinação de alguns parâmetros ruminiais, torna-se necessária uma avaliação mais precisa do valor nutritivo dos alimentos volumosos e concentrados. O conhecimento das taxas de degradação e passagem desses alimentos fornecem dados para o balanceamento de rações mais eficientes.

A técnica *in situ* ou do saco de náilon suspenso no rúmen para estimar a degradabilidade de determinado alimento, por intermédio do desaparecimento do mesmo após diferentes tempos de incubação no rúmen, apresenta-se como alternativa viável, por ser simples e econômica (VELOSO et al., 2000; MOLINA et al., 2002), associada, portanto, a maior rapidez e repetibilidade dos resultados (NOCEK, 1988). Ela permite o contato íntimo do alimento avaliado com o ambiente ruminal, sendo a melhor forma de simulação deste meio, embora o alimento não esteja sujeito a todos os eventos digestivos, como mastigação, ruminação e passagem.

## 2.6. Ácidos graxos de cadeia curta

Os ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGCC) são estruturas hidrossolúveis ímpares e ramificadas, constituídas de um a cinco carbonos e se encontram altamente concentradas no rúmen (GONZALEZ, 2003). Os AGCC são produtos do metabolismo microbiano, sendo muito importantes para o hospedeiro, pois, sendo energéticos, suprem de 60% a 80% do requerimento energético dos ruminantes. Assim, é fundamental que o animal ruminante tenha boa capacidade de absorção desses (FURLAN et al., 2006).

De acordo com KOZLOSKI (2002), a estequiometria da conversão de um mol de glicose para AGCC e a proporção em que cada ácido é produzido depende da espécie bacteriana, que pode ser especializada em produzir um ou outro de ácido e principalmente da concentração de nicotinamida adenosina difosfato (NADH) e  $H_2$  na célula.

Os alimentos compostos por lipídios, após chegarem ao rúmen são hidrolisados pela ação de microrganismos, que os transformam em ácidos graxos, glicerol ou outros compostos. Portanto, as bactérias do rúmen têm entre outras funções a responsabilidade de hidrogenar os ácidos graxos insaturados. O processo de hidrólise produz glicerol, substância aproveitada pelas bactérias para a produção de AGCC, que por sua vez não são aproveitados pelas mesmas para a produção de energia, devido ao fato de tratar-se de compostos de composição muito reduzida, incorporados a seu citoplasma na forma de ácidos graxos livres (CHURCH, 1998).

Todos os carboidratos, digeridos no rúmen, transformam-se em AGCC sendo que os principais são o acético (C2), o propiônico (C3) e o butírico (C4) e suas concentrações e porções relativas dependem da dieta (LUCCI, 1997). Com dietas à base de forragem, o pH se mantém bastante estável devido à lenta digestão da fibra. As variações destas proporções com dietas à base de forragens são bruscas e não podem ser previstas. As mudanças que a taxa de fermentação sofre com dietas ricas em concentrados são mais fáceis de prever, pois a microflora é menos variada que nas dietas à base de forragem (CHURCH, 1993). Quando se diminui a proporção volumoso:concentrado (V:C), também diminui a proporção de acetato:propionato (C2:C3) (ANNISON & ARMSTRONG, 1970). A proporção C2:C3 é utilizada para comparar dietas e prever um valor nutritivo relativo. Em geral,

quando na dieta se aumenta os níveis de celulose e hemicelulose em relação aos níveis de carboidratos solúveis e amidos, também se aumenta a proporção C2:C3. A produção de AGCC a partir de um determinado substrato (amido, celulose) varia com a composição da dieta (MURPHY et al., 1982).

Menor produção de metano, aumento na produção de propionato e diminuição na relação C2:C3 foram observados em ruminantes alimentados com rações ricas em amido (ØRSKOV et al., 1968). Esta mudança no padrão de fermentação pode ser atribuída a um aumento na taxa de fermentação, favorecendo a produção de propionato ao invés de metano (DEMEYER & VAN NEVEL, 1975).

## **2.7. Avaliação das comunidades microbianas do ambiente**

Estudos na área de ecologia molecular microbiana vêm se desenvolvendo desde a década de 80, utilizando diferentes técnicas para análise das comunidades microbianas a partir de amostras ambientais. Uma estratégia utilizada para ampliar os conhecimentos dos componentes dessas comunidades em um ambiente é a partir de análise filogenéticas por sequenciamento de genes, que codificam a formação das subunidades do rRNA, principalmente da 16S rDNA. Além de genes ribossomais, estudos da comunidade microbiana pelo uso de genes funcionais também têm sido aplicados. Dentro destas comunidades, populações que desempenham um papel importante na dinâmica dos nutrientes também podem ser analisadas (PIRES & TEIXEIRA, 2004).

O estudo do DNA genômico obtido de um habitat recebeu o nome de metagenoma (BORNEMAN et al., 1996). Metodologias moleculares baseadas em metagenômica utilizam o DNA genômico total extraído diretamente no meio ambiente, e por ampliações via PCR, clonagem e sequenciamento do gene rDNA ribossomal torna-se possível a identificação de microrganismos ainda desconhecidos (BORNEMAN et al., 1996, KENT & TRIPLETT, 2002). As abordagens metagenômicas têm sua origem nos genomas de eucariotos (RONDON et al., 1999b), e envolve o uso de um vetor plasmidial estável, por exemplo, o pGEM-T (Promega) para clonagem de segmentos de DNA de amostras ambientais em *Escherichia coli* DH10B como hospedeiro (DUNBAR et al., 1999).

Métodos independentes de cultivo tendem a substituir métodos baseados em isolamento e cultivo para a realização de levantamentos e comparação da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (HUGENHOLTZ et al., 1998a). Resultados de estudos moleculares de solos, ambientes marinhos e comunidades de ambientes extremos têm demonstrado que populações de microrganismos isolados em cultivo a partir de amostras destes habitats não representam necessariamente os organismos dominantes nos ambientes naturais (HUGENHOLTZ et al., 1998a). Uma das razões para esta discrepância é o fato de que os métodos de cultivo tradicionalmente utilizados em laboratório não representam as condições encontradas em ambientes naturais e tendem a selecionar microrganismos de crescimento rápido, adaptados ao meio de cultivo utilizado.

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta técnica se baseia no alinhamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos usados como iniciadores que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que sua sequência de nucleotídeos sejam complementares a sequências específicas flangeadoras da região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). De maneira geral, as tecnologias baseadas em PCR são rápidas e relativamente baratas, entretanto, quando aplicadas na análise de amostras metagenômicas podem apresentar dificuldades por diversos motivos, tais como: extração de DNA metagenômico mais laboriosa, diferenças celulares entre diferentes grupos taxonômicos, baixa densidade bacteriana em alguns ambientes e contaminação das amostras ambientais (KENT & TRIPLET, 2002).

Sondas de oligonucleotídeos, mais especificamente 16S rRNA, têm sido utilizadas para identificar, quantificar e visualizar populações de bactérias no rúmen (FORSTER et al., 1997). A análise das sequências gênicas do 16S rRNA tem servido de base para a discriminação de diversas comunidades microbianas cujo cultivo em meios de cultivo e identificação bioquímica apresentam sérias limitações (AMANN et al., 1995). As similaridades entre as sequências nucleotídicas auxiliam na identificação de microrganismos não cultiváveis no ambiente.

Segundo ATLAS & BARTHA (1997), a grande vantagem de usar moléculas de rDNA é que elas estão presentes em todos os organismos vivos, e isto permite compará-las para determinar sua distância evolutiva. Esta molécula constitui um importante marcador molecular por ser longa (aproximadamente 1500 pb), ter pequenas regiões variáveis permitindo diferenciar organismos muito próximos por não apresentar tendência de alterações rápidas e por apresentar função de grande importância na expressão do gene.

O processo de clonagem é uma estratégia que nos permite obter informações sobre a variabilidade, e também sobre as relações filogenéticas dos microrganismos presentes no ambiente, possibilitando a construção de bibliotecas ambientais de 16S rDNA. A clonagem de um gene consiste em inseri-lo em um vetor, que é um DNA capaz de se multiplicar dentro de um sistema vivo como, por exemplo, um plasmídeo bacteriano. Considerando que uma colônia de bactérias pode corresponder à multiplicação de uma só célula, essa colônia constitui um clone. Quando se faz uma extração de plasmídeo são obtidas várias cópias desse gene para outras manipulações. A importância do conhecimento da biodiversidade de microrganismos, num determinado ambiente, vai desde a compreensão de sua dinâmica até a manipulação de algumas das suas propriedades biológicas, a fim de se obter retorno econômico (PIRES & TEIXEIRA, 2004).

Um fator vital ao crescimento, manutenção e reparo celular de todos os microrganismos é a síntese de proteínas que depende da participação do RNA ribossômico (rRNA) para a formação do ribossomo e tradução da informação genética. A codificação do rRNA é realizada pelo rDNA (CARVALHO NETO, 2007). O sequenciamento de genes ribossomais permite que produtos amplificados sejam separados em vetores plasmidiais por clonagem e então sequenciados. As sequências gênicas geradas podem ser identificadas por meio de sequências gênicas de organismos conhecidos depositados em bancos gênicos. A adoção de técnicas que utilizam o gene 16S rDNA para identificar e até mesmo classificar bactérias foi sugerida pelo comitê de sistemática bacteriana em 2002 (STACKEBRANDT et al., 2002). Esta abordagem é bastante usada para estudar comunidades microbianas complexas do ambiente (HONGO et al., 2003).

Depois da montagem das seqüências em regiões contíguas, tem início a tarefa da informação contida nessa seqüência. Os genes são identificados em dados

brutos pela comparação com genes conhecidos ou pela busca de características típicas de genes. Nos métodos de comparação, um algoritmo como o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool \_ ferramenta de busca e alinhamento básico) procura alinhar a sequência que está sendo analisada com as demais sequências presentes em um banco de dados introduzindo o menor número possível de lacunas ou erros de pareamento. A evidência indireta de que a sequência pertence a um gene é o fato de a mesma apresentar homologia com outros genes ou proteínas (MICKLOS et al., 2005).

### **2.7.1. Biotecnologia e Bioinformática**

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final dos melhores candidatos a partir de uma lista reduzida de opções e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL et al., 2000).

Este conceito clássico de exploração de recursos biológicos ainda se mantém válido nos dias de hoje e constitui o modelo utilizado em diversos setores da indústria de biotecnologia mundial. No escopo das aplicações microbianas em biotecnologia tradicional, o valor dos microrganismos é geralmente avaliado pelo potencial aplicação direta nos processos biotecnológicos. Existem muitos benefícios econômicos e estratégicos relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para aquisição de novos antibióticos e agentes terapêuticos; probióticos; produtos químicos; enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas; biorremediação de poluentes; e biolixiviação e recuperação de minérios (HUNTER & CEVERA, 1998).

A bioinformática é a ciência de usar informações para entender a biologia e constitui uma ferramenta que pode ser utilizada para desvendar muitas questões relacionadas nesta área. Informações sobre função e hereditariedade do organismo são armazenadas como DNA, RNA e proteínas. Todas são cadeias lineares

compostas de pequenas moléculas. Essas macromoléculas são reunidas com base em um alfabeto fixo de produtos químicos simples: o DNA é composto de quatro desoxirribonucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina), o RNA é composto de quatro ribonucleotídeos (adenina, uracila, citosina e guanina) e as proteínas são compostas de 20 aminoácidos. Essas macromoléculas podem ser representadas por sequências de símbolos que podem ser comparadas para localizar semelhanças que sugerem uma relação das moléculas pela forma ou função (GIBAS & JAMBECK, 2001).

A comparação sequencial é possivelmente a ferramenta computacional mais útil aos pesquisadores. A Web possibilita que um único banco de dados públicos de sequências de genomas ofereça serviços por meio de uma interface uniforme com uma comunidade mundial de usuários. Com um programa de computador comum, chamado fsBLAST, podem ser comparadas sequências de DNA desconhecidas com a coleção completa de seqüências de DNA públicas (GIBAS & JAMBECK, 2001).

A bioinformática possibilita o desenvolvimento de muitos métodos computacionais importantes na investigação de genes, entre eles o alinhamento múltiplo de sequências e análise filogenética. Os alinhamentos múltiplos de sequências auxiliam a identificação visual de locais em um DNA ou em uma sequência de proteínas que pode ser funcionalmente importantes. Estes alinhamentos também podem ser analisados quantitativamente para extrair informações sobre uma família de genes e constituem uma etapa integral na análise filogenética de uma família de sequências relacionadas. A análise filogenética tenta descrever o relacionamento evolutivo de um grupo de sequências. Uma árvore filogenética tradicional ou cladograma agrupa espécies em um diagrama que representa sua divergência evolutiva relativa. As ramificações da árvore que ocorrem mais distantes da raiz separam as espécies individuais e as ramificações que ocorrem próximas à raiz agrupam as espécies em reinos, filos, classes, famílias, gêneros, etc. As informações em um alinhamento de sequências moleculares podem ser usadas para computar uma árvore filogenética de uma determinada família de sequências gênicas (GIBAS & JAMBECK, 2001).

### 2.7.2. Filogenia dos microrganismos

Filogenia é o estudo das relações evolucionárias entre os seres vivos. Análises filogenéticas estimam estas relações e as representam sob a forma de árvore (dendograma) com ramos que identificam o microrganismo. A premissa básica de um cladograma, como são chamadas algumas árvores, é que os membros de um clado compartilham uma história evolucionária próxima e são mais relacionados uns com os outros do que com membros de clados mais distantes. Geralmente, análises filogenéticas são realizadas por comparação de múltiplas características ou caracteres, como por exemplo, sequências de DNA (CARVALHO NETO, 2007).

Ao menos dois requisitos devem ser seguidos na construção das relações filogenéticas utilizando o DNA: as sequências devem ser homologas e a variabilidade nestas devem conter sinas filogenéticos adequados para resolver o problema de interesse. As análises filogenéticas de sequências nucleotídicas devem ser feitas a partir do alinhamento das mesmas, determinação do modelo de substituição dos nucleotídeos, construção da árvore filogenética e avaliação da árvore (CARVALHO NETO, 2007).

Um dos programas mais utilizados para alinhamento de múltiplas sequências é o CLUSTAL (THOMPSON, 1994). O alinhamento permite a identificação de substituição de nucleotídeos e regiões que sofreram eventos de deleção e inserção de bases. Já para a construção de uma árvore um dos métodos muito usados é o Neighbor-Joining (SAITOU, 1987). Neste método uma árvore é construída primeiramente em estrela e a seguir é buscado um par de vizinhos que minimize a soma total dos ramos da árvore para formar um nó interno, sendo agora considerada uma unidade taxonômica operacional (OTU) e sua distância, ou seja, a quantidade de dissimilaridade entre o par, é calculada. O procedimento é então repetido até que toda árvore em estrela tenha sido resolvida de maneira a minimizar a soma dos comprimentos dos ramos. Este método é bastante rápido e eficaz na reconstrução da topologia correta (CARVALHO NETO, 2007).

## 2.8. Análise multivariada

A análise estatística multivariada é a área da estatística que se preocupa com as relações entre as variáveis e como tal apresenta duas características principais: os valores das diferentes variáveis devem ser obtidos sobre os mesmos indivíduos e estas devem ser independentes e consideradas simultaneamente (KENDALL, 1969). Esta análise se refere a todos os métodos estatísticos que simultaneamente analisam múltiplas variáveis sobre cada indivíduo sob investigação. As variáveis devem ser aleatórias e inter-relacionadas de maneira que seus diferentes efeitos não podem ser interpretados significativamente de forma separada. Essa ferramenta utiliza equações matemáticas que relacionam fatores e interconexões dentro do sistema permitindo estabelecer o comportamento, as relações, interações e dinâmica entre as variáveis estudadas e os fatores que determinam mudanças no sistema. Dessa forma, o desenvolvimento de modelos matemáticos e a simulação são importantes para entender a intensidade e o padrão do comportamento que uma variável exerce sobre outras variáveis, que nem sempre são medidas concomitantemente em experimentos no campo (HAIR et al., 2005).

De acordo com CAZAR (2003), a análise de componentes principais e a análise de agrupamento hierárquico são técnicas de análise multivariada com fundamentos teóricos bem diferentes, podendo ser aplicadas independentemente. Estas técnicas podem até ser complementares na informação sobre o conjunto de dados, dependendo do sistema analisado. Ambas fornecem a visão mais global possível das amostras dentro do conjunto de dados, conforme as variáveis usadas.

A análise de componentes principais reduz a quantidade de variáveis originais num conjunto menor, preservando o máximo da variabilidade original. Esta técnica cria eixos ortogonais, que são combinações lineares das variáveis originais, partindo dos autovalores da matriz de covariância das variáveis consideradas. Os dois maiores autovalores geram os dois primeiros componentes principais, que agregam maior quantidade de variabilidade que qualquer um dos outros componentes. Em síntese, a análise dos componentes principais tem por objetivo obter um pequeno número de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação nelas contida (JOHNSON & WICHERN, 1992).

A análise de agrupamento é uma técnica multivariada cuja finalidade primária é agregar objetos com base nas características que eles possuem. Os agrupamentos resultantes exibem elevada homogeneidade interna e elevada heterogeneidade externa. Ela é utilizada quando se deseja explorar as similaridades entre os indivíduos (modo Q), ou entre as variáveis (modo R), definindo-se grupos que consideram simultaneamente, no primeiro caso, todas as variáveis observadas em cada indivíduo e, no segundo, todos os indivíduos nos quais foram feitas as medidas (HAIR et al., 2005).

A análise de agrupamento utiliza métodos hierárquicos e não-hierárquicos, ambos são não supervisionados e extraem propriedades estatísticas de um conjunto de dados, agrupando os vetores similares em classes. O K-means é um método não-hierárquico bastante utilizado que classifica objetos em número predefinido de grupos. A medida de similaridade usada entre os vetores de médias dos grupos pode levar a diferentes formações quanto à composição e ao número de objetos dentro de cada grupo. Assim, a escolha dessa medida deve observar critérios, sendo a distância euclidiana um dos mais utilizados, por ser uma métrica completa (HAIR et al., 2005).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Locais de condução do experimento**

A colheita das amostras de conteúdo ruminal para a separação das arqueias metanogênicas aderidas às partículas sólidas bem como a mensuração do gás metano e análise da digestibilidade *in vitro* dos tratamentos foram conduzidas na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos, Departamento de Zootecnia, e as análises do DNA metagenômico foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), Departamento de Biologia Aplicada, Campus de Jaboticabal. As análises dos ácidos graxos voláteis foram feitas no Laboratório de Análises de Nutrição Animal (LANA), também pertencente ao Departamento de Zootecnia da UNESP/Jaboticabal.

#### **3.2. Manejo alimentar e colheita das amostras de conteúdo ruminal**

Foram alojados em baias experimentais quatro animais mestiços ½ Angus - ½ Nelore (AN), canulados no rúmen (Figura 5), que receberam um tipo de tratamento cada um. Um animal recebeu 70% de feno e 30% de concentrado (70Fe:30C) (T1), outro animal recebeu 30% feno e 70% de concentrado (30Fe:70C) (T2), outro recebeu 70% de silagem e 30% de concentrado (70Si:30C) (T3) e outro recebeu 30% de silagem e 70% de concentrado (30Si:70C) (T4). A oferta de alimentos ocorreu nos períodos da manhã e da tarde, sendo que as sobras nos cochos foram controladas para não ultrapassarem 10%.

Os volumosos oferecidos aos animais foram feno de capim Tifton 85 moído e silagem da planta inteira do milho, picada. A silagem de milho foi armazenada num silo tipo trincheira ou de superfície, devidamente protegido. A dieta com 70% de volumoso foi fornecida no cocho misturada ao concentrado constituído por farelo de girassol, polpa cítrica e suplemento mineral (ortofosfato bicálcico associado a outras fontes minerais nas formas orgânicas e inorgânicas) e a dieta com 30% de volumoso foi oferecida misturada ao concentrado composto por farelo de girassol, polpa cítrica,

casca de soja e suplemento mineral. Todos os alimentos concentrados que estavam na forma de pélete, foram moídos. Na Tabela 1 encontra-se a composição bromatológica dos ingredientes utilizados nas rações onde se avaliou os volumosos feno de Tifton 85 e silagem de milho nas relações 30V:70C e 70V:30C. Também são apresentadas as composições percentuais das rações.



**Figura 5.** Animais em baias experimentais.

Houve um período de adaptação de 12 dias, sendo que no 13º dia foi realizada a medição da produção de gás e leitura do metano dos quatro tratamentos e no 15º dia, foi efetuada a colheita do conteúdo ruminal para o isolamento microbiano dos tratamentos compostos por feno e silagem de milho.

### **3.3. Análises laboratoriais relacionadas à nutrição animal**

#### **3.3.1. Mensuração dos gases**

A metodologia utilizada para a mensuração quantitativa e qualitativa dos gases produzidos pela fermentação *in vitro* do líquido ruminal dos bovinos foi feita de acordo com GASTALDI (2003). O método consiste basicamente em três etapas: 1) colheita do conteúdo ruminal e preparo da solução a ser fermentada; 2) produção e armazenamento dos gases gerados no processo fermentativo; 3) análises quantitativas e qualitativas do gás produzido. A Figura 6 apresenta de forma

simplificada a mensuração dos gases produzidos na fermentação pelos bovinos. O esquema da metodologia foi baseado no aparato para mensuração da produção de gás citado por OSCAR et al. (1987) e no aparato para determinação experimental da produção de gás em fezes submetidas à fermentação anaeróbia (biodigestor). As colheitas de conteúdo ruminal foram realizadas no período da tarde, antes da segunda refeição do dia, com o auxílio de uma bomba à vácuo e um kitassato com 2 L de capacidade.

**Tabela 1.** Composição bromatológica dos ingredientes utilizados nas rações contendo feno de Tifton 85 e silagem de milho como volumosos

	MS %	Componentes			
		PB	MO %MS	FDN	FDA
<b>Feno de Tifton 85</b>	90,13	8,77	93,14	83,52	55,38
<b>Silagem de milho</b>	91,80	10,32	96,25	58,12	56,51
<b>Volumoso 30 %</b>	89,26	15,63	92,29	48,97	49,91
<b>Volumoso 70 %</b>	89,07	13,79	89,66	56,02	50,88

	Composição percentual das rações	
	Vol30	Vol70
<b>Feno/Silagem</b>	30,0	70,0
<b>Polpa de citros</b>	35,2	14,2
<b>Casca de soja</b>	19,0	-
<b>Farelo de girassol</b>	15,0	15,0
<b>Supl. mineral</b>	0,8	0,8
<b>Total</b>	100,0	100,0

Supl. = suplemento, MS = matéria seca; MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido

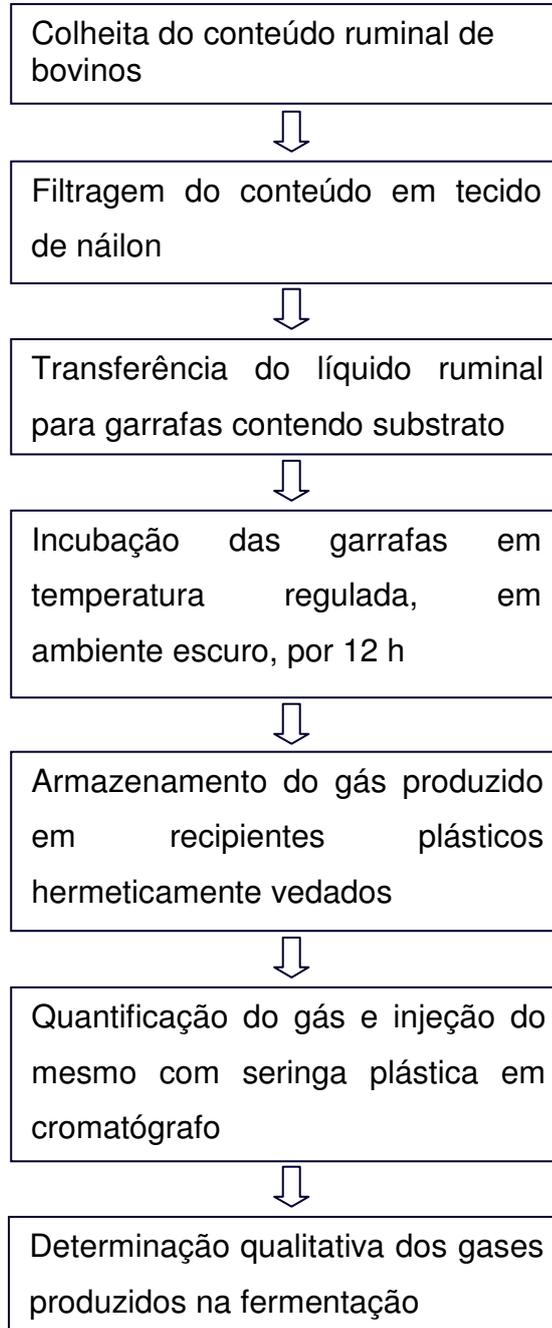
Depois de colhido, o conteúdo ruminal foi filtrado em tecido de náilon com malha de 100 µm, e a seguir foram medidos 800 mL em uma proveta, transferidos para garrafas de vidro de cor âmbar, com capacidade para 1 L. Para cada tratamento foram utilizadas cinco garrafas e em cada uma delas foram colocados 10 g de substrato a ser avaliado. Como controle foi utilizado uma garrafa contendo apenas conteúdo ruminal.

No tratamento com 70% de feno foram adicionados 7 g de feno acrescentado de 3 g de concentrado e no tratamento com 30% de feno, foram colocados 3 g de feno mais 7 g de concentrado. O mesmo procedimento foi adotado para os tratamentos contendo silagem de milho. As garrafas permaneceram incubadas por

12 h em temperatura regulada para 39,5°C, em ambiente escuro. A avaliação da relação  $\text{CO}_2:\text{CH}_4$ , que relaciona as atividades microbianas totais ( $\text{CO}_2$ ) com as atividades microbianas metanogênicas ( $\text{CH}_4$ ), sugere que a ausência de diferença entre 24 e 48 horas não justifica que o período de incubação seja superior a 24 horas quando se deseja avaliar as produções de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  em sistemas *in vitro*. Foi verificado que a relação  $\text{CO}_2:\text{CH}_4$  é maior após três horas de fermentação do que após 24 ou 48 horas e que não existe diferença entre as últimas (SMACCHIA et al., 2000). Com base nessas considerações e na frequência de alimentação dos animais (duas refeições diárias, com intervalos aproximados de 12 horas entre elas), o tempo de incubação de 12 horas foi estabelecido.

O gás produzido foi conduzido para recipientes plásticos adaptados (garrafas tipo “pet”), onde ficou armazenado até o término das 12 h de incubação do substrato (Figura 7). Após o término do período de fermentação, com os recipientes plásticos para armazenamento de gases colocados na posição vertical, uma marca foi feita em cada um destes no local onde ocorria o encontro com a água. Esta marca serviu para determinar a quantidade de gás que havia antes do esvaziamento para a avaliação qualitativa. Esta determinação foi efetuada preenchendo o recipiente plástico com água até atingir a marca e mensurando, com auxílio de uma bureta, a quantidade de água necessária para isso, em mililitros. O gás armazenado no recipiente plástico foi transferido para uma seringa (50 mL) e após a injeção de gás em um cromatógrafo Finigan GC 9001 (Figura 8) foram feitas as determinações qualitativas (proporções molares) dos gases produzidos na fermentação. A quantidade de gás injetada no cromatógrafo, por amostra, foi equivalente a 20 mL.

### Produção de gases



**Figura 6.** Esquema para mensuração dos gases produzidos durante a fermentação ruminal de bovinos.



**Figura 7.** Garrafas com líquido ruminal colocadas em banho com temperatura controlada e os recipientes adaptados para o armazenamento de gás produzido.



**Figura 8.** Cromatógrafo gasoso e seringa plástica contendo a amostra de gás a ser injetada.

O conhecimento da produção total de gás e das características qualitativas do mesmo (proporção molar de cada gás) possibilitaram determinar as quantidades proporcionais do gás produzido em cada tratamento. O cálculo envolveu também a porcentagem do gás metano no cilindro padrão utilizado na leitura do cromatógrafo, que foi de 54,950 %.

No momento das mensurações do total de gás produzido (em volume), foram determinadas também a pressão destes (em milímetros de coluna de água) e a temperatura ambiente (em K), objetivando calcular os volumes dos gases nas Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP), conforme descrito abaixo e citado por CAETANO (1985):

$$P_0 V_0 T_0^{-1} = P_1 V_1 T_1^{-1}:$$

$V_0$  = volume corrigido do biogás, em  $m^3$ ;

$P_0$  = pressão corrigida do biogás (10332,27 mm  $H_2O$ );

$T_0$  = temperatura corrigida do biogás (273,15 K);

$V_1$  = volume de biogás nas condições de leitura (0,5 mL);

$P_1$  = pressão do biogás no gasômetro (em mm  $H_2O$ ) e;

$T_1$  = temperatura local no instante da leitura (em K).

Nesta metodologia o volume de gás produzido na fermentação foi mantido à pressão praticamente constante, pois, entende-se que uma alteração na pressão pode resultar na variação dos resultados experimentais, tanto quantitativos como qualitativos.

Para expressar os resultados em número de mol de metano, foi utilizada a equação universal dos gases, conforme descrito por METCALF & EDDY (2003):

$$PV = NRT:$$

$P$  = pressão absoluta (1 atm)

$V$  = volume do biogás em mL

$N$  = número de mol

$R$  = constante universal dos gases (0,082057 atm L (mol K) $^{-1}$ )

$T$  = temperatura (273,15 K)

### 3.3.2. Incubação ruminal *in situ*

As análises da incubação ruminal *in situ* dos alimentos foram desenvolvidas para se avaliar o teor de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) dos alimentos. A partir dos dados provenientes dessa incubação, foram desenvolvidas planilhas laboratoriais referentes à determinação de MS, MO, PB e fibras (FDN e FDA) dos alimentos e dos resíduos não degradados dos tratamentos com diferentes concentrações de feno e silagem.

Para que as interpretações do metano fossem complementadas, foi necessário quantificar o desaparecimento ruminal da ração em 12 h para que se pudesse avaliar as diferenças fermentativas de acordo com as proporções V:C, além daquelas possíveis associadas ao tipo do volumoso (feno de Tifton 85 ou silagem de milho). Para isso foram utilizados sacos de náilon 100% poliamida, com poros de 50 µm, com área disponível correspondendo a 7 x 14 cm contendo aproximadamente 5 g de matéria seca de forma a proporcionar 20 mg MS/cm<sup>2</sup>.

O feno e a silagem de milho usados no ensaio de degradabilidade foram moídos em peneira com perfurações de 5 mm de diâmetro. Os concentrados foram moídos a 2 mm. O tempo de incubação das amostras no rúmen foi de 12 h com os sacos de náilon inseridos no rúmen, presos à corrente de ferro. Em seguida, os sacos de náilon foram lavados em água fria corrente para a retirada de conteúdo ruminal e mergulhados por 30 minutos em água com gelo para interromper a atividade microbiana. Após a limpeza, os sacos contendo os resíduos não degradados no rúmen foram secos em estufa com circulação e renovação de ar à temperatura de 55°C por 72 h. Os resíduos foram pesados após estarem secos e em equilíbrio com a temperatura ambiente.

Os ingredientes e os resíduos não degradados no rúmen foram amostrados, secos e moídos a 1 mm para a determinação dos teores de matéria seca e matéria orgânica conforme a técnica descrita por SILVA & QUEIROZ (2002). Os teores de proteína bruta foram obtidos pela multiplicação de N pelo fator 6,25, a partir do método do micro-kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC, 1995). A fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas utilizando as soluções descritas por VAN SOEST (1967)

sendo a digestão submetida a controle de temperatura e pressão em autoclave por 60 min a 0,5 atm e 111 °C (adaptados de PELL & SCHOFIELD, 1992).

### 3.3.3. Determinação dos AGCC

Os AGCC foram determinados utilizando-se um cromatógrafo a gás modelo CG 270 (Figura 9). Uma alíquota de 1mL de conteúdo fermentado nas garrafas após o período de 12 h, foi centrifugada por 10 min a 10621 x g à temperatura ambiente. Coletou-se 0,5 mL do sobrenadante e após filtragem do conteúdo usando filtro Millipore foram adicionados 100 µL de ácido fórmico. Foi injetado no cromatógrafo aproximadamente 1 µL de amostra. As amostras foram analisadas segundo ERWIN et al. (1961), para AGCC medidos em concentração molar (mM). A determinação da área de cada amostra foi efetuada com repetição para que a diferença não ultrapassasse 5%.

Os gases utilizados foram o nitrogênio, como gás de arraste na vazão de 25 mL/min, oxigênio, como gás comburente na vazão de 175 mL/min e hidrogênio, como gás combustível na vazão de 15 mL/min. As temperaturas utilizadas para operação foram do vaporizador 240°C, da coluna de separação iniciou-se com 175 °C aumentando 10°C por min até 205°C e do detector de ionização de chamas 260°C. Soluções padrão a 0,1 N de ácido acético, propiônico e butírico, foram preparadas e padronizadas com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 N, a fim de produzir solução padrão de AGCC de concentração conhecida.



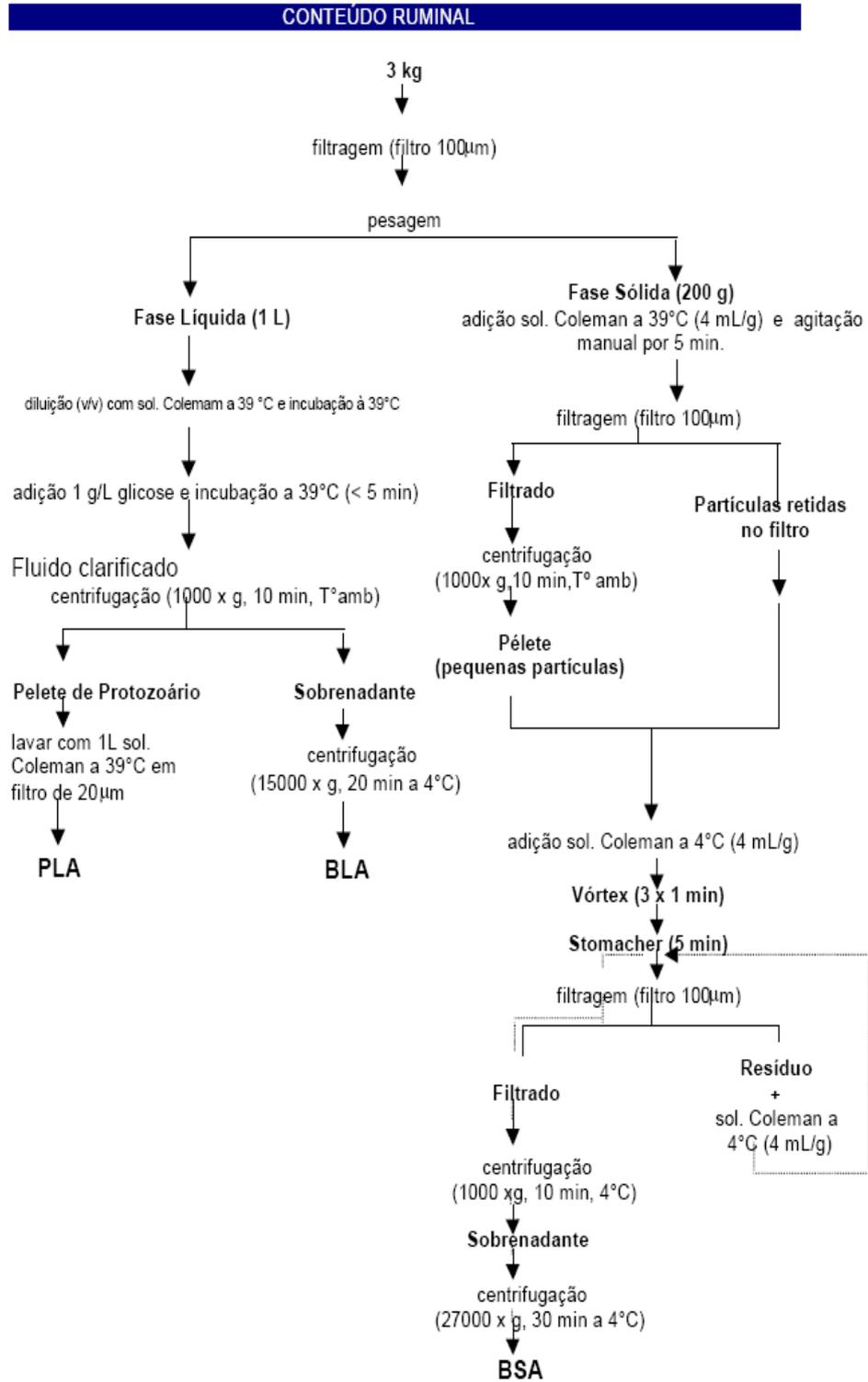
**Figura 9.** Cromatógrafo a gás para determinação de AGCC.

### 3.3.4. Identificação da fase sólida

As arqueias sólido-aderidas foram separadas de acordo com a metodologia proposta por Merry & McCallan (1983) citados por MARTIN et al. (1994), com modificações, conforme esquema apresentado na Figura 11. O conteúdo ruminal foi colhido três horas após a alimentação do animal pela manhã. Com o auxílio de uma bomba à vácuo foram retirados do rúmen dos animais aproximadamente 1 L de conteúdo ruminal e após filtragem em filtro de náilon de 100  $\mu\text{m}$ , o sólido foi pesado e colhida uma amostra de 200 g de material. Em seguida, esta amostra foi lavada e agitada manualmente por 5 min em um frasco com solução tampão salina (COLEMAN, 1978), pré-aquecida a 39°C (1g de material fresco/4 mL da solução). Foi realizada uma nova filtragem em filtro de náilon de 100  $\mu\text{m}$  e o filtrado foi centrifugado a 1000 x g, por 10 min, à temperatura ambiente. Fragmentos maiores foram combinados a partículas pequenas e suspensos em tampão (1 g de sólido/4 mL) pré-resfriado a 4°C e homogeneizados. O sólido foi bombeado por 5 min em um “Stomacher” (Figura 10) construído na própria universidade. O homogeneizado foi filtrado em filtro de náilon de porosidade 100  $\mu\text{m}$ . O resíduo sobre o filtro foi lavado com solução tampão (1 g de sólido/4 mL) e novamente filtrado. Os filtrados contendo a população aderente foram agrupados e centrifugados a 1000 x g, por 10 min a 4°C, para o descarte do resíduo alimentar e a fração sobrenadante foi centrifugada a 27000 x g por 30 min a 4°C. O sedimento resultante correspondeu aos microrganismos sólido-aderidos (EZEQUIEL et al., 2002).



**Figura 10.** Conteúdo ruminal sendo depositado no interior do stomacher.



**Figura 11.** Esquema da separação das frações microbianas no conteúdo ruminal de bovinos (EZEQUIEL et al., 2002).

### 3.4. Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foram testados dois protocolos. O primeiro foi feito segundo HENSIEK et al. (1992), com algumas modificações. Um volume de 0,7 g de arqueias sólido-aderidas foi colocado em tubos eppendorf (2 mL) e centrifugado 600 x g, por 10 min a 4°C. Em seguida, foi adicionado igual volume de solução tamponada contendo fenol e Tris –HCl (10 mM) com pH 8,0. Adicionou-se também 0,5 g de “glass beads” e 20 µL de SDS (20%). Os tubos foram agitados três vezes por 2 min e colocados no gelo por 2 min entre cada agitação. A seguir a solução foi centrifugada por 1200 x g durante 5 min. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e precipitada com etanol. As amostras foram tratadas com RNAse e novamente extraídas com fenol tamponado e precipitadas em etanol. O pélete final foi ressuscitado em 100 µL de H<sub>2</sub>O estéril.

O outro protocolo foi feito baseado na metodologia de AUSUBEL et al. (1999), também com modificações. O pélete de arqueias sólido-aderidas foi ressuscitado em 700 µL de tampão de quebra contendo triton a 1%, SDS 1%, NaCl 10 mM, Tris (89 mM ) com pH 8,0 na concentração de 10 mM e EDTA 1 mM. A amostra foi depositada em um almofariz e após a adição de N<sub>2</sub> líquido, houve a maceração da mesma. A maceração foi repetida duas vezes e o material foi transferido para tubos eppendorf de 2 mL onde foram adicionados 500 µL de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 5:4:1. Após agitação durante 3 min, foram adicionados 200 µL de tampão TE (10:1). O material foi centrifugado por 5 min a 15294 x g a temperatura ambiente e a fase aquosa transferida para outro tubo. Após a adição de 1 mL de etanol absoluto foi feita mistura por inversão. Depois de centrifugado 3 min a 15294 x g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o pélete ressuscitado em 400 µL de TE. Foram adicionados 20 µL de RNAse (10 mg/mL) e em seguida foi feita incubação por 20 min a 37°C. Após adição de 1 mL de etanol absoluto centrifugação por 3 min a 15294 x g, o DNA foi ressuscitado em 100 µL de TE.

A concentração de DNA das amostras foi estimada em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal modelo HORIZON 11-14, em tampão TBE 1 X adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 1 h à

voltagem constante de 75 V. Uma alíquota de 4  $\mu$ L de DNA adicionada de 3  $\mu$ L de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) foi aplicada no gel assim como uma amostra de DNA contendo fragmentos de tamanho conhecido, múltiplos de 1kb (Fermentas). Os géis foram visualizados e documentados por meio de um sistema de documentação de géis (GEL DOC 2000 BIO-RAD). A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro Beckmann DU 640, sendo a leitura realizada nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm e a relação 260/280 foi calculada para caracterizar a pureza do DNA.

#### **3.4.1. Purificação do DNA em filtro microcon 100 ( Millipore)**

O processo de purificação do material genético foi feito de acordo com as orientações do fabricante. Foram colocados 12,5  $\mu$ L de Tris-HCL (1M, pH 7,5) e 400  $\mu$ l de TE (Tris EDTA, 10:1 pH 7,5) em um tubo eppendorf. A seguir foi feita homogeneização e adicionados 80  $\mu$ L de solução contendo o DNA. O material foi transferido para o filtro e logo após foi feita centrifugação a 6797 x g por 15 min. Foram adicionados 200  $\mu$ L de TE ao filtro e a seguida foi feita nova centrifugação a 6797 x g. Foram depositados mais 50  $\mu$ L de TE ao filtro e mais uma vez foi realizada centrifugação a 6797 x g por 10 min. Na etapa final, o DNA precipitado foi ressuspenso em 30  $\mu$ L de TE e armazenado à -20°C.

#### **3.5. Reações em cadeia da polimerase (PCR)**

Após as etapas de otimização das reações de PCR com as sequências estudadas, foi determinada a seguinte reação para a região 16S rDNA: 200 ng de DNA amplificados em uma reação contendo tampão *Taq* DNA polimerase 1 X (Invitrogen) cloreto de magnésio 6,0 mM, 0,1 mM de dNTP, 50 pmol de cada primer e 1 U de *Taq* DNA polimerase e água MILLI-Q autoclavada para completar um volume final de 20  $\mu$ L da reação (WHITFORD et al., 1998). Para as regiões das ORFs foi feita a mesma reação com a diferença que a concentração de DNA utilizada foi de 100 ng. Uma alíquota desta reação contendo apenas água foi usada

como controle negativo. No estudo das ORFs, para as ampliações feitas com o DNA proveniente dos quatro tratamentos foi adicionado como controle positivo o DNA da arqueia *M. maripaludis*, gentilmente cedido pelo departamento de microbiologia da Universidade de Washington.

As sequências de oligonucleotídios iniciadores utilizadas para a amplificação do gene da subunidade ribossomal 16S rDNA foram feitas de acordo com EMBLEY (1992) e podem ser encontradas na Tabela 2. Nesta tabela também se encontram os oligonucleotídios iniciadores correspondentes às sequências das ORFs codificadoras da enzima CHO-MFR (Mmp 1244, Mmp 1249, Mmp 1691, Mmp 0200, Mmp 0508 e Mmp 0512), “construídos” com base no genoma da *Methanococcus maripaludis* e anotados nos bancos de dados (National Center for Biotechnology Information - [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) e (Kyoto Enciclopédia of Genes and Genomes - [www.genome.ad.jp/Kegg](http://www.genome.ad.jp/Kegg)), utilizando-se como ferramenta de trabalho o ClustalW (THOMPSON, et al., 1994). A partir desta análise foram desenvolvidos os oligonucleotídeos específicos usando os softwares GeneRunner 2.5 e Oligo 4.0.

Para amplificação da região 16S rDNA, a reação foi submetida à seguinte sequência de termo ciclos: 94°C por 5 min; 95°C por 1 min; 51°C por 2 min; 72°C por 3 min; 35 vezes o passo 2; 72°C por 10 min e 4°C para temperatura de refrigeração das amostras (HALES et al., 1996). A amplificação das regiões das ORFs foi realizada em outras condições: 94°C por 10 min; 94°C por 20 s; 50°C por 1 min; 72°C por 1 min; 30 vezes o passo 2; 72°C por 10 min e 4°C para temperatura de refrigeração das amostras (WHITFORD et al., 1998) A visualização dos fragmentos amplificados pela PCR foi realizada a partir de eletroforese em géis de agarose à 1,5% em cuba horizontal modelo HORIZON 11-14, usando tampão TBE 1X e como padrão de tamanho molecular foi usado 1 kb DNA “Ladder” (Fermentas); as eletroforeses foram conduzidas à voltagem constante de 75 V, por 1,5 h. Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e documentados em um equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 Bio-Rad) pelo software Quantity-One.

### 3.6. Purificação do DNA amplificado

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação da região 16S rDNA apresentaram-se puros não sendo necessária a realização do processo de eluição do DNA do gel de agarose. Entretanto, para os produtos de amplificação das ORFs foi preciso fazer a eluição em gel de agarose a partir da utilização do Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Após a eluição dos fragmentos do DNA amplificado do gel de agarose 0,8%, foram pesados 0,4 g deste material e a seguir foram adicionados 30  $\mu$ L de tampão de solubilização (GS1, acetato de sódio), para cada 10 mg de gel de agarose. Os tubos plásticos contendo os fragmentos foram incubados a 50°C durante 15 min, sendo agitados levemente a cada 3 min para melhor solubilização do gel. O conteúdo foi distribuído em colunas de filtração e centrifugado a 12000 x g por 1 min e em seguida foram acrescentados 700  $\mu$ L de tampão de lavagem (Wg) contendo etanol. Após incubação a temperatura ambiente por 5 minutos o material foi centrifugado a 12000 x g, por 1 min e ressuspenso em 50  $\mu$ L de TE Buffer a temperatura de 65°C.

### 3.7. Clonagem e Reação de ligação

Os fragmentos da PCR dos produtos de amplificação da região 16S rDNA foram clonados no sistema I de vetor pGEM-Teasy (Promega) seguindo as instruções do fabricante. As reações de ligação foram realizadas da seguinte maneira: 1  $\mu$ l de tampão de ligação rápida T4 DNA ligase 1X (30 mM Tris-HCl, pH 7,8); 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 5% de polietilenoglicol (PM 8000); pGEMR-T (50 ng); T4 DNA ligase (3 U); produto da PCR (150 ng); água milli-Q esterilizada por filtração para completar o volume final para 10  $\mu$ l.

**Tabela 2.** Sequências nucleotídicas dos iniciadores específicos utilizados para a amplificação de genes e de ORFs correspondentes às arqueias metanogênicas do rúmen

Genes/ORFs	Pares de base (pb)	Sequências de bases
<b>16S rRNA</b>	1100	5'-TCYGKTTGATCCYGSCRAG -3' 5'- TGGGTCTCGCTCGTTG -3'
<b>Mmp 1244</b>	400	5` CATCTCCCATTATTTACACGG3` 5`AGCACCAACAGGACATTTCG 3`
<b>Mmp 1249</b>	600	5`GGAGTCGAAATGAAAGGC3` 5`TTGTGTTTACGTAGTCTTCCG 3`
<b>Mmp 1691</b>	1200	5` TTCTGTGGGACTCTTTGCG 3` 5` AGATGATGGAGTTTCGTGAG 3`
<b>Mmp 200</b>	600	ATTTACGGGCATTTAAG3` 5`AAAGATTCACCACAAAGCC3`5`
<b>Mmp 508</b>	500	5` TTTGGACTTGGTTGAGGAC 3` 5` TGCTACAACACCGATAAATTC 3`
<b>Mmp 512</b>	1200	5` TAGTATGCCCTGTTTGCG 3` 5` TGTTCCATTGTATCCTCATTG 3`

Como controle positivo foi usado um DNA contendo o inserto (fornecido pelo fabricante) e um controle negativo sem a presença de inserto de DNA, para determinar a eficiência da ligação. As reações foram homogeneizadas e incubadas durante a noite num termociclador à temperatura constante de 4°C, para obtenção de uma maior eficiência de ligação.

### 3.7.1. Transformação das células competentes

As células competentes de *E. coli* DH10b foram previamente removidas do freezer -80°C e descongeladas em imersão no gelo por aproximadamente 5 min antes de serem utilizadas. As células (50 µL) foram depositadas cuidadosamente em um tubo de 1,5 L junto com 2 µL do vetor obtido pela ligação e o mesmo foi feito com o material de controle positivo e negativo. Todos os tubos foram mantidos em gelo por 20 min e em seguida colocados em banho com temperatura controlada à 42°C por 50 s e imediatamente imersos no gelo por 2 min.

Aos tubos foi adicionado 1 mL de meio SOC e estes foram incubados durante 2,5 h, a 37°C, com agitação de 180 rpm. O meio SOC foi preparado do seguinte modo: 20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,5 g de NaCl e 0,19 g de KCl foram adicionados a um volume total de água de 1000 mL, pH 7. O meio foi autoclavado a 120°C, por 20 min. Foram adicionadas ao meio uma solução de 2% de glicose 1 M e 1% de MgCl<sub>2</sub> 1 M, esterilizadas por filtração.

Aos clones transformados e crescidos em meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de agar, pH 7) foi adicionada Ampicilina, esterilizada por filtração, com concentração final de 100 µg/mL. Após a solidificação do meio, 100 µL de X-GAL (5% em N,N-dimetil formamida) foram espalhados sobre a superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. As placas foram mantidas a 37°C até o momento do uso.

Após incubação das células transformadas em meio SOC, 100 µL de cada cultura foram espalhados nas placas de petri com o meio LB. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h e, após este período, foi realizada a seleção das colônias brancas (células transformadas).

### **3.7.2. Seleção e estoque dos clones**

Os clones foram coletados com palitos esterilizados e cultivados em 150 µL de meio CG (CircleGrow, B10101) contendo Ampicilina (100 mg/mL) durante 22 h, a 37°C. Após esse período foram adicionados a cada clone cultivado 150 µL de glicerol 40 % para posterior estoque a -80°C.

## **3.8. Sequenciamento**

### **3.8.1. Extração do DNA plasmidial**

A extração do DNA plasmidial foi realizada de acordo com metodologia de SAMBROOK & RUSSEL, 2001. Os clones estocados foram cultivados em multiplacas "Mega Titer" contendo 1 mL de meio CG adicionado de Ampicilina (100

µg/ml) durante 22 h, a 37°C, com agitação de 200 rpm.

As placas com os clones cultivados foram centrifugadas por 8 min a 4°C, com velocidade de 3220 x g, os sobrenadantes foram descartados e as placas invertidas e secas em papel absorvente durante 10 min. Os sedimentos bacterianos obtidos foram lavados com 240 µl de tampão GTE (Glicose 50 mM; Tris 25 mM, pH 8,0; EDTA 10mM, pH 8,0) e em seguida, estes foram centrifugados por 6 min, a 4°C, a 3220 x g; os sobrenadantes descartados e as placas novamente secas por inversão em papel absorvente, durante 10 min. As células foram ressuscitadas por “vortex” em 85 µL de uma solução GTE/RNase (80 µL de solução GTE acrescida de 5 µL de solução de RNase).

Uma solução de RNase (10 mg/ml) foi preparada contendo 40 mg de RNase dissolvidos em 4 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 com 15 mM de NaCl. Essa solução foi mantida em banho-maria fervente durante 10 min para inativar a DNase, e em seguida, estocada em alíquotas a - 20°C.

Foram transferidos 60 µL das suspensões bacterianas para uma microplaca de 250 µL e a elas adicionados 60 µL de solução de lise (NaOH 0,2N; SDS 1%). As placas foram seladas, as soluções misturadas por inversão 10 vezes e incubadas por 10 min, à temperatura ambiente. Após a lise, 60 µL de uma solução de acetato de potássio 3 M, pH 4,8 gelado foi adicionado às suspensões. As placas foram seladas, as soluções misturadas por inversão por 10 vezes e novamente, as placas foram incubadas por 10 min, a temperatura ambiente. Os seladores foram removidos, as placas incubadas por 30 min em estufa a 90°C, resfriadas em gelo por 10 min, seladas e centrifugadas durante 8 min, a 20°C a 3220 x g.

Aproximadamente, 170 µL da solução do lisado foi filtrada em placas “multi screen filter” (millipore), acopladas as microplacas de 250 µL por centrifugação por 6 min, a 20°C, a 3220 x g. O filtro foi removido e 110 µL de isopropanol absoluto foi adicionado ao filtrado. As placas foram seladas, as soluções misturadas por inversão e em seguida, centrifugadas a 20°C por 45 min com rotação de 3220 x g, o sobrenadante descartado e as placas invertidas em papel absorvente para secar. Os sedimentos obtidos foram lavados com 200 µL de etanol 70% e as placas centrifugadas por 5 min, a 20°C e 3220 x g, o sobrenadante foi descartado e as placas secas à temperatura ambiente, por aproximadamente 1 h em fluxo laminar. O

DNA plasmidial assim obtido foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de água milli-Q e quantificado por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

### **3.8.2. Sequenciamento de amplicons**

As reações de PCR foram realizadas em microplacas nas seguintes condições para a amplificação da região 16S rDNA: 2  $\mu$ L de BigDye Terminator (Perkin Elmer); 5 pmoles do oligonucleotídeo; tampão 5 X (400 mM Tris-HCl pH 9; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) e para completar um volume de 10  $\mu$ l; 100 - 150 ng de DNA. Para a PCR de sequenciamento foi utilizado o oligonucleotídeo universal SP6 "forward", cuja sequência foi a seguinte: 5' – ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3'.

Após a purificação dos produtos de amplificação referentes às ORFs foi feita uma nova reação de PCR nas condições de amplificação já descritas anteriormente para estas ORFs, mudando-se apenas a concentração de DNA de 100 para 150 ng. A seguir foi feita a PCR de sequenciamento direta do produto amplificado utilizando-se as mesmas condições da reação de sequenciamento da região 16s rDNA, mas com concentração de 25 -50 ng de DNA .

As placas foram seladas com um adaptador de silicone e levadas ao termociclador (MJ Research, Inv., modelo PTC-100) seguindo o programa: um ciclo a 96°C por 10 s, outro ciclo a 52°C por 5 s, 60°C por 4 min e 34 ciclos repetindo o primeiro passo (96°C por 10 s), seguindo-se uma temperatura de 4°C para manutenção da amostras refrigeradas.

### **3.8.3. Precipitação e lavagem das reações de sequenciamento**

Após a reação de sequenciamento, os fragmentos de DNA amplificados foram precipitados e os dNTP's marcados por fluorescência não incorporados foram retirados por sucessivas lavagens.

Para a precipitação do DNA amplificado e marcado pela PCR de sequenciamento, foram adicionados 80  $\mu$ l de isopropanol 75% às amostras; as placas foram agitadas cuidadosamente em vortex por alguns segundos, incubadas à

temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas a 20°C por 30 min, a 3220 x g. Os sobrenadantes foram descartados e 200 µL de etanol 70% foram adicionados às amostras. As placas foram centrifugadas por 10 min na mesma temperatura e força centrífuga descrita anteriormente, e os sobrenadantes descartados. Após a repetição deste procedimento, as placas foram secas durante 60 min em fluxo laminar sem a presença de luz. Posteriormente as placas foram embrulhadas em filme plástico e acondicionadas a -20°C até o momento de serem aplicadas no seqüenciador.

#### **3.8.4. Preparo da amostra e análise filogenética**

Para a aplicação no seqüenciador, as amostras foram ressuspensas em 10 µL formamida deionizada e agitadas em “vortex”, submetidas à desnaturação por 5 min, a 96°C e, em seguida, colocadas em gelo. Os fragmentos foram seqüenciados em um aparelho de capilar ABI 3100 (Figura12).



**Figura 12.** Sequenciador automático.

Após o sequenciamento das amostras, os dados obtidos foram analisados pelos programas “Sequencing Analysis 3.4” e a qualidade dos eletroferogramas foram analisadas pelos programas Phred (EWING et al., 1998), Phrap (EWING & GREEN, 1998), Consed (GORDON et al., 1998). Os dados foram também analisados pelo programa Contgen.pl para que sequências maiores que 150 nucleotídeos, com qualidade Phred superior ou igual a 20, pudessem ser analisadas. Posteriormente, as sequências selecionadas foram submetidas ao programa BLAST - “Basic Local Alignment Search Tool”, (ALTSCHUL et al., 1997), comparando as sequências obtidas com as depositadas no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI), que possui dados de todos organismos sequenciados mundialmente. Assim foi verificada a identidade do material sequenciado por meio do grau de similaridade com as sequências do GenBank. A lista de sequências depositadas no NCBI database pode ser encontrada no link <http://lbmp.fcav.unesp.br/rumen>.

As sequências foram comparadas também no Ribossomal Database (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>) conferindo a similaridade com o banco 16S rDNA. Uma árvore filogenética foi construída para averiguar o grau filogenético entre os microrganismos metanogênicos. Como ferramentas para as análises estatísticas foram utilizados os softwares MEGA (TAMURA et al., 2007) e DOTUR (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005). Para estimar o número de possíveis gêneros por meio do programa DOTUR, foram verificados agrupamento a 97%, 95% e 90% de similaridade de sequência. Foram calculadas distâncias entre as sequências conhecidas das desconhecidas para fazer comparação das sequências 16S rDNA. Essas comparações foram aproximadamente, em valores de distâncias de 0.03 para diferenciar espécie, 0.05 para gênero e 0.10 para família.

As linhagens de arqueias utilizadas neste trabalho como padrão de referência estão descritas a seguir, com seus respectivos números de acesso aos principais bancos de dados: *Halobacterium halobium* (M11583), *Methanobrevibacter smithii* (AF054208), *Methanobacterium bryantii* (M59124), *Methanosarcina mazei* (U20151), *Methanococcoides burtonii* (X65537), *Methanlobus taylorii* (U20154), *Methanomicrobium mobile* (M59142) e *Methanosphaera stadtmanae* (M59139) (WHITFORD et al., 2001).

### 3.9. Análises estatísticas

#### 3.9.1 Análise estatística multivariada

As técnicas estatísticas multivariadas foram realizadas para avaliar a estrutura multivariada contida nos dados originais. Neste trabalho foram aplicadas as técnicas análise de agrupamentos hierárquica e não hierárquica e análise de componentes principais. As variáveis utilizadas foram relacionadas aos desaparecimentos da matéria seca (DESMS), matéria orgânica (DESMO), proteína bruta (DESPB), fibra em detergente neutro (DESFND), fibra em detergente ácido (DESFDA), à produção dos ácidos graxos voláteis acético (ACE), propiônico (PROP) e butírico (BUT) e à produção *in vitro* dos gases metano (CH<sub>4</sub>), oxigênio (O<sub>2</sub>), nitrogênio (N<sub>2</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>).

A análise de agrupamentos hierárquica foi aplicada aos dados originais de produção dos gases, ácidos graxos voláteis e desaparecimento *in situ* dos alimentos no rúmen. O coeficiente de semelhança adotado foi a medida de dissimilaridade distância euclidiana e como estratégia de agrupamento, o método de Ward. Em complemento, foi processada a análise de agrupamento não hierárquica k-means para k=3.

A análise de componentes principais determina variáveis latentes ortogonais, com centro na região de maior concentração da variabilidade, utilizando para isso, a matriz de covariância dos dados, extraindo dela os autovalores que originam os autovetores (componentes principais) que são combinações lineares das variáveis originais, de tal forma que o sistema ortogonal gerado pelos dois maiores autovalores (primeiro e segundo componentes principais) preserva a maior quantidade das informações originais. Foi avaliado o poder discriminatório de cada

variável pela fórmula:  $r_{x_j}(cp_h) = \frac{a_{jh} \sqrt{\lambda_h}}{s_j}$  onde  $r_{x_j}(cp_h)$  é a correlação entre a variável

$x_j$  e o componente principal  $cp_h$ ,  $a_{jh}$  é o coeficiente da variável  $j$  no  $h$ -ésimo componente principal e  $\lambda_h$  é o  $h$ -ésimo autovalor da matriz de covariância.

Segundo o critério de Kaiser, são considerados os autovalores acima de 1 pois geram componentes com quantidade relevante de informação das variáveis originais. A percentagem da variância total contida em cada componente ( $cp_h$ ) foi

obtida segundo a fórmula:  $cp_h = \frac{\lambda_h}{T(C)} 100$  onde  $T(C)$  é o traço da matriz de covariância ( $\lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_h$ ).

Todas as análises multivariadas foram processadas utilizando-se o módulo Multivariate Exploratory Techniques, pertencente ao software STATISTICA (2004).

As diferenças estatísticas entre os centróides de cada par de grupos foi verificada pelo teste  $T^2$  de Hotelling (MASON et al., 2001) onde  $X_2, \dots, X_p$  avaliadas em duas amostras de tamanho  $n_1$  e  $n_2$  apresentam dois vetores de médias  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$  (centróides) e duas matrizes de covariâncias amostrais  $C_1$  e  $C_2$ , onde as matrizes de covariâncias populacionais devem ser as mesmas para os dois conjuntos e estimada por uma combinação das duas matrizes  $C_1$  e  $C_2$  assim:

$$C = [(n_1 - 1)C_1 + (n_2 - 1)C_2] / (n_1 + n_2 - 2)$$

A estatística  $T^2$  de Hotelling é definida como:

$$T^2 = n_1 n_2 [(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)' C^{-1} (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)] / (n_1 + n_2)$$

Quando  $T^2 > F$ , rejeita-se  $H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$  e admite-se  $H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$  para um valor  $\alpha$  adotado sendo o valor de  $F$  para  $p$  e  $(n_1 + n_2 - p - 1)$  g.l. calculado pela expressão:

$$F = (n_1 + n_2 - p - 1) T^2 / [(n_1 + n_2 - 2) * p]$$

### 3.9.2. Análise estatística univariada

Os tratamentos foram realizados em esquema fatorial 2x2 em um delineamento inteiramente casualizado, considerando que cada bovino recebeu um tipo de tratamento e que todas as análises de alimentos foram feitas com cinco repetições. As análises de variância foram determinadas pelo programa estatístico SAS (DER & EVERIT, 2001) sendo aplicados os testes F e Tukey.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

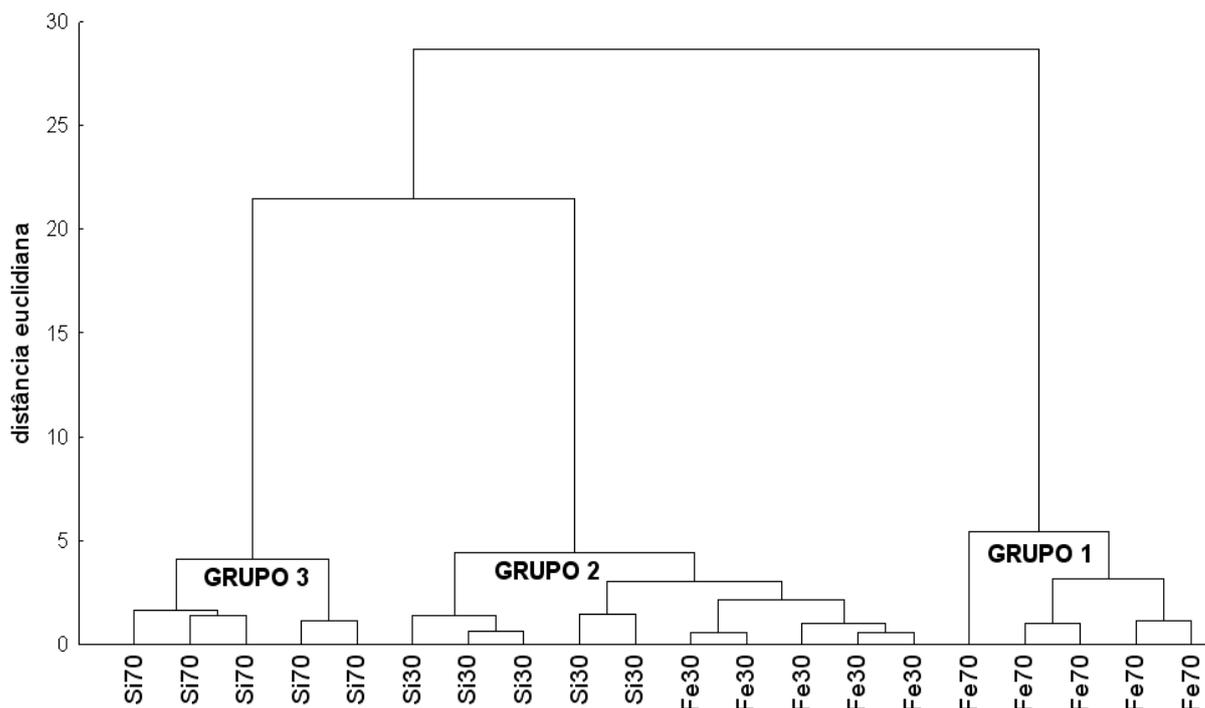
### 4.1. Análises estatísticas

Todas as análises laboratoriais foram efetuadas com cinco repetições e de acordo com PRADO et al. (2001), nos ensaios experimentais realizados para avaliar o consumo de alimentos, eficiência ou conversão alimentar, digestibilidade aparente parcial ou total e composição de alimentos, observa-se a necessidade de se trabalhar com várias repetições de análises bromatológicas (matéria seca, proteína bruta, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, celulose, hemicelulose, cinza insolúvel em ácido, nitrogênio insolúvel em detergente ácido, entre outros) para que os dados obtidos de experimentação em campo ou laboratórios sejam considerados adequados para análises estatísticas.

A estrutura multivariada usando os dados das análises de incubação ruminal *in situ* foi avaliada por análises de agrupamentos utilizando método hierárquico e não hierárquico e componentes principais.

O dendrograma da Figura 13 foi resultante da análise de agrupamentos por método hierárquico e mostrou uma estrutura formada por três grupos: GRUPO 1 contendo amostras com concentração de 70% de feno, GRUPO 2 contendo amostras com concentração de 30% de feno e 30% de silagem e GRUPO 3 contendo amostras com concentração de 70% de silagem.

Nas Tabelas 3 e 4 foram determinadas as médias, desvios-padrão e valores máximos e mínimos dos três centróides dos grupos formados pelo método de agrupamento não hierárquico k-means. O teste  $T^2$  de Hotelling ( $p < 0,01$ ) rejeitou a igualdade dos vetores médios (centróides) entre os três grupos indicando existência de diferenças significativas entre tratamentos nas concentrações de 30% e 70% bem como diferenças significativas entre feno e silagem na concentração de 70%. O grupo 2 agregou amostras de volumosos na concentração de 30%, incluindo tanto amostras de feno como de silagem o que indicou similaridade entre feno e silagem na concentração de 30% confirmado pelo teste  $T^2$  de Hotelling ( $p = 0,09$ ).



**Figura 13.** Dendrograma contendo a estrutura de grupos para feno e silagem nas concentrações de 30% e 70%.

**Tabela 3.** Valores das médias, desvios-padrão e valores máximos e mínimos dos três centróides dos grupos formados pelo método de agrupamento não hierárquico k-means

		DESMS	DESMO	DESPB	DESFDN	DESFDA
<b>Grupo 1 (Fe70)</b>	Média	0,348	0,314	0,494	0,211	0,111
	D_Pad	0,052	0,071	0,031	0,034	0,121
	min	0,338	0,303	0,450	0,193	0,104
	max	0,487	0,508	0,544	0,302	0,436
<b>Grupo 2 (Si30 Fe30)</b>	Média	0,468	0,477	0,531	0,274	0,312
	D_Pad	0,011	0,020	0,006	0,014	0,051
	min	0,455	0,446	0,525	0,254	0,251
	max	0,487	0,508	0,544	0,302	0,376
<b>Grupo 3 (Si70)</b>	Média	0,448	0,455	0,462	0,291	0,424
	D_Pad	0,012	0,015	0,013	0,008	0,011
	min	0,433	0,438	0,450	0,283	0,412
	max	0,465	0,468	0,477	0,299	0,436

D\_Pad - desvio padrão, min - mínimo, max - máximo, DESMS - desaparecimento de matéria seca, DESMO - desaparecimento de matéria orgânica, DESPB - desaparecimento de proteína bruta, DESFDN - desaparecimento de fibra em detergente neutro e DESFDA - desaparecimento de fibra em detergente ácido.

**Tabela 4.** Valores das médias, desvios-padrão e valores máximos e mínimos dos três centróides dos grupos formados pelo método de agrupamento não hierárquico k-means

		ACE	PROP	BUT	CH <sub>4</sub>	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
<b>Grupo 1 (Fe70)</b>	Média	49,664	10,032	3,296	0,456	0,121	0,155	0,085
	D_Pad	4,030	2,754	0,188	0,132	0,029	0,055	0,032
	min	49,110	9,690	3,530	0,181	0,090	0,002	0,036
	max	58,30	16,880	3,060	0,529	0,189	0,213	0,177
<b>Grupo 2 (Si30 Fe30)</b>	Média	49,258	16,578	6,634	0,207	0,106	0,087	0,114
	D_Pad	0,103	0,255	0,658	0,018	0,010	0,042	0,012
	min	49,120	16,140	7,350	0,181	0,090	0,007	0,097
	max	49,430	16,880	5,840	0,230	0,119	0,144	0,134
<b>Grupo 3 (Si70)</b>	Média	58,436	14,612	6,618	0,445	0,166	0,082	0,134
	D_Pad	0,403	0,065	0,510	0,057	0,020	0,060	0,011
	min	57,920	14,510	7,110	0,381	0,142	0,002	0,118
	max	58,930	14,680	5,770	0,507	0,189	0,148	0,145

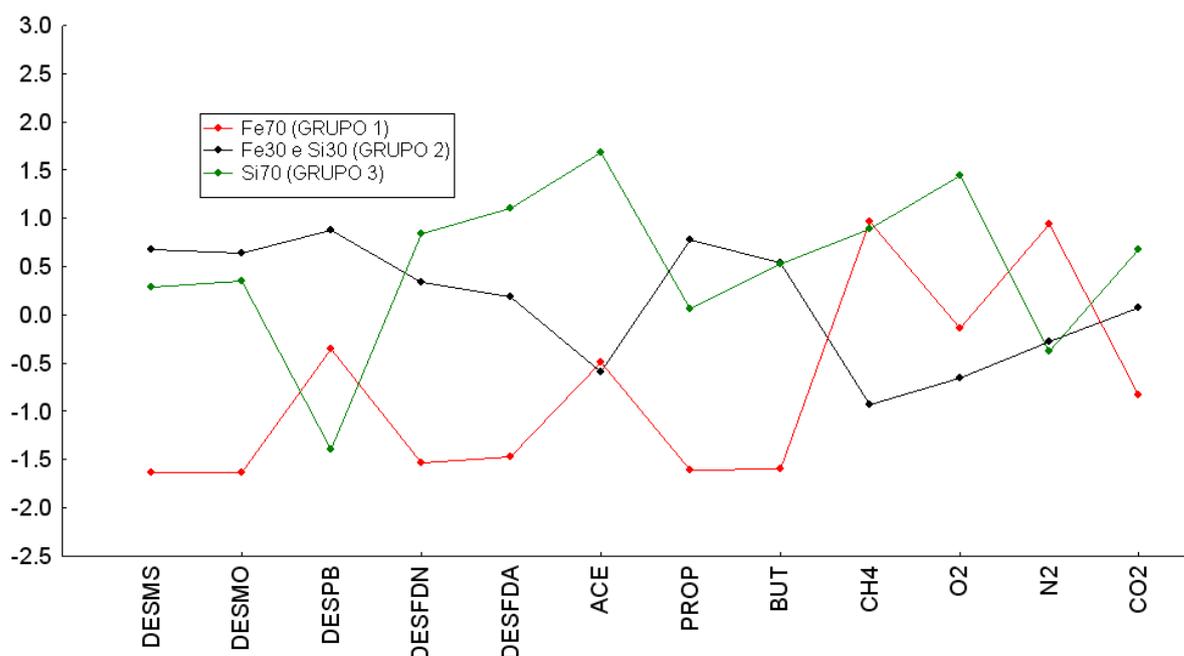
D\_Pad - desvio padrão, min - mínimo, max – máximo, DESMS – desaparecimento de matéria seca, DESMO – desaparecimento de matéria orgânica, DESPB - desaparecimento de proteína bruta, DESFDN - desaparecimento de fibra em detergente neutro e DESFDA - desaparecimento de fibra em detergente ácido.

A análise de agrupamento não hierárquica k-means (Figura 13) confirmou a classificação obtida na análise de agrupamento hierárquica e mostrou que todas as variáveis foram importantes na discriminação dos grupos: DESMS, DESMO, DESPB, DESFDN, DESFDA, ACE, PROP, BUT, CH<sub>4</sub> e O<sub>2</sub> (P<0,01) e N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (P<0,05).

Os resultados das Tabelas 3 e 4, determinaram que o GRUPO 1 (70% de feno) apresentou valores mais baixos para o desaparecimento de MS, MO, FDN e FDA quando comparado com os grupos 2 (30% de feno e silagem) e 3 (70% de silagem) e um valor maior para o desaparecimento da proteína bruta com relação ao GRUPO 3. Estes resultados foram comprovados pela Figura 14 que caracterizou os grupos pela análise do K-means.

O GRUPO 2 obteve maiores valores de desaparecimento da MS, MO e proteína e menores valores de FDN e FDA em relação ao GRUPO 3. Quanto à produção de AGCC, o GRUPO 3 apresentou maior valor para o ácido acético e os grupos 1 e 2 apresentaram valores de médias semelhantes para este ácido, entretanto valores bem maiores de ácido propiônico puderam ser observados no

GRUPO 2. O GRUPO 1 demonstrou valores menores de  $O_2$  e  $CO_2$  em comparação ao GRUPO 3, média maior de  $O_2$  em relação ao GRUPO 2 e menor de  $CO_2$  em relação ao GRUPO 2, entretanto, apresentou valor elevado de  $N_2$  em comparação aos demais grupos.

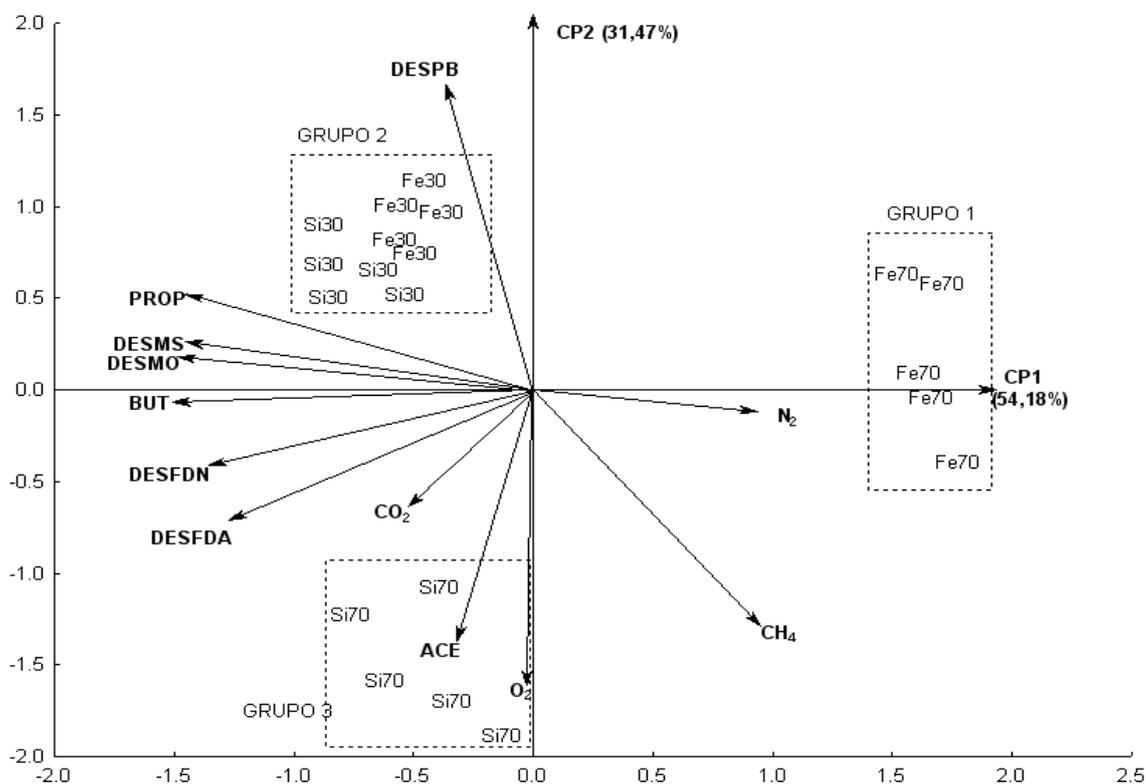


**Figura 14.** Caracterização dos grupos, definidos pela análise K-means, em função das variáveis utilizadas.

A análise de componentes principais permitiu redimensionar o espaço das informações originais em um novo espaço formado por duas variáveis latentes denominadas de componentes principais (CP1 e CP2), criadas por combinações lineares das variáveis originais na região que deteve a maior concentração da variância original. Essas duas novas variáveis colocadas ortogonalmente geraram uma distribuição bidimensional das amostras conforme se observa na Figura 15.

Essa distribuição bidimensional reteve 85,65% da informação original (CP1 = 54,18% e CP2 = 31,47%). Embora as análises de agrupamento feitas anteriormente possuam uma metodologia matemática simples e a análise de componentes principais seja mais complexa, os resultados foram totalmente concordantes. A classificação das amostras em três grupos mostrada no dendrograma da Figura 13 foi confirmada, pois à direita de CP1 observa-se a concentração das amostras de

feno a 70%; à esquerda de CP1 e acima de CP2 a concentração de feno e silagem a 30% e à esquerda de CP1 e abaixo de CP2, concentração de silagem a 70%.



**Figura 15.** Gráfico biplot resultante da análise de componentes principais mostrando a distribuição dos tratamentos e das variáveis.

Nas Tabelas 5 e 6 foram apresentadas as correlações entre cada variável e seus respectivos componentes principais indicando aquelas variáveis que mais discriminaram em cada eixo. Em CP1 (eixo horizontal) as variáveis mais relevantes na discriminação dos grupos foram DESMO, BUT, DESMS, PROP, DESFDN, DESFDA, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, nessa ordem. As variáveis com correlações positivas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras à direita em CP1 e aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras à esquerda em CP1. Assim, as variáveis DESMO, BUT, DESMS, PROP, DESFDN, DESFDA e CO<sub>2</sub> foram responsáveis pela discriminação dos grupos 2 e 3 enquanto que as variáveis CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub> foram responsáveis pela discriminação do GRUPO 1.

**Tabela 5.** Correlação entre variável e cada componente principal

	<b>DESMS</b>	<b>DESMO</b>	<b>DESPB</b>	<b>DESFDN</b>	<b>DESFDA</b>
<b>CP1</b>	-0,96	-0,99	-0,27	-0,92	-0,87
<b>CP2</b>	0,10	0,04	0,90	-0,28	-0,46

CP1 – componente principal 1, CP2 – componente principal 2, DESMS - desaparecimento de matéria seca, DESMO - desaparecimento de matéria orgânica, DESPB - desaparecimento de proteína bruta, DESFDN - desaparecimento de fibra em detergente neutro e DESFDA - desaparecimento de fibra em detergente ácido.

**Tabela 6.** Correlação entre variável e cada componente principal

	<b>ACE</b>	<b>PROP</b>	<b>BUT</b>	<b>CH<sub>4</sub></b>	<b>O<sub>2</sub></b>	<b>N<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub></b>
<b>CP1</b>	-0,23	-0,95	-0,97	0,63	-0,01	0,61	-0,45
<b>CP2</b>	-0,93	0,23	-0,07	-0,76	-0,96	-0,12	-0,46

CP1 – componente principal 1, CP2 – componente principal 2, ACE – ácido acético, PROP – ácido propiônico, BUT – ácido butírico, CH<sub>4</sub> – metano, O<sub>2</sub> – oxigênio, N<sub>2</sub> – nitrogênio e CO<sub>2</sub> – gás carbônico.

Quanto ao CP2 (eixo vertical) as variáveis mais importantes na discriminação dos grupos foram O<sub>2</sub>, ACE, DESPB, CH<sub>4</sub>, DESFDA e CO<sub>2</sub>, nessa ordem. As variáveis com correlações positivas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras acima do zero em CP2 e aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras abaixo do zero em CP2. Assim, a variável DESPB foi a responsável pela discriminação do GRUPO 2 enquanto que as variáveis O<sub>2</sub>, ACE, CH<sub>4</sub>, DESFDA e CO<sub>2</sub> foram discriminantes do GRUPO 3, nessa ordem.

Os resultados obtidos com análise multivariada de agrupamento, k-means e análise das componentes principais foram essenciais na discriminação dos tratamentos com feno e silagem em diferentes concentrações. Nos últimos anos, a análise multivariada tem sido aplicada em muitos experimentos por oferecer maior confiabilidade aos resultados. VAL et al. (2008) trabalhando com seleção de touros, utilizaram as técnicas multivariadas de agrupamento, k-means e análise das componentes principais. As análises se mostraram eficientes para a classificação dos animais em grupos e identificação de padrões de semelhança e os procedimentos multivariados permitiram resumir as informações após a avaliação genética, promovendo maior facilidade na identificação dos animais mais adequados para determinados rebanhos ou sistemas de produção. PINTO et al. (2005) determinaram a avaliação morfométrica de potros da raça Mangalarga Marchador a partir da análise de componentes principais e comprovaram sua eficiência em

reduzir o número de medidas lineares e angulares necessárias para esta avaliação em animais nas diferentes idades estudadas.

Os resultados obtidos para a produção *in vitro* de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, gases totais e O<sub>2</sub>, foram mostrados na Tabelas 7 e 8, na qual foram comparadas as médias dos 4 tratamentos. A Figura 16 mostrou a diferença na produção de CH<sub>4</sub> entre os tratamentos e a Figura 17 apresenta o gás produzido e armazenado nos recipientes plásticos após 12 h de incubação. Os resultados numéricos desta pesquisa (Tabelas 7 e 8 e Figura 16) determinaram que o volume de gás metano produzido diferiu de acordo com a natureza dos ingredientes que compuseram a ração. A maior produção desse gás foi proveniente dos animais que receberam as rações contendo 70V:30C.

Os resultados da Tabela 7 demonstraram maiores concentrações médias de O<sub>2</sub> no tratamento com 70% de silagem e concentrações de CO<sub>2</sub> semelhantes entre os tratamentos com 30 e 70% de volumoso. Estes resultados podem ser comparados aos de GASTALDI (2003) que trabalhando com concentrações semelhantes de feno na ração (70V:30C), encontrou resultados condizentes a este experimento. A produção de gases provenientes da fermentação ruminal pode variar de acordo com a dieta utilizada, variando também a proporção de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> nele contido. Além disso, a fibra é composta por carboidratos de digestão lenta e, quando incluído em quantidades excessivas nas dietas, pode interferir na redução da digestibilidade da mesma (MERTENS, 1992).

A Tabela 7 demonstrou que os valores médios para a produção de gases totais em 12 horas de incubação, diferiram significativamente de acordo com as concentrações de volumosos (feno ou silagem) na ração. Assim tratamentos com 70% de volumoso produziram mais gases do que tratamentos com 30% de volumoso. RIVERA (2006) observou que dietas contendo 80% de feno e 20% de concentrado, adicionadas ou não de monensina, apresentaram produções de gases consideráveis que não diferiram significativamente entre si. Amostras de gases foram avaliadas nos períodos de 9, 12 e 24 h, sendo que no período de 12 h houve acréscimo na produção de gases. CHAI et al. (2004), sugeriram que os gases produzidos nas três primeiras horas de incubação correspondem à fermentação dos carboidratos solúveis e de acordo com THEODOROU et al. (1994), à medida que o tempo de incubação aumenta, o volume de gases produzidos é maior devido à

fermentação de carboidratos estruturais na dieta.

Os resultados da Tabela 8 mostraram que maior porcentagem de concentrado na dieta resultou em produção de gás com menor proporção de metano e maior produção de gás carbônico, o que pode indicar que mesmo havendo disponibilidade de CO<sub>2</sub>, não houve transformação acentuada deste em CH<sub>4</sub>, havendo três hipóteses para este baixo aproveitamento: 1) presença de poucas bactérias metanogênicas; 2) baixa atividade fermentativa das metanogênicas; ou 3) pouca liberação de H<sub>2</sub> no ambiente *in vitro*, motivado por vias estequiométricas que favorecem a produção de propionato e não de acetato. O'MARA (2004) descreveu que a proporção de concentrado na dieta apresenta correlação negativa com a emissão de metano. Concentrados apresentam em sua estrutura física menor quantidade de carboidrato fibroso que forrageiras e à medida que aumentam na dieta se eleva a proporção de propionato e diminui-se a proporção de acetato produzido no processo fermentativo, ocorrendo algumas vezes decréscimo também de butirato (JOHNSON & JOHNSON, 1995), o que terá maior impacto na produção final de metano. PEDREIRA (2004), fornecendo alimentos concentrados para ruminantes, proporcionou aumento na ingestão de nutrientes pelos animais e reduziu a produção do metano por unidade de MS, MO e energia digestível ingerida.

**Tabela 7.** Concentrações milimolares de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e gases totais oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado

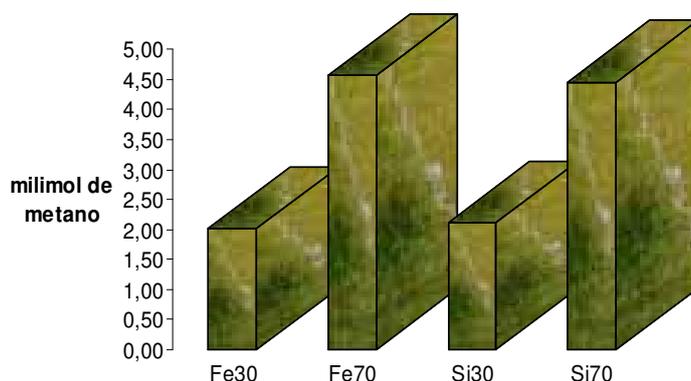
V:C	Tipo de Volumoso		Média	P <sub>R</sub>
	Feno	Silagem		
<b>CH<sub>4</sub></b>				
30:70	2,02	2,12	2,07 <sup>b</sup>	<0,0001
70:30	4,56	4,46	4,51 <sup>a</sup>	
<b>Média</b>	3,29	3,29		
<b>P<sub>V</sub></b>		1,000		
<b>CV (%)</b>		14,2		
<b>CO<sub>2</sub></b>				
30:70	1,08	1,22	1,15	0,6992
70:30	0,88	1,32	1,10	
<b>Média</b>	0,98 <sup>b</sup>	1,27 <sup>a</sup>		
<b>P<sub>V</sub></b>		0,0365		
<b>CV%</b>		25,3		
<b>N<sub>2</sub></b>				
30:70	0,80	0,96	0,88	0,1937
70:30	1,54	0,82	1,18	
<b>Média</b>	1,17	0,89		
<b>P<sub>V</sub></b>		0,2236		
<b>CV%</b>		48,0		
<b>Gases Totais</b>				
	<b>Feno</b>	<b>Silagem</b>	<b>Média</b>	
30:70	4,86	5,42	5,14 <sup>b</sup>	<0,0001
70:30	8,14	8,26	8,20 <sup>a</sup>	
<b>Média</b>	6,50	6,84		
<b>P<sub>V</sub></b>		0,5432		
<b>CV%</b>		18,3		
<b>O<sub>2</sub></b>				
30:70	1,02 <sup>b</sup>	1,12 <sup>b</sup>		<b>P<sub>rxv</sub></b>
70:30	1,20 <sup>b</sup>	1,64 <sup>a</sup>	0,0202	
<b>CV%</b>		11,8		

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05). V:C = proporção volumoso:concentrado; P<sub>R</sub> = Valor de p para concentrado, P<sub>V</sub> = Valor de p para volumoso, P<sub>(rxv)</sub> = Valor de p para a interação volumoso x concentrado, CV (%) = coeficiente de variação.

**Tabela 8.** Concentrações percentuais dos gases metano (CH<sub>4</sub>) dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), nitrogênio (N<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>) oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado

V:C	Tipo de Volumoso		Média	P <sub>R</sub>
	Feno	Silagem		
<b>CH<sub>4</sub></b>				
30:70	41,5	39,6	40,5 <sup>b</sup>	<0,0001
70:30	56,5	54,2	55,3 <sup>a</sup>	
<b>Média</b>	0,329	0,329		
<b>P<sub>V</sub></b>		0,1685		
<b>CV (%)</b>		6,8		
<b>CO<sub>2</sub></b>				
30:70	21,9 <sup>a</sup>	22,6 <sup>a</sup>	<b>P<sub>rxv</sub></b> 0,0011	
70:30	8,10 <sup>c</sup>	16,4 <sup>b</sup>		
<b>CV%</b>		12,3		
<b>N<sub>2</sub></b>				
30:70	15,9	16,6	16,2	0,3723
70:30	18,6	9,1	13,8	
<b>Média</b>	17,3	12,8		
<b>P<sub>V</sub></b>		0,1104		
<b>CV%</b>		38,6		
<b>O<sub>2</sub></b>				
30:70	20,6 <sup>a</sup>	21,0 <sup>a</sup>	<b>P<sub>rxv</sub></b> 0,0190	
70:30	15,0 <sup>b</sup>	20,2 <sup>a</sup>		
<b>CV%</b>		10,5		

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P>0,05). V:C = proporção volumoso:concentrado; P<sub>R</sub> = Valor de p para concentrado, P<sub>V</sub> = Valor de p para volumoso, P<sub>(rxv)</sub> = Valor de p para a interação volumoso x concentrado, CV (%) = coeficiente de variação.



**Figura 16.** Produção de metano (em milimol) em dietas com diferentes relações V:C.

CHRISTOPHERSEN et al. (2008) avaliaram a produção *in vitro* de metano em ovinos recebendo dietas com 35% e 70% de grãos e por meio da introdução de esponjas fibrosas no rúmen dos animais verificaram alterações na fermentação ruminal e demonstraram que menores concentrações de grãos combinadas com esponjas de fibras apresentaram menor produção de metano. BEAUCHEMIN & MCGINN (2005) avaliaram a produção “in vivo” de metano em bovinos alimentados com 70% de silagem de milho e 30% de concentrado e 70% de silagem de cevada e 30% de concentrado sendo que também foram testadas dietas com altas concentrações de grãos como milho e cevada. Os resultados obtidos determinaram maiores produções de metano nas dietas com maior concentração de volumoso. LANA & RUSSELL (2001) trabalharam com fermentação *in vitro* de metano em bovinos alimentados com dieta contendo apenas feno e outra contendo 90% de concentrado e verificaram maior produção de metano na dieta com feno do que na dieta contendo concentrado. Em geral, dietas que proporcionam alta taxa de digestão reduzem a emissão de CH<sub>4</sub> já que o alimento não permanece por tempo prolongado no rúmen. A quantidade de forragem na dieta, o método de preservação, o estágio de crescimento da planta forrageira, o tamanho de partícula e o grau de moagem, a quantidade de grãos na dieta e a adição de lipídeos e aditivos como os ionóforos, são importantes componentes que afetam a produção de metano no rúmen (JOHNSON & JOHNSON, 1995; STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).



**Figura 17.** Garrafas com líquido ruminal colocadas em banho com temperatura controlada e os recipientes com o gás armazenado produzido.

A Tabela 9 mostra os resultados percentuais obtidos para a análise do desaparecimento “in vivo” dos alimentos no período de 12 h para DESMS, DESMO, DESPB, DESFDN e DESFDA. As dietas com 70% de concentrado, independentemente do volumoso empregado (feno ou silagem), apresentaram resultados semelhantes para o desaparecimento da DESMS e dos nutrientes, à exceção de DESFDA, mais elevada em dietas com silagem. Estes resultados obtidos para as dietas concentradas podem ser verificados tanto na análise de variância (Tabela 9) como na multivariada, como se observa na Figura 14, que uniu estes dois tratamentos num só grupo para essas variáveis. Pela análise das componentes principais (Figura 15) no eixo CP1, as variáveis DESMS e DESMO estão entre as principais discriminantes deste grupo e no eixo CP2 a variável determinante é a DESPB. Estas dietas apresentaram maiores valores médios (Tabela 9) para o desaparecimento de DESMS, DESMO e DESPB em 12 h de incubação no rúmen, o que pode indicar maior digestibilidade dos concentrados. O aumento da digestão de MS e MO pode ser atribuído a maior concentração de carboidratos totais digestíveis das dietas com 70% de concentrado em relação os maiores teores de carboidratos estruturais presentes nas dietas com maior concentração de volumosos (PEDREIRA, 2004). De acordo com SARTI et al. (2005) alta taxa de desaparecimento da matéria seca da silagem de milho nas primeiras 12 h de incubação pode ser explicada pela presença de grãos.

A dieta contendo 70% de feno foi a que apresentou as menores porcentagens de desaparecimento de FDN e FDA em relação aos demais tratamentos, assim como os desaparecimentos de matéria seca e matéria orgânica também foram menores (Tabela 9). A discriminação deste tratamento foi verificada pela Figura 15 que demonstrou a concentração das amostras contendo 70% de feno à direita de CP1. Alimentos com alto teor de fibra diminuem o consumo de matéria seca, pois apresentam baixa digestibilidade. Esta pode ser uma consequência do material indigestível, que pode estar preenchendo lugar na capacidade física do rúmen. O alimento ingerido deve ser removido do rúmen via fermentação ou passagem para dar espaço à entrada de consumo adicional (MERTENS et al., 1994).

Quando se avalia apenas os ingredientes nas dietas, observa-se que aqueles que apresentam maiores teores de fibra e que no período de 12 h de degradação ruminal apresentam baixa taxa de desaparecimento de componentes da fibra vão apresentar uma maior emissão de metano quando comparados com alimentos que possuem uma taxa de desaparecimento da fibra maior em 12 h de incubação, como observado por GASTALDI (2003).

Pelo gráfico da Figura 14 a dieta com 70% de silagem apresentou maiores valores para o desaparecimento das fibras (FDN e FDA), e de acordo com GASTALDI (2003) o milho é um ingrediente que possui alto desaparecimento da sua fibra.

As Tabelas 10 e 11 mostraram resultados obtidos para a produção “in vitro” de ácidos graxos de cadeia curta. A Tabela 10 mostrou também resultados obtidos para a relação C2:C3. A Figura 18 apresentou os valores médios obtidos para a relação C2:C3, mostrando que houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de volumoso e concentrado entretanto, para o tratamento com 30% de volumoso não houve diferença na relação C2:C3. Os tratamentos com 70% de feno e silagem foram os que demonstraram maior relação C2:C3.

**Tabela 9.** Porcentagens dos desaparecimentos de DESMS, DESMO, DESPB, DESFDN e DESFDA após incubação ruminal *in situ* por 12h

Rel. V:C	Tipo de Volumoso		P <sub>rxv</sub>
	Feno	Silagem	
	<b>DESMS</b>		
30:70	47,1 <sup>a</sup>	46,4 <sup>a</sup>	<0,0001
70:30	34,7 <sup>b</sup>	44,7 <sup>a</sup>	
CV%	2,5		
	<b>DESMO</b>		
30:70	46,5 <sup>a</sup>	48,7 <sup>a</sup>	<0,0001
70:30	31,4 <sup>b</sup>	45,5 <sup>a</sup>	
CV%	3,4		
	<b>DESPB</b>		
30:70	52,6 <sup>a</sup>	53,6 <sup>a</sup>	<0,0001
70:30	49,3 <sup>b</sup>	46,2 <sup>c</sup>	
CV%	1,4		
	<b>DESFDN</b>		
30:70	26,7 <sup>a</sup>	28,1 <sup>a</sup>	<0,0001
70:30	21,1 <sup>b</sup>	29,1 <sup>a</sup>	
CV%	4,7		
	<b>DESFDA</b>		
30:70	26,6 <sup>c</sup>	35,9 <sup>b</sup>	<0,0001
70:30	11,1 <sup>d</sup>	42,4 <sup>a</sup>	
CV%	4,4		

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem significativamente para um mesmo desaparecimento, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). Rel. V:C = relação volumoso:concentrado; P<sub>(rxv)</sub> = Valor de p para a interação volumoso x concentrado, CV (%) = coeficiente de variação.

Tem que ser considerado que os dados de desaparecimento do substrato no rúmen e de produção de gases são diferentes e não podem ser comparados diretamente em valores absolutos, pois, no caso do desaparecimento do substrato, é considerado principalmente o material insolúvel, enquanto que na produção de gases, a fração solúvel possui muita importância (BRUNI & CHILIBROSTE, 2000). BLÜMMEL et al. (1997) verificaram que a produção de gases de 200 mg de fibra em detergente neutro (FDN) é maior do que de 200 mg da forragem integral. Eles sugeriram que a eficiência com que o material fermentável é incorporado às células microbianas é uma explicação para a maior produção de gases da FDN. Entretanto, a contribuição das frações solúveis dos alimentos para a produção de gases, formação de massa microbiana e, conseqüentemente para o animal, pode ser maior do que a contribuição da fração fibrosa durante as primeiras horas de fermentação.

O método *in vitro* de produção de metano é comumente utilizado pela rapidez, ou quando é requerido grande número de análises em uma determinada avaliação. Entretanto, o acúmulo dos produtos finais da fermentação, assim como a dieta a que o animal doador do líquido ruminal é submetido, podem afetar os resultados (CHERNEY et al., 1993). Nesta pesquisa, o animal doador recebeu exatamente a mesma dieta incubada. BUENO et al. (2005) avaliaram o efeito da espécie do animal doador (bovino *versus* ovino) do líquido ruminal na produção de gases utilizando forrageiras tropicais e os resultados determinaram maior taxa de fermentação com líquido ruminal proveniente de bovinos.

**Tabela 10.** Concentrações em  $\mu\text{mol/mL}$  dos ácidos acético (ACE) propiônico (PROP), butírico (BUT) e relação acetato:propionato (ACE:PROP) oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado

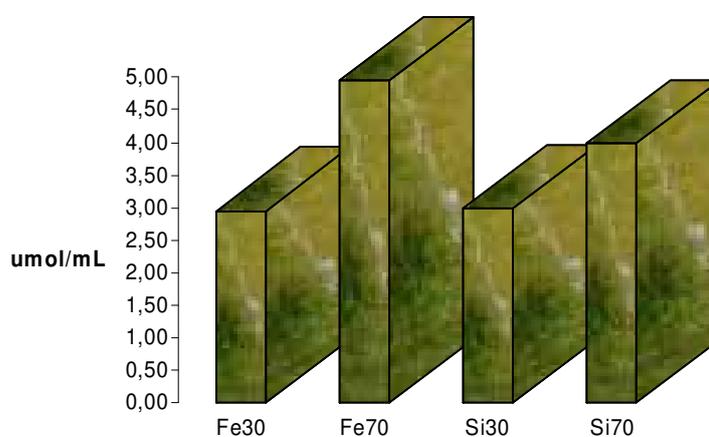
V:C	Tipo de Volumoso		$P_{rxv}$
	Feno	Silagem	
		<b>ACE</b>	
<b>30:70</b>	49,196 <sup>b</sup>	49,364 <sup>b</sup>	<0,0001
<b>70:30</b>	49,664 <sup>b</sup>	58,436 <sup>a</sup>	
<b>CV%</b>		0,6	
		<b>PROP</b>	
<b>30:70</b>	16,632 <sup>a</sup>	16,524 <sup>a</sup>	<0,0001
<b>70:30</b>	10,032 <sup>c</sup>	14,612 <sup>b</sup>	
<b>CV%</b>		1,7	
		<b>BUT</b>	
<b>30:70</b>	6,018 <sup>b</sup>	7,25 <sup>a</sup>	<0,0001
<b>70:30</b>	3,296 <sup>c</sup>	6,618 <sup>b</sup>	
<b>CV%</b>		4,9	
		<b>ACE:PROP</b>	
<b>30:70</b>	2,958 <sup>c</sup>	2,984 <sup>c</sup>	<0,0001
<b>70:30</b>	4,954 <sup>a</sup>	3,998 <sup>b</sup>	
<b>CV%</b>		2,8	

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem significativamente para um mesmo ácido, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). V:C = proporção volumoso:concentrado  $P_{(rxv)}$  = Valor de p para a interação volumoso x concentrado, CV (%) = coeficiente de variação.

**Tabela 11.** Concentrações percentuais dos ácidos acético (ACE), propiônico (PROP) e butírico (BUT) oriundos da fermentação de dietas contendo feno e silagem de milho e duas proporções volumoso:concentrado

V:C	Tipo de Volumoso		P <sub>rxv</sub>
	Feno	Silagem	
	<b>ACE</b>		
30:70	68,4 <sup>c</sup>	67,4 <sup>d</sup>	<0,0001
70:30	78,8 <sup>a</sup>	73,3 <sup>b</sup>	
CV%	0,5		
	<b>PROP</b>		
30:70	23,5 <sup>a</sup>	22,6 <sup>a</sup>	<0,0001
70:30	15,9 <sup>c</sup>	18,3 <sup>b</sup>	
CV%	1,8		
	<b>BUT</b>		
30:70	8,3 <sup>b</sup>	9,9 <sup>a</sup>	<0,0001
70:30	5,3 <sup>c</sup>	8,3 <sup>b</sup>	
CV%	4,3		

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem significativamente para um mesmo ácido, pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). V:C = proporção volumoso:concentrado P<sub>(rxv)</sub> = Valor de p para a interação volumoso x concentrado, CV (%) = coeficiente de variação.



**Figura 18.** Relação C2:C3 (em  $\mu\text{mol/mL}$ ) em dietas com diferentes concentrações de volumoso.

Quando se deseja comparar dados de produção de gases *in vitro* com dados *in vivo*, alguns pontos importantes têm que ser considerados: é difícil determinar precisamente quais produtos resultarão da fermentação da fração solúvel dos alimentos no rúmen dos animais; a redução do tamanho das partículas dos alimentos ocorre pela mastigação, processo este fisicamente diferente do processo de moagem mecânica; da mesma forma, a simulação da taxa de passagem no sistema *in vitro* é problemática. Mas, apesar destas considerações, os dados de produção de gases podem contribuir para o entendimento da digestão ruminal e descrição dos diferentes alimentos e assim prever a performance animal de forma mais exata (GASTALDI, 2003).

Uma utilidade alternativa e pouco explorada do sistema de produção de gás *in vitro* é como indicador do “status” interno do rúmen (CHILIBROSTE et al., 1999), podendo ser empregado para descobrir mudanças na capacidade digestiva “in vivo” ou elucidar limitações digestivas de um substrato.

Segundo BRUNI & CHILIBROSTE (2000) o sistema de produção de gás *in vitro* pode ser utilizado, ainda, como indicador do metabolismo do carbono de maneira alternativa ao desaparecimento do substrato, centrando a atenção nos produtos finais da fermentação (dióxido de carbono, metano e ácidos graxos voláteis). A concentração mais elevada de ácido acético em  $\mu\text{mol/mL}$  pode ser observada na dieta com 70% de silagem (Tabela 10) e os valores médios mostrados nos demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si. Embora a concentração de acetato tenha sido maior na silagem não houve diferença significativa para a produção de metano em relação ao feno e de acordo com MILLER (1995), mesmo o acetato sendo um importante substrato para a produção de  $\text{CH}_4$ , são poucas as metanogênicas que utilizam o grupo metil do acetato para este fim, sendo o  $\text{H}_2$  e o  $\text{CO}_2$  os substratos mais importantes, considerando ainda que a maioria das metanogênicas utiliza a metanol oxidase para produzir os elétrons necessários à redução de moléculas de metanol a  $\text{CH}_4$ .

Para a concentração de ácido propiônico, foram apresentados valores médios maiores para os tratamentos com 30% de volumoso e maior produção de ácido butírico foi determinada nos tratamentos contendo silagem de milho. Estas informações foram confirmadas pelo gráfico da Figura 14. Na Tabela 8 pode ser notado que a maior concentração percentual de  $\text{CH}_4$  se referiu ao tratamento com

70% de feno. Pela análise das componentes principais (Figura 15) a variável CH<sub>4</sub> foi bastante importante na discriminação do GRUPO 1 (70% de feno). TAJIMA et al. (2000) verificaram maiores concentrações de ácido acético em animais alimentados com maior quantidade de feno em comparação aos que receberam dieta com predominância de grãos, onde foi observada maior produção de propionato. LANA & RUSSELL (2001) trabalhando com dietas para bovinos contendo somente feno e outra 90% de concentrado verificaram que as bactérias provenientes da dieta rica em concentrado produziram menos acetato e mais propionato que bactérias provenientes de dieta de volumoso, além disso, a relação C2:C3 também foi maior na dieta volumosa.

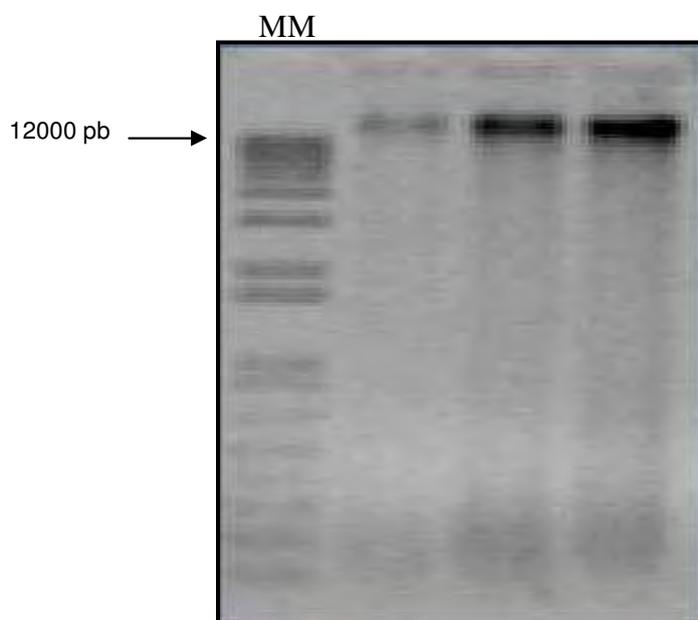
A relação C2:C3 diferiu de forma significativa nos tratamentos com diferentes concentrações de volumoso (70% e 30%), e não apresentou diferença entre os tratamentos contendo 30% de volumoso (feno ou silagem). Entretanto houve diferença significativa no tratamento com 70% de feno em relação ao tratamento com 70% de silagem, como pode ser observado na Tabela 10 e na Figura 18. Isto pode ser explicado em virtude da baixa disponibilidade de carboidratos não fibrosos no feno (FRANCE & SIDDONS, 1993). Nas dietas com alta proporção de volumoso a fermentação ruminal ocorre preferencialmente pela via do acetato (CHURCH, 1998). Acetato e butirato promovem a produção de metano enquanto o propionato pode ser considerado um competidor pelas vias de uso de H<sub>2</sub> no rúmen (MOSS, 2000). Segundo KÖSTER et al. (1996) animais recebendo concentrado apresentaram menor proporção de ácido acético que animais alimentados exclusivamente com volumoso. Ainda, os animais alimentados com elevadas porcentagens de concentrado apresentaram pH ruminal normalmente menor que 6,0. A inabilidade das bactérias de dietas com maior proporção de concentrado em produzir grande quantidade de metano e aumentar a relação C2:C3 é consistente com o efeito inibitório da acidez sobre a metanogênese (LANA & RUSSELL, 2001).

De acordo com JOHNSON & JOHNSON (1995) o tipo de fermentação resultante pode variar de alta emissão de metano, caracterizado por uma alta relação C2:C3, a uma baixa emissão de metano caracterizado por uma menor relação C2:C3. Isto também pode ser explicado em virtude da baixa disponibilidade de carboidratos não fibrosos no feno, enquanto que a relação foi diminuída quando os níveis de concentrado na dieta aumentou (FRANCE & SIDDONS, 1993). Tewatia

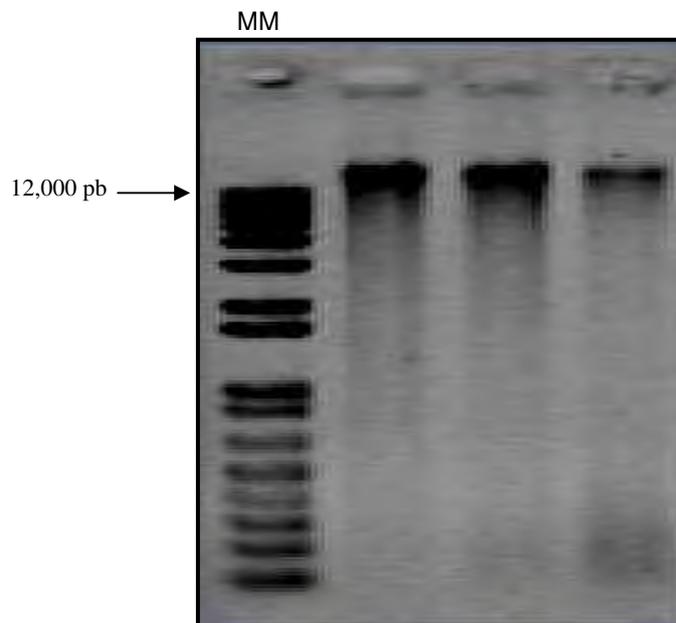
et al. (1997), Urbaniak & Przybecki, 1995 e Chapaval et al. (2008) observaram diminuição na proporção molar de acetato quando houve inclusão de concentrado na alimentação de ruminantes, o que concorda com os resultados deste trabalho. Dietas com maior quantidade de concentrado requerem baixo tempo de ruminação, conseqüentemente, reduzem a secreção salivar em relação à produção de AGCC (ØRSKOV & RYLE, 1990).

#### 4.2. DNA genômico

Após a separação dos microrganismos sólido aderidos do conteúdo ruminal as amostras ruminais foram submetidas à lise física por meio de “glass beads” e N<sub>2</sub> líquido, e os materiais genéticos obtidos foram mostrados nas Figuras 19 e 20, respectivamente. O DNA obtido com maceração com “glass beads” apresentou maior integridade em comparação ao DNA obtido por maceração com N<sub>2</sub> líquido.



**Figura 19.** Material genético de amostras de microrganismos metanogênicos do rúmen obtido por lise física a partir de “glass beads”. MM: Marcador de tamanho molecular 1kb.



**Figura 20.** Material genético de amostras de microrganismos metanogênicos do rúmen obtido por lise física a partir de  $N_2$ . MM: Marcador de tamanho molecular 1kb.

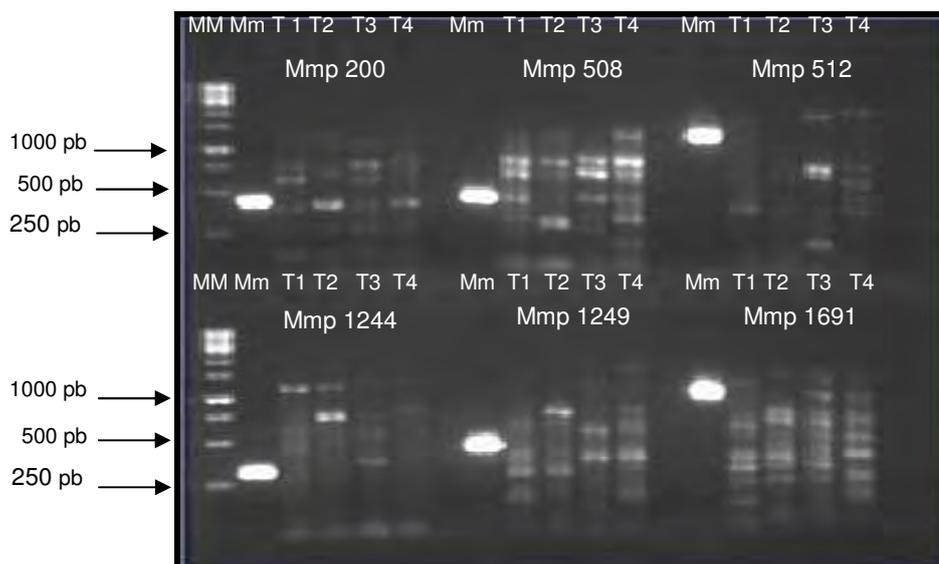
Embora o protocolo que utilizou “glass beads” tenha possibilitado a obtenção de material genético com qualidade superior ao protocolo com  $N_2$  líquido, os dois protocolos permitiram realizar amplificações por PCR. A relação 260/280 nm calculada para caracterizar a pureza do DNA foi de 1,2 a 1,3 para o protocolo com  $N_2$  líquido e de 1,3 a 1,6 para o protocolo com “glass beads”, ficando abaixo do parâmetro ideal (1,8 a 2,0), sendo necessário realizar a purificação destes materiais genéticos.

As maiores vantagens apresentadas por estes protocolos foram a simplicidade e a rapidez de sua realização em laboratório. TAJIMA et al. (1999) testaram dois protocolos de extração de DNA de microrganismos presentes no rúmen de bovinos. No primeiro protocolo eles utilizaram reagentes de lise celular como N-lauril sarcosina e proteinase K e no segundo protocolo foi feita a lise física por meio de congelamento e descongelamento das células. Após análises preliminares desses materiais genéticos eles optaram pelo protocolo de lise física para construção de bibliotecas.

A padronização de protocolos de extração de DNA é importante porque determina o método mais eficiente, rápido e sensível para isolar pequenas quantidades de DNA a partir de um número limitado de células (GRIFFIN, et al., 2002). O parâmetro qualidade é decisivo para a obtenção de bandas por PCR (FORBES, 2003) e isso decorre, principalmente, do fato de que na presença de resíduos contaminantes que resultam do processo de extração, tais como o fenol, a ação da enzima Taq DNA polimerase é prejudicada (VELOSO, et al., 2000).

### **4.3. Detecção das ORFs**

Após a obtenção do DNA das amostras de conteúdo ruminal referentes aos quatro tratamentos estudados, foi feita amplificação das sequências específicas correspondentes às ORFs codificadoras da enzima CHO-MFR presentes no DNA das arqueias, como observado na Figura 21. Nesta figura, a ORF Mmp 200, com altura de banda esperada de aproximadamente 600 pb, foi detectada nos materiais genéticos referentes aos tratamentos T1 e T3, a ORF Mmp 508 apresentou bandas nos tamanhos esperados de 500 pb, nos materiais genéticos relacionados aos tratamentos T1, T3 e T4, a ORF Mmp 512 foi detectada no material genético referente ao tratamento T3, apresentando tamanho esperado de 1200 pb, a ORF Mmp 1244 esteve presente no DNA referente ao T3, com tamanho esperado de bandas em torno de 400 pb, a ORF Mmp 1249 pode ser detectada no DNA referente ao tratamento T3, apresentando banda de tamanho molecular de aproximadamente 600 pb e a ORF Mmp 1691 também amplificou o DNA relacionado ao tratamento T3, com tamanho aproximado de 1200 pb.



**Figura 21.** Amplificação das sequências específicas de arqueias relativas às ORFs Mmp 200, Mmp 508, Mmp 512, MMp 1244, Mmp 1249 e Mmp 1691. Mm: Material genético da linhagem da arqueia *M. maripaludis*, MM, marcador de tamanho molecular 1 kb.

O DNA correspondente ao tratamento contendo 70% de silagem (T3) foi o que permitiu maior número de amplificações de bandas relacionadas às ORFs referentes à enzima CHO-MFR. Os materiais genéticos relacionados aos tratamentos com 30% de volumoso apresentaram menos amplificações de bandas para estas ORFs, sendo que o correspondente ao tratamento T2 (30% de feno) não apresentou nenhuma amplificação de bandas para as ORFs e o do tratamento T4 (30% de silagem) amplificou apenas a região do DNA correspondente à ORF Mmp 508. Os materiais genéticos dos tratamentos com maior quantidade de volumoso (feno ou silagem) foram os que determinaram mais amplificações para a região relacionada à enzima CHO-MFR. Isto pode ser explicado devido ao fato de que quando ruminantes são alimentados com forragem e/ou dietas volumosas, o pH ruminal permanece próximo da neutralidade em decorrência do estímulo à ruminação havendo, por consequência, uma grande produção de saliva que atua como substância tampão natural do fluido ruminal (ARAÚJO et al., 2006). A presença de grandes quantidades de concentrado na dieta ou a sua exclusividade na alimentação de ruminantes reduz o pH do ambiente ruminal. Considerando-se que os microrganismos metanogênicos são pH sensíveis (CHURCH, 1993) é de se

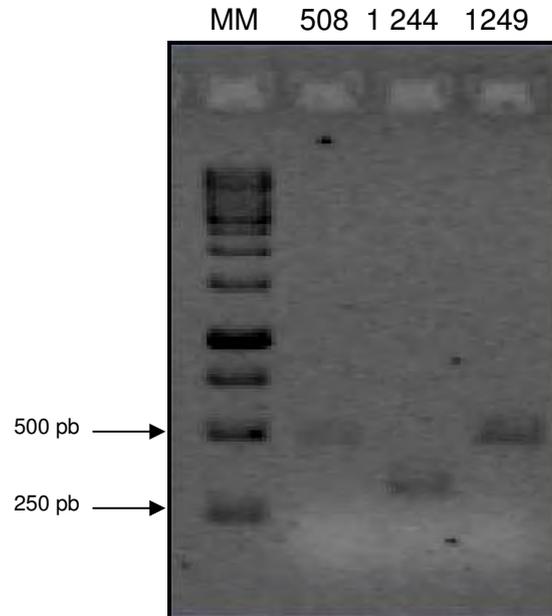
esperar que a produção de metano neste ambiente ruminal também seja menor. BEUVINK & SPOELTRA (1992) verificaram que a relação entre produção de gás e desaparecimento do substrato pode não ser linear quando o pH está abaixo de 6,2, sendo imprescindível a utilização de tampões para garantir que o mesmo permaneça acima deste valor durante a fermentação.

A dificuldade de detecção destes genes no material genético de arqueias para alguns tratamentos pode significar que a presença de certos microrganismos esteja relacionada a alterações que ocorrem na fauna ruminal visto que, no processo de fermentação anaeróbia, durante o metabolismo dos carboidratos, pode haver maior ou menor produção de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> dependendo da concentração e proporção relativa dos ácidos produzidos (LUCCI, 1997). Rações com alta digestibilidade apresentam, geralmente, baixo teor de fibra e alto teor de amido e de lipídios, que proporcionam redução na emissão de metano, pois bactérias que fermentam o amido podem competir com as metanogênicas pelo hidrogênio livre para a produção de propionato (RUSSELL, 1998). As arqueias mistas ruminais perdem a habilidade de produzir metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono em baixo pH e alta concentração de ácidos graxos de cadeia curta (VAN KESSEL e RUSSELL, 1996).

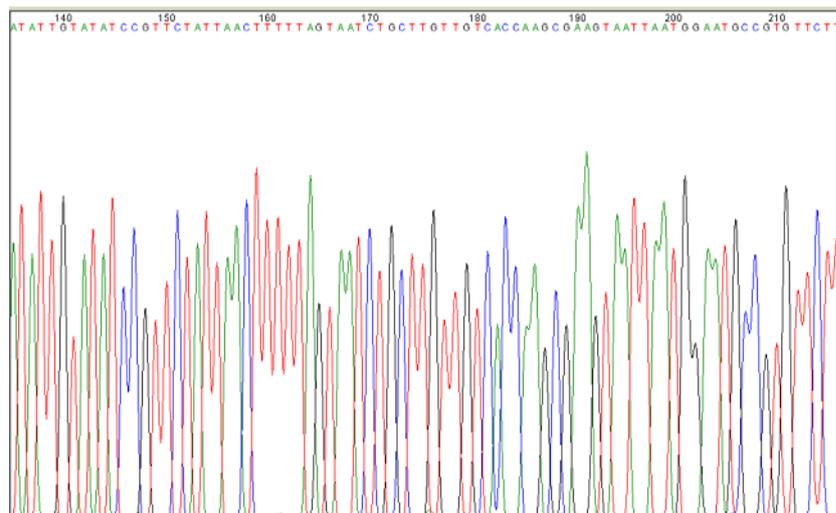
Para que os produtos de PCR pudessem ser eluídos e purificados foi necessário concentrar a amplificação do produto, para isso foram feitas quatro reações de PCR para cada ORF detectada nos tratamentos e assim foram aplicados 80 µL da reação nas canaletas do gel de agarose, obtendo um resultado semelhante ao observado na Figura 21, mas com as bandas mais concentradas. Após a purificação do DNA eluído foram feitas tentativas de sequenciamento com este produto e os resultados obtidos não foram satisfatórios. Foi aplicada então outra estratégia, em que os produtos purificados foram novamente amplificados por PCR e o produto desta amplificação foi usado no sequenciamento como mostrado na Figura 22. O cromatograma da Figura 23 demonstrou a qualidade das sequências que foram analisadas.

Foi realizado o sequenciamento das regiões do DNA que corresponderam às ORFs Mmp 508, Mmp 1244 e Mmp 1249 confirmando a detecção e o tamanho aproximado das bandas amplificadas para cada tratamento. As sequências obtidas após o sequenciamento do DNA das arqueias podem ser observadas no Anexo1. A presença das ORFs Mmp 200, Mmp 512 e Mmp 1691, foi confirmada no DNA das

arqueias considerando apenas o tamanho das bandas comparado aos padrões de *M. maripaludis*, sendo necessário o sequenciamento destes materiais genéticos para maior comprovação desta informação.

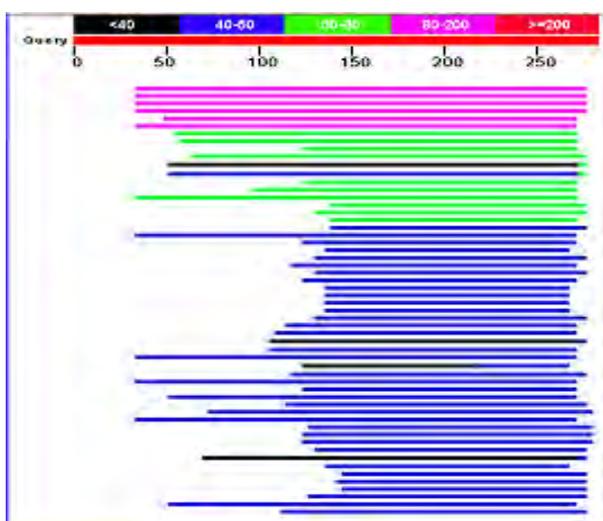


**Figura 22.** PCR dos produtos de ampliações correspondentes às ORFs Mmp 508, Mmp 1244 e Mmp 1249. MM. Marcador de tamanho molecular 1 kb.



**Figura 23.** Cromatograma representando parte da sequência da ORF Mmp 1244 do T3, obtida por sequenciamento direto do produto da PCR.

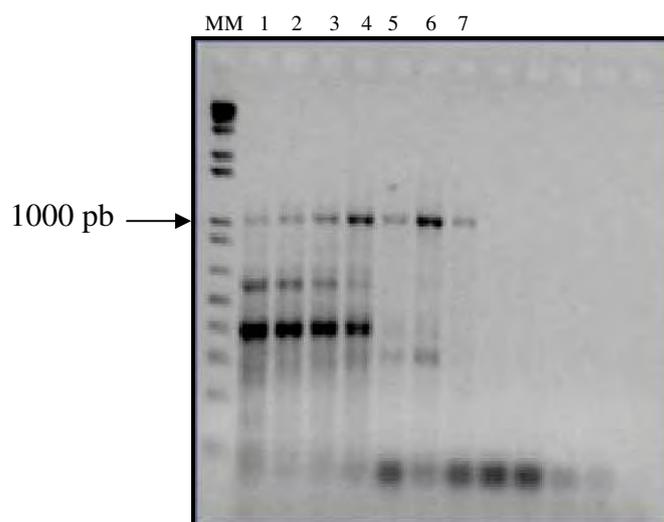
Após o sequenciamento, as sequências correspondentes às ORFs Mmp 1244, Mmp 508 e MMP 1249 foram alinhadas com sequências de microrganismos como *M. maripaludis*, *M. mazei*, *M. barkeri* e outros relacionados com a enzima CHO-MFR. A Figura 24 mostra o alinhamento obtido para sequência correspondente à ORF Mmp 1244. Já foi determinado que pelo menos três arqueias da fauna ruminal (*Methanosarcina barkeri* Fusaro, *M. mazei* e *Methanococcoides burtonii*) apresentam esta enzima na via metabólica da metanogênese (HENDRICKSON et al., 2004).



**Figura 24.** Alinhamento da sequência correspondente à ORF Mmp 1244 com outras sequências de metanogênicas, obtido pelo BLAST.

#### 4.4. Filogenia das arqueias pela região 16S rDNA

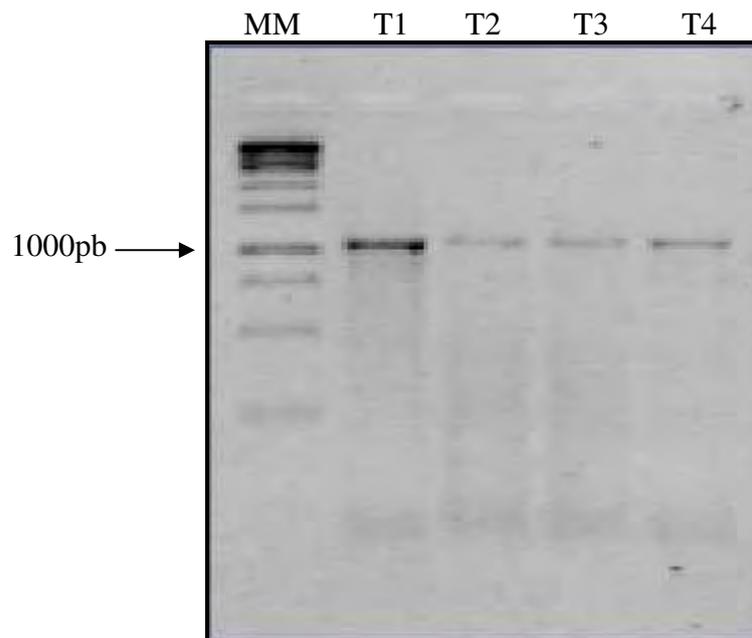
Os resultados da extração de DNA obtido a partir do protocolo com “glass beads” possibilitaram a amplificação de material genético correspondente à região 16S rDNA, entretanto, como surgiram muitas bandas inespecíficas foi necessário otimizar a reação. Para isto, a reação foi submetida a variações de temperatura entre 48°C a 59°C, sendo que a que proporcionou melhor resultado foi a temperatura de 54°C, como observado na canaleta sete da Figura 25, que não apresentou bandas inespecíficas.



**Figura 25.** Otimização da reação para a região 16S rDNA usando termociclador gradiente, com variação de temperaturas entre 48°C a 59°C. MM: Marcador de tamanho molecular 1kb.

Após a otimização da temperatura ideal para a amplificação do material genético correspondente à região 16S rDNA, foram feitas as PCRs para os quatro tratamentos, como pode ser observado na Figura 26. Diversos estudos vêm sendo realizados a partir da utilização do gene 16S rDNA tornando possível investigar e determinar posições filogenéticas de várias comunidades de microrganismos no ambiente (HENTSCHEL et al., 2002). A verificação da diversidade genética usando sequências 16S rRNA também foi observada nos estudos feitos por WRIGHT et al. (2004) para a comparação de populações metanogênicas em ruminantes e além disso, conseguiram determinar seis novas espécies de arqueias metanogênicas no rúmen de ovinos. SKILLMAN et al. (2004) utilizaram a região conservada 16S rDNA e a partir da construção de bibliotecas genômicas e verificação da homologia de sequências e análise filogenética, eles obtiveram informações sobre a diversidade de microrganismos metanogênicos do rúmen de bovinos. AN et al. (2005), por meio da região 16S rDNA verificaram a diversidade de procariotos no rúmen de bovinos e identificaram nove sequência relacionadas com *Ruminicoccus albus*, além de bactérias não cultiváveis. WHITBY et al. (2004) verificaram a diversidade molecular em arqueias pela utilização das sequências 16S rDNA e por meio da comparação de endonucleases de restrição puderam verificar 71 linhagens de microrganismos

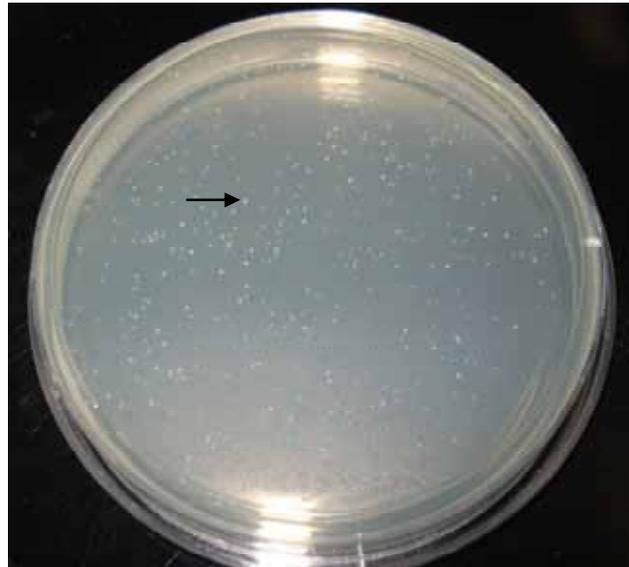
metanogênicos em lagos de água doce. SILVEIRA (2004), utilizou DNA metagenômico do solo e a partir da região 16S rDNA identificou diversas comunidades bacterianas não cultiváveis e ainda não classificadas filogeneticamente.



**Figura 26.** Amplificação da região 16S rDNA em arqueias metanogênicas do rúmen, correspondentes aos tratamentos T1, T2, T3, e T4. MM: marcador de tamanho molecular 1kb.

Após a obtenção do DNA genômico e utilizando-se sequências específicas de oligonucleotídios iniciadores para o gene da subunidade ribossomal 16S foi feita a clonagem em pGEM-Teasy, transformação bacteriana (Figura 27), extração do DNA plasmidial, preparo das bibliotecas em triplicata e posterior sequenciamento de arqueias metanogênicas referentes aos quatro tratamentos, também em triplicata para assegurar maior confiabilidade aos resultados. Na Figura 28 foram observadas irregularidades quanto ao tamanho molecular dos plasmídios obtidos, principalmente no eletroferograma correspondente ao tratamento T3, com 70% de silagem, que determinou maior diversidade em relação aos demais tratamentos devido aos diferentes insertos clonados. Os resultados da transformação bacteriana usando

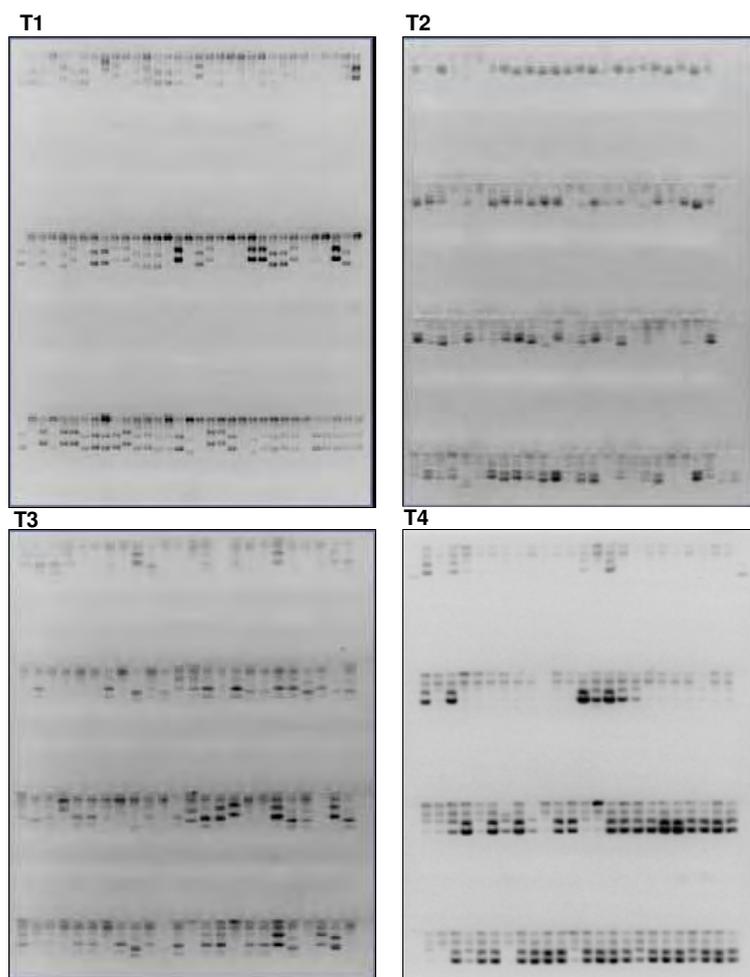
linhagem de *E.coli* DH10b foram satisfatórios devido à presença de inúmeras colônias brancas contendo o inserto de interesse referente à região 16S rDNA, clonado no vetor pGEM-T.



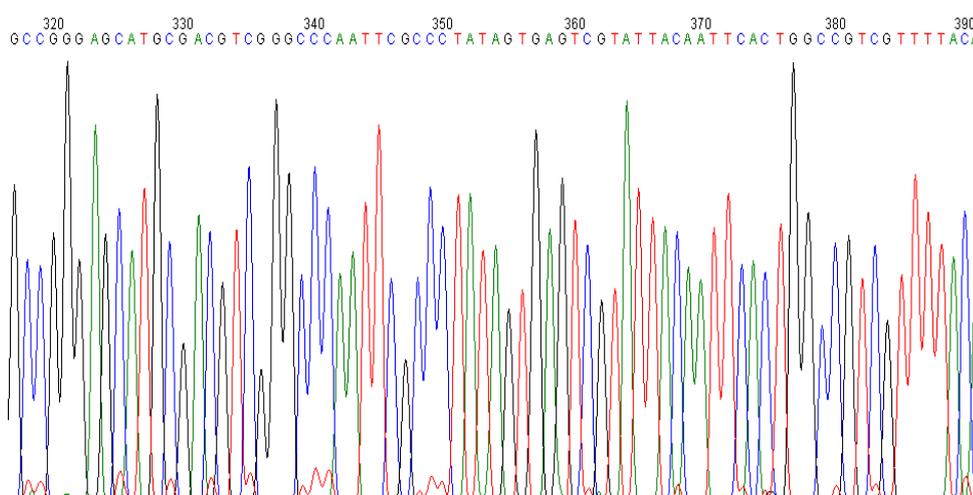
**Figura 27.** Fotografia dos transformantes. A seta indica a presença de colônias brancas referentes à linhagem de *E. coli* DH10b transformada.

Após o sequenciamento, além das sequências também foram gerados cromatogramas (Figura 29) que possibilitaram determinar a qualidade do material sequenciado. Foi gerada uma matriz de similaridade a partir das sequências alinhadas, agrupando em possíveis OTUs usando o programa Dotur.

O estudo envolvendo a amplificação, clonagem e sequenciamento da região 16S rDNA, demonstrou ser eficiente para avaliação de microrganismos metanogênicos. Mais de 1000 sequências de clones foram analisadas e após o sequenciamento, foi determinada a qualidade do material sequenciado e comparadas pelo programa BLAST no banco GenBank, para uma prévia identificação dos clones sequenciados.



**Figura 28.** Visualização do DNA plasmidial obtido de amostras de conteúdo ruminal referente aos tratamentos T1, T2, T3 e T4.



**Figura 29.** Cromatograma representando parte da sequência 16S rDNA de um dos tratamentos obtida por meio do sequenciamento do fragmento inserido no vetor, com o primer universal SP6.

As análises do BLAST determinaram no tratamento T1, 96 sequências relacionadas à família *Methanobacteriaceae*, 47 sequências referentes a arqueias não cultiváveis e 60 sequências relativas a arqueias não conhecidas. No tratamento T2 foram determinadas 125 sequências referentes à família *Methanobacteriaceae*, 42 foram referentes a arqueias não cultiváveis e 32 à arqueias desconhecidas. Para o tratamento T3 foram observadas 30 sequências referentes à família *Methanobacteriaceae*, 18 sequências referiram-se à família *Methanomicrobiaceae*, 43 sequências foram referentes a arqueias não cultiváveis e 118 sequências de arqueias não conhecidas. No tratamento T4 foram 173 sequências referentes à família *Methanobacteriaceae*, 31 estiveram relacionadas com arqueias não cultiváveis e 25 foram relacionadas a arqueias desconhecidas. Os totais de sequências analisadas foram 203, 199, 209 e 229 respectivamente para cada tratamento. As metanogênicas estão presentes no rúmen em grande quantidade que pode variar entre  $10^7$  a  $10^9$  cel/mL de líquido ruminal dependendo da dieta fornecida ao animal (KAMRA, 2005). TAJIMA et al. (2000) verificaram a influência da dieta em populações de bactérias no rúmen por meio de clonagem e sequenciamento. Todas as sequências utilizadas como referência foram obtidas do GenBank database, a homologia das sequências foi feita por meio do BLAST e após o alinhamento e análise da diversidade eles observaram a prevalência de bactérias produtoras de lactato em meio com maior acidose. PEREIRA (2003) avaliou a diversidade de bactérias em solos sob cultivo e solos de florestas e após submissão das sequências fastas ao programa BLAST foi feita análise filogenética que permitiu a observação de maior número de filos no solo sob florestas.

As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com outras sequências presentes em bancos como o Ribossomal Database (RDP). Foi possível identificar microrganismos da família *Methanobacteriaceae* incluindo os gêneros *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanothermobacter* e da família *Methanomicrobiaceae* contendo o gênero *Methanoplanus*.

A Tabela 12 apresenta a classificação das sequências analisadas nos tratamentos contendo 70% e 30% de feno e de silagem a partir do banco RDP. Nesta tabela, observa-se que o tratamento contendo 70% de silagem apresentou a família *Methanomicrobiaceae*, ausente nas análises feitas nos outros tratamentos e muitos microrganismos desconhecidos, que possivelmente devido à carência de

padrões conhecidos, não foram classificados dentro do Domínio Archaea. O tratamento com 70% de feno apresentou maior número de sequências de arqueias ainda não identificadas, incluindo algumas relacionadas com Euryarchaeotas não classificadas. Embora a proporção dos alimentos volumosos tenha sido a mesma nas dietas, o feno é uma forragem mais grosseira que permite determinar uma taxa de passagem da fibra mais lenta, que proporciona um maior número de microrganismos celulolíticos no rúmen (BRYANT & BURKEY, 1953), além disso, o feno moído permite maior amplitude de ação dos microrganismos sobre a fibra (SILVA et al., 2007). Os tratamentos contendo 30% de volumoso demonstraram menor diversidade visto que apresentaram menos clones similares a diferentes gêneros e, além disso, obtiveram menor número de sequências desconhecidas, como comprovado pelas análises do BLAST. Os tratamentos contendo 70% de volumoso apresentaram maior diversidade de microrganismos e pelas análises do BLAST foram os que demonstraram maior número de arqueias desconhecidas ou não classificadas. As sequências dos organismos não classificados agrupados com alguns gêneros de arqueias são indicadores importantes de que possam pertencer a grupos de microrganismos não cadastrados no banco de dados ou ainda não identificados.

De acordo com WOLIN et al. (1997) diversas espécies de metanogênicas têm sido isoladas dos ruminantes, mas considerando o alto número de microrganismos no ambiente ruminal é provável que a maioria ainda necessite de identificação.

**Tabela 12.** Classificação das sequências dos tratamentos com feno e silagem analisados no banco de dados RDP

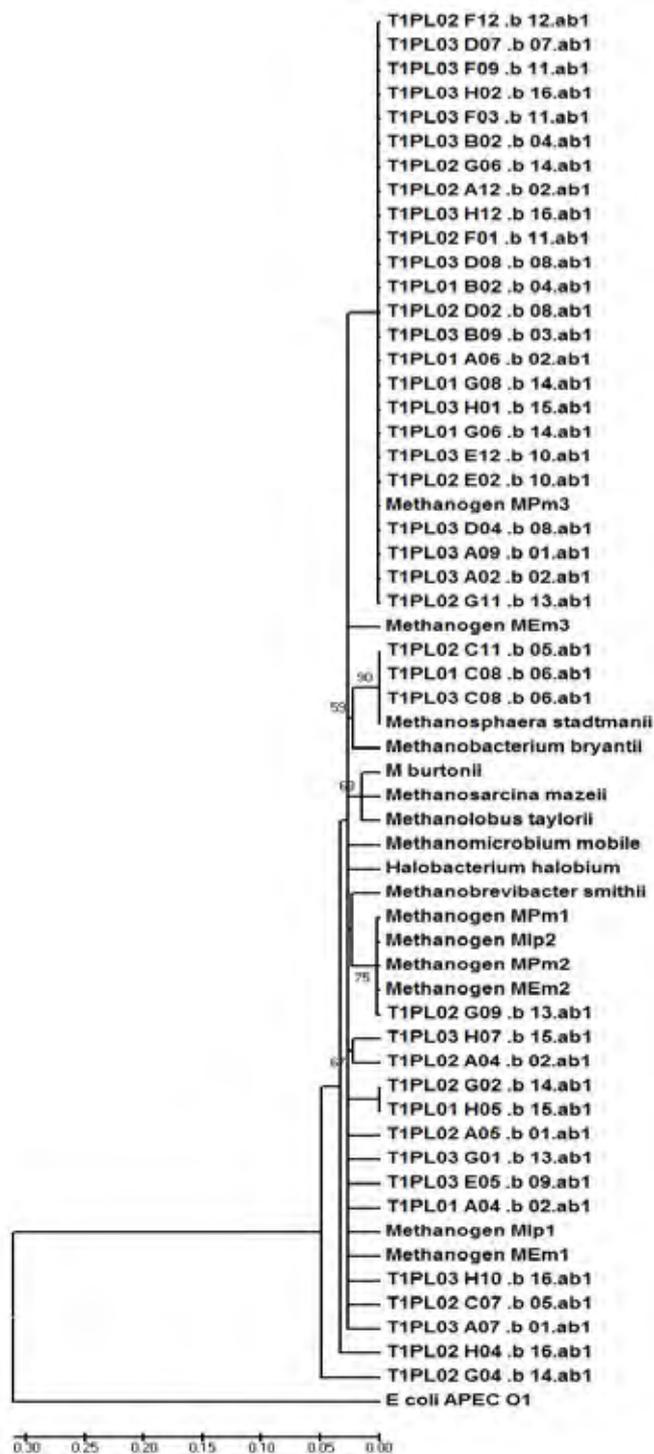
Tratamento com 70% de Fe	Sequências	Tratamento com 30 % de Fe	Sequências
Domínio Archaea	180	Domínio Archaea	72
Filo Euryarchaeota	180	Filo Euryarchaeota	72
Classe Methanobacteria	177	Classe Methanobacteria	72
Ordem <i>Methanobacteriales</i>	177	Ordem <i>Methanobacteriales</i>	72
Família <i>Methanobacteriaceae</i>	177	Família <i>Methanobacteriaceae</i>	72
Gênero <i>Methanothermobacter</i>	4	Gênero <i>Methanosphaera</i>	32
Gênero <i>Methanosphaera</i>	2	Gênero <i>Methanobrevibacter</i>	22
Gênero <i>Methanobrevibacter</i>	17	Methanobacteriaceae não classificadas	18
Methanobacteriaceae não classificadas	154	-	-
Euryarchaeota não classificadas	3	-	-
Microrganismos desconhecidos	19	Microrganismos desconhecidos	3
Tratamento com 70% de Si	Sequências	Tratamento com 30 % de Si	Sequências
Domínio Archaea	98	Domínio Archaea	103
Filo Euryarchaeota	98	Filo Euryarchaeota	103
Classe Methanobacteria	65	Classe Methanobacteria	103
Ordem <i>Methanobacteriales</i>	65	Ordem <i>Methanobacteriales</i>	103
Família <i>Methanobacteriaceae</i>	65	Família <i>Methanobacteriaceae</i>	103
Gênero <i>Methanobrevibacter</i>	3	Gênero <i>Methanobrevibacter</i>	68
Gênero <i>Methanosphaera</i>	62	-	-
-	-	Methanobacteriaceae não classificadas	35
Methanomicrobiaceae não classificadas	30	-	-
Classe Methanomicrobia	33	-	-
Ordem <i>Methanomicrobiales</i>	32	-	-
Família <i>Methanomicrobiaceae</i>	32	-	-
Gênero <i>Methanoplanus</i>	3	-	-
Microrganismos desconhecidos	112	-	-

Uma matriz de similaridade das sequências alinhadas foi gerada pelo programa MEGA, agrupando em possíveis OTUs que podem ser observados nas Figuras 30, 31, 32, 33 e 34. Na Figura 30 pode-se verificar que grande parte das sequências se encontrou agrupada junto a organismos metanogênicos não identificados e os padrões de espécies mais próximo a que se associaram foram *M. stadtmannae* e *M. bryantii*. No filograma da Figura 31 parte das sequências foi

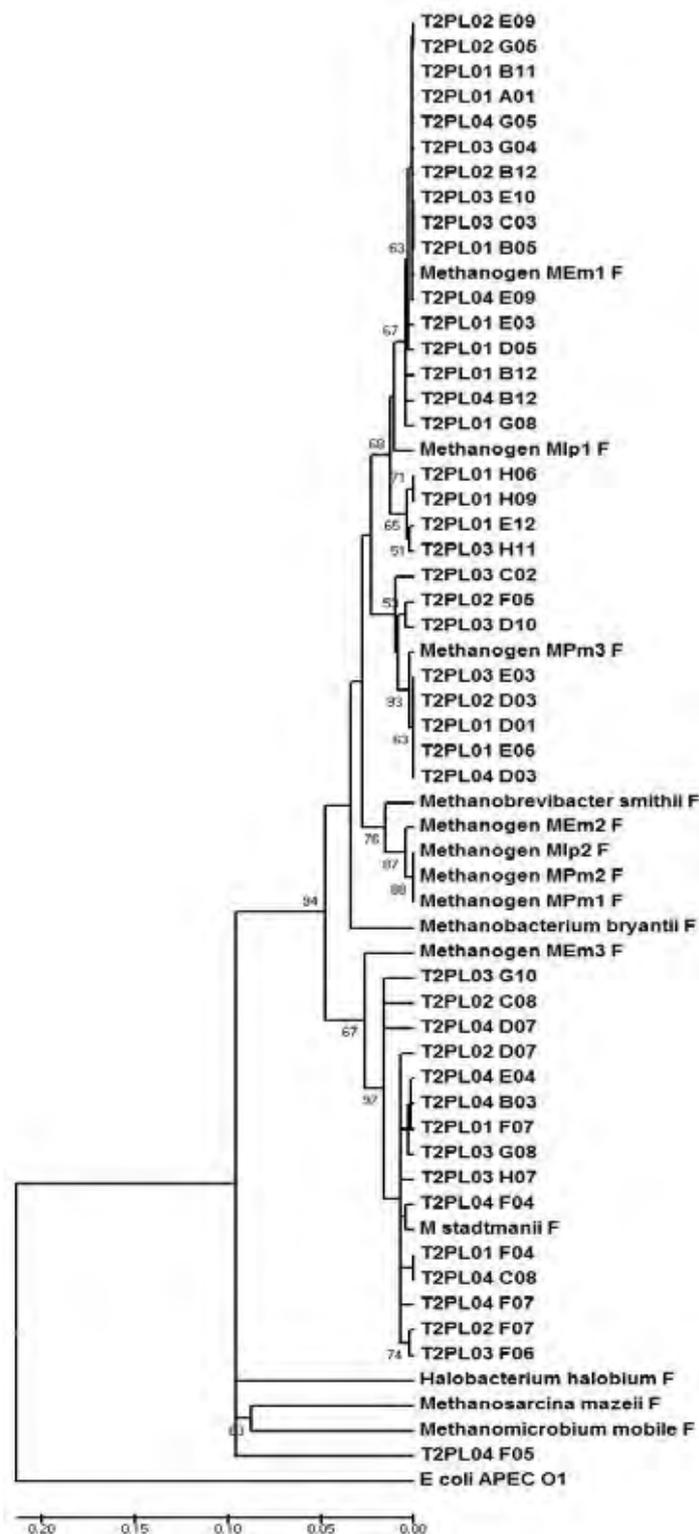
agrupada próxima à *M. smithii*, outras à *M. stadtmanae* e uma foi similar à *M. mobile* sendo que a maioria das sequências se agruparam com metanogênicas desconhecidas. O filograma referente à Figura 32 determinou que a maioria das sequências foram agrupadas junta à *M. stadtmanae*, outras agruparam-se próximas aos padrões *M. mobile*, *M. mazeii* e *H. halobium*, entretanto, o tratamento com 70% de silagem de milho foi o que apresentou maior número de sequências desconhecidas pelas análises do BLAST e seu filograma não representa esta realidade visto que foi necessário eliminar muitas sequências para que esta árvore pudesse ser gerada, assim foi importante inserir a Figura 33 que apresenta todas as sequências, porém sem os respectivos padrões. Este problema pode ter ocorrido devido à falta de mais padrões de arqueias necessários para se determinar o alinhamento. Na Figura 34, puderam ser observados muitos clones agrupados com microrganismos metanogênicos desconhecidos e outros que se agruparam junto aos padrões *M. smithii*, *M. bryantii*, *M. stadtmanii* e *M. mazeii*.

WHITFORD et al. (2001) estudaram a filogenia de organismos metanogênicos do rúmen de bovinos alimentados com 65% de dieta volumosa contendo feno de alfafa e silagem de milho e 35% de concentrado e a partir da análise de 41 sequências de 16S rDNA determinaram a relação entre espécies e clones, sendo que a maioria se agrupou junto à *M. ruminantium* e alguns à *M. stadtmanae*. Diferente deste trabalho, eles não encontraram nenhum clone referente à classe Methanomicrobia. Entretanto PEI et al. (2008), analisando diversidade de arqueias no rúmen de bois por meio de sequências 16 S rRNA, obtiveram OTUs e fizeram comparações com sequências depositadas no GenBank. Foi verificada pela análise filogenética a presença de clones que se relacionaram a microrganismos dos gêneros *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosphaera* e *Methanomicrobium* e, além disso, eles determinaram sequências de arqueias desconhecidas e sugeriram que isto possa indicar a existência de outras espécies de metanogênicas no rúmen. TAJIMA et al. (2001) estudaram a diversidade molecular de arqueias do rúmen de bovinos e analisaram sequências 16S rRNA. Eles utilizaram dois pares de primers para a montagem das bibliotecas e verificaram diversas sequências similares aos gêneros *Methanomicrobium* e *Methanobrevibacter*. De forma semelhante, SKILLMAN et al. (2006) amplificaram por PCR genes 16s rRNA de arqueias utilizando primers específicos para arqueias,

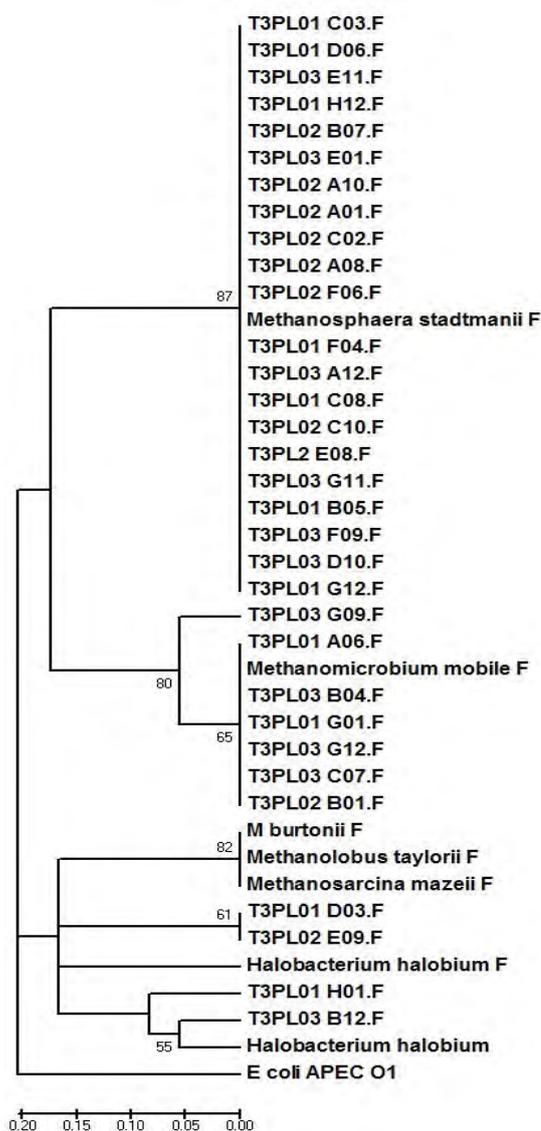
montaram bibliotecas e sequenciaram os clones. Eles determinaram sequências similares a várias espécies de arqueias entre elas *Methanobrevibacter. ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanobrevibacter thaueri* e *Methanosphaera stadtmanii*, com este estudo eles sugeriram que a diversidade dos microrganismos metanogênicos pode ser afetada pela seletividade dos primers utilizados. WRIGHT et al. (2007) verificaram a diversidade molecular de arqueias no rúmen de bovinos provenientes de duas localizações geográficas no Canadá. Entre as diversas sequências analisadas foram verificadas algumas similares à *M. ruminantium* e clones não identificados. Outras sequências foram similares às ordens *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales* e *Methanosarcinales*, porém, eles não encontraram nenhuma sequência similar aos gêneros *Methanobacterium*, *Methanomicrobium* e *Methanosarcina*. Estudos anteriores realizados por SHIN et al. (2004) e TAJIMA et al. (2001), detectaram várias espécies pertencentes a estes gêneros. Alguns estudos mostraram que a maioria dos microrganismos metanogênicos detectados no rúmen pertencem à família *Methanobacteriaceae* e frequentemente as espécies mais encontradas são as do gênero *Methanobrevibacter* (SKILLMAN et al., 2004; WRIGHT et al., 2004). OHENE-ADJEI et al. (2007) efetuaram estudos filogenéticos de sequências de metanogênicas do rúmen de ovinos e também utilizaram o Ribossomal Database, além de analisarem bibliotecas pelo software DOTUR. Como neste trabalho, eles encontraram uma prevalência de sequências de clones relativos à família *Methanobacteriaceae*. SHIN et al. (2004), analisaram a filogenia de arqueias presentes no fluido, sólido e epitélio ruminal de bovinos por meio de primers específicos para arqueias. No epitélio e no fluido eles determinaram um grupo maior de clones que se assemelhou à família *Methanomicrobiaceae*, já no sólido ruminal a maioria dos clones se agrupou próximo à família *Methanobacteriaceae*, sendo também encontradas metanogênicas não identificadas.



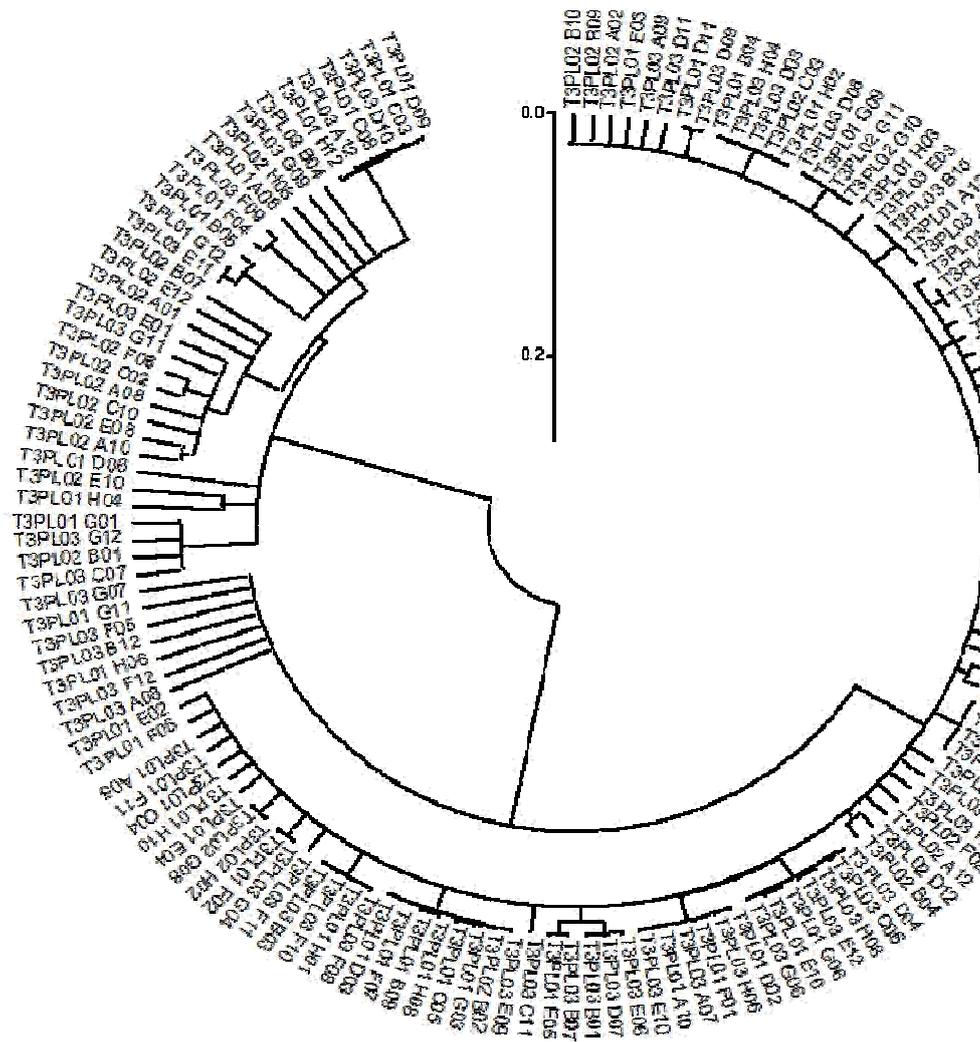
**Figura 30.** Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA do tratamento com 70% de feno, agrupado por filo. O eletroforograma foi construído a partir de uma matriz de distância Jukes-Cantor pelo método Neighbor-Joining. A escala representa o número de substituições por base.



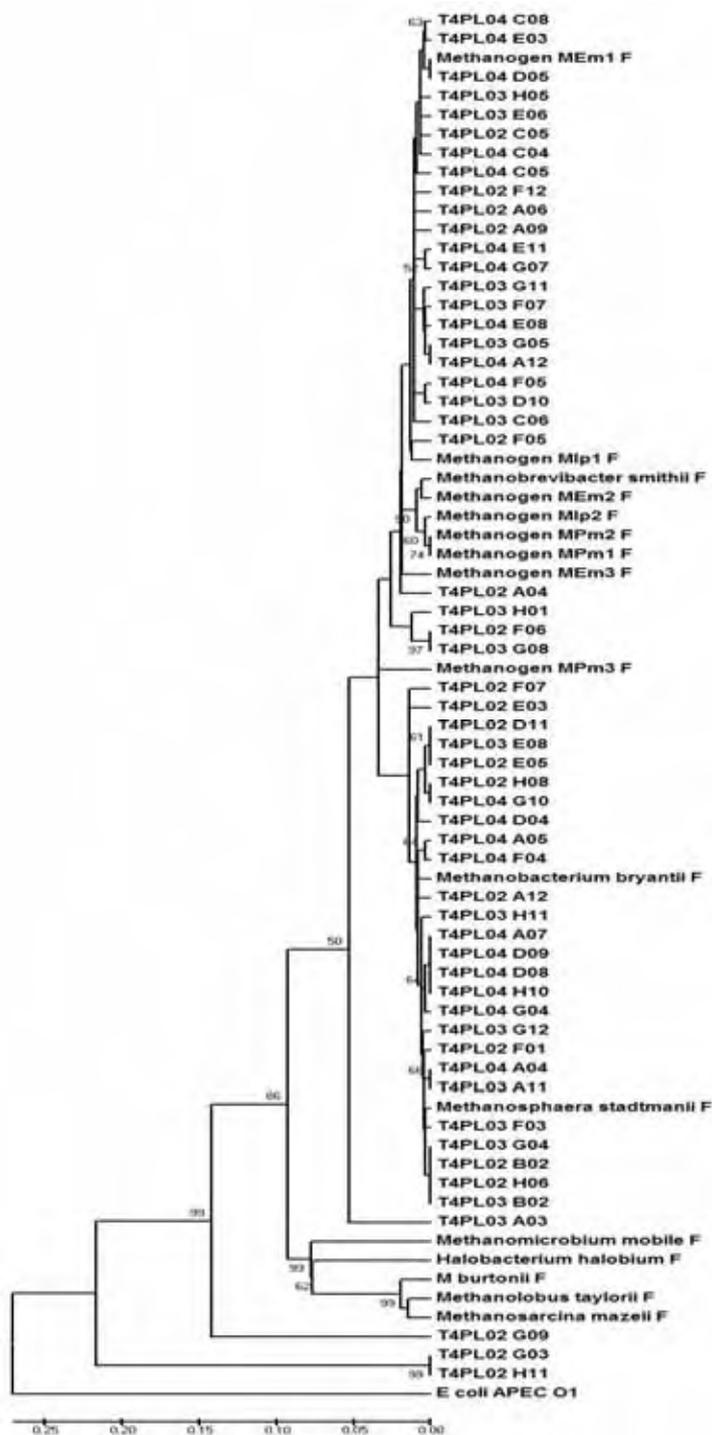
**Figura 31.** Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA do tratamento com 30% de feno, agrupado por filo. O eletroforograma foi construído a partir de uma matriz de distância Jukes-Cantor pelo método Neighbor-Joining. A escala representa o número de substituições por base.



**Figura 32.** Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA do tratamento com 70% de silagem, agrupado por filo. O eletroforograma foi construído a partir de uma matriz de distância Jukes-Cantor pelo método Neighbor-Joining. A escala representa o número de substituições por base.

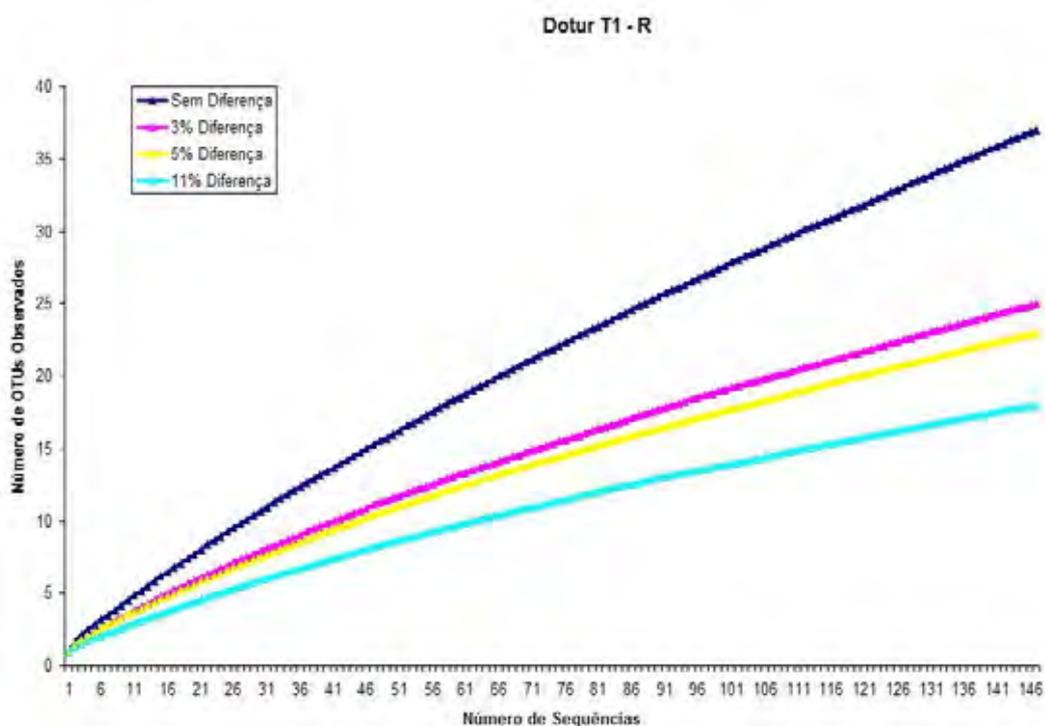


**Figura 33.** Filograma de sequências parciais de 16S rDNA do tratamento com 70% de silagem, agrupado por filo. O eletroforograma foi construído a partir de uma matriz de distância Jukes-Cantor pelo método Neighbor-Joining. A escala representa o número de substituições por base.

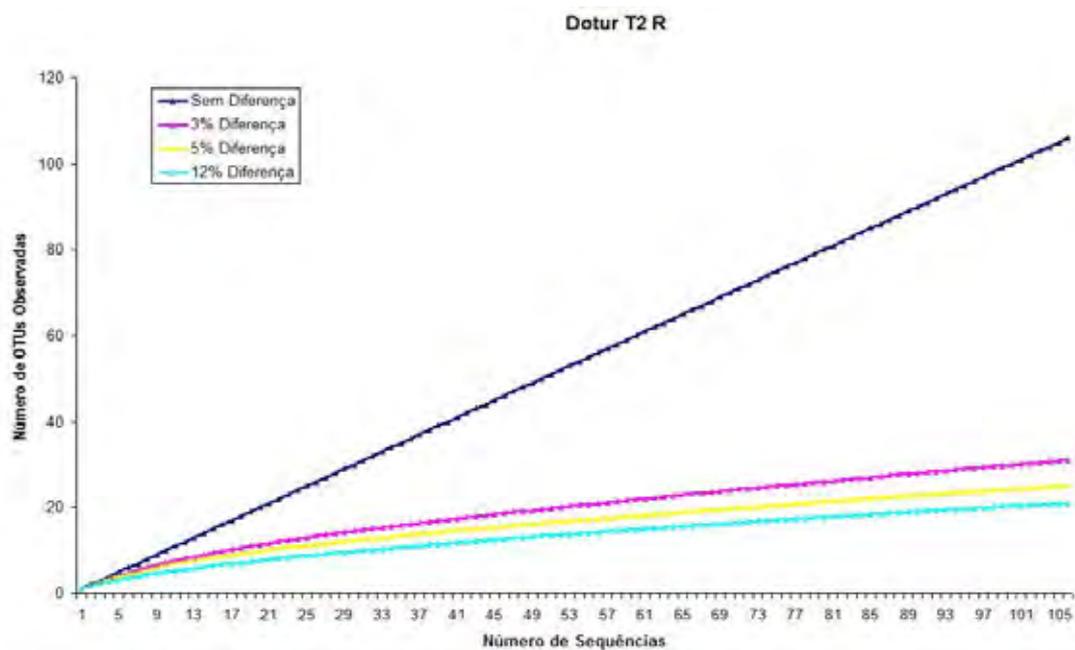


**Figura 34.** Filograma de seqüências parciais de 16S rDNA do tratamento com 30% de silagem, agrupado por filo. O eletroforograma foi construído a partir de uma matriz de distância Jukes-Cantor pelo método Neighbor-Joining. A escala representa o número de substituições por base.

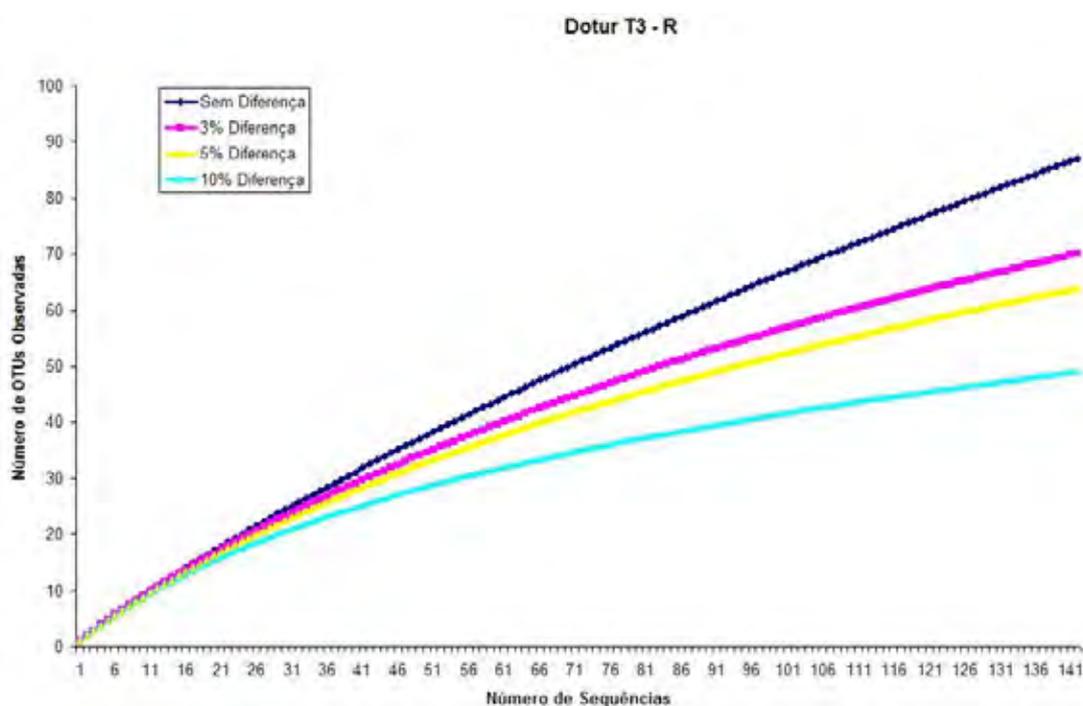
As análises do programa DOTUR permitiram obter relação entre 25 sequências referentes a espécies no tratamento com 70% de feno (T1), 23 sequências referentes a gêneros e para famílias foi determinada relação de 18 sequências (Figura 35). No tratamento contendo 30% de feno (T2) foram determinadas 31 sequências relativas a espécies, 25 sequências a gêneros e 21 para famílias (Figura 36). Para o tratamento com 70% de silagem (T3) foram determinadas 70 sequências referentes a espécies, 64 sequências para os gêneros e 43 sequências entre famílias (Figura 37). No tratamento composto por 30% de silagem (T4) a variação entre as sequências analisadas foi bastante baixa sendo 5 sequências referentes a espécies, 4 sequências referentes a gêneros e 3 referentes a famílias (Figura 38).



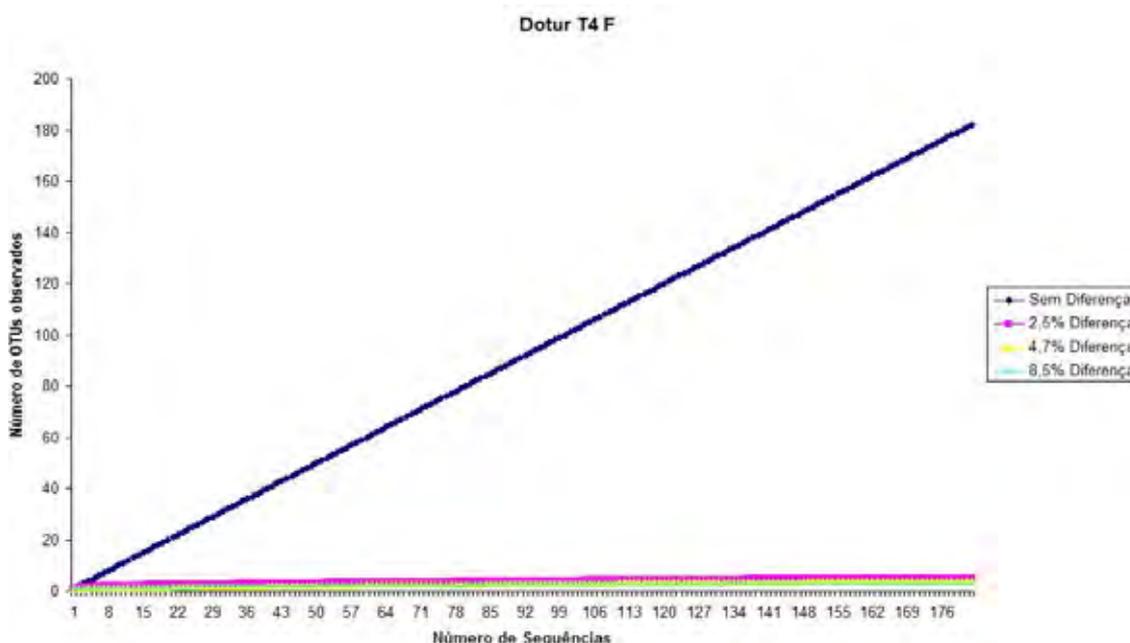
**Figura 35.** Curva de Rarefação das análises do Dotur usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências da biblioteca 16S rDNA do tratamento T1 (70% de feno).



**Figura 36.** Curva de Rarefação das análises do Dotur usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências da biblioteca 16S rDNA do tratamento T2 (30% de feno).



**Figura 37.** Curva de Rarefação das análises do Dotur usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências da biblioteca 16S rDNA do tratamento T3 (70% de silagem).



**Figura 38.** Curva de Rarefação das análises do Dotur usando Algoritmo Neighbor-Joining nas sequências da biblioteca 16S rDNA do tratamento T4 (30% de silagem).

No presente trabalho, no tratamento T1 foram verificadas aproximadamente 37 sequências de clones que não apresentaram diferenças entre si, no tratamento T2, foram observadas mais de 100 sequências que não se diferenciaram entre si, no tratamento T3, mais de 80 sequências de clones não foram diferenciadas e no tratamento T4, a diversidade foi bem baixa devido ao elevado número de sequências iguais, que foi de aproximadamente 180. Estes resultados confirmaram as análises feitas pelo BLAST e pelo banco de dados RDP que mostraram maior diversidade nos tratamentos contendo 70% de volumoso e determinaram que houve variação da fauna microbiana no rúmen em relação aos diferentes tratamentos, como comprovado anteriormente pelas análises de produção de metano, AGCC e desaparecimento da MS e nutrientes das dietas.

## 5. CONCLUSÕES

- A mensuração *in vitro* dos gases permitiu avaliar a produção de CH<sub>4</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, além dos gases totais, em dietas com diferentes proporções volumoso:concentrado, determinando que houve variação na produção de metano e na microbiota ruminal quanto às dietas fornecidas aos animais, visto que as dietas contendo 70% de feno e silagem, apresentaram maior produção de metano e maior relação C2:C3 em relação às dietas com 70% de concentrado;
- A aplicação da metagenômica, a utilização da região conservada rDNA 16S e o sequenciamento de arqueias presentes na fração sólida do conteúdo ruminal, permitiram a detecção de sequências de clones que se aproximam de alguns padrões de arqueias ruminais conhecidos sendo que a maioria dos clones foram referentes a microrganismos não cultiváveis ou desconhecidos;
- As sequências de primers referentes às ORFs associadas à enzima CHO-MFR detectaram maior número de amplificações nos tratamentos com 70% de volumoso;
- As dietas contendo maior proporção de alimento volumoso foram as que apresentaram maior diversidade de arqueias metanogênicas no rúmem dos bovinos, sendo que a dieta com 70% de silagem de milho apresentou maior diversidade filogenética das arqueias ruminais.

## 6. REFERÊNCIAS

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHEHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Ottawa, v. 59, p. 143-169, 1995.

AN, D.; DONG, X.; DONG, Z. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. **Anaerobe**, Los Angeles, v. 11, p. 207-215, 2005.

ANNISON, E. F.; ARMSTRONG, D. G. **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant**. England: Oriel Press, 1970. 422p.

ARAÚJO, J.S.; PEREZ, J.R.O.; PAIVA, P.C.A.; PEIXOTO, E.C.T.M.; BRAGA, G.C.; OLIVEIRA, V.; VALLE, L.C.D. Efeito da monensina sódica no consumo de alimentos e pH ruminal em ovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 39-43, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – **AOAC**. Official methods of analysis. 16. ed. Arlington: Patricia Cunniff, 1995. 1025 p.

ASTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Evolution and Biodiversity** – The origins of life. In: ATLAS, R.M.; BARTHA, R. (Ed). *Microbial ecology: fundamentals and applications* 4 th. Ed., Menlo Park, California: Book News, 1997, p. 37-39.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D. (Eds.) (1999), **Short protocols in molecular biology**: A Copenhium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 14<sup>th</sup> ed. New York : John Wiley, 1104p.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 83, p. 653-661, 2005.

BEUVINK, J. M. W.; SPOELTRA, S. F. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms "in vitro". **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 37, p. 505-509, 1992.

BIANCHINI, W.; RODRIGUES, E.; JORGE, A.M.; ANDRIGHETO, C. Importância da fibra na nutrição de bovinos. **Revista electrónica de Veterinaria**, v. 02, p.1 - 14, 2007.

BLÜMMEL, M.; STEINGASS, H.; BECKEN, K. "In vitro" gas production: a technique revisited. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 77, p. 24-34, 1997.

BLÜMMEL, M.; GIVENNS, D.I.; MOSS, A.R. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. **Animal Feed Science and technology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 379-390, 2005.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wiscosin. **Applied and Environmental Microbioloy**, Washington, v. 62, n. 6, p. 935-943, 1996.

BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Optimal mineral composition of artificial saliva for fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microorganisms. **Animal Feeding Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, p. 43-55, 1999.

BRUNI, M.A.; CHILIBROSTE, P. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. In: REUNIÓN LATINOAMERICANO DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15, 2000. **Anais...**

BRYANT, M.P.; BURKEY, L.A. Number and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different rations. **Journal Dairy Science**., Champaign, v. 36, p. 213-218, 1953.

BUENO, I.C.S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D.M.S.S.; ABDALA, A.L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and technology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 95-105, 2005.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 573–606, 2000.

CAETANO, L. **Proposição de um sistema modificado para quantificação de biogas**. 1985. 75f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia, 1998 (disponível [http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/estudos\\_biotec\\_textos.htm](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/estudos_biotec_textos.htm)). Acesso em 27 de agosto de 2006.

CARRÉ, B.; BRILLOUET, J.M. Yield and composition off cell wall residues isolated from various feedstuffs used for non-ruminants farm animals. **Journal Science and Food Agriculture**, Essex, v.37, p.341-351, 1986.

CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; VELOSO, C.M.; SILVA, F.F.; SILVA, R.R. Degradabilidade ruminal do feno de forrageiras tropicais. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 81-85, 2006.

CARVALHO NETO, O.V. Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16S rDNA. 2007.52f. Dissertação (**Dissertação em Microbiologia Agrícola**) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CAZAR, R. A. An exercise on chemometrics for a quantitative analysis course. **Journal of Chemical Education**, Washington, v.9, 1026-1029, 2003.

CHAI, W.Z.; GELDER, A.H.; CONE, J.W. Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. **Animal Feed Science and Technology**, v.114, n.2, p. 195-204, 2004.

CHAPAVAL, L.; MELOTTI, L.; ROSSI JÚNIOR, P.; OLIVINDO, C. S.; REGO, A. J.P. Relação volumoso concentrado sobre as concentrações ruminais de amônia, pH e ácidos graxos voláteis em vacas leiteiras mestiças. **Revista Brasileira de Saúde Animal**, v. 9, n1, p. 18-28, 2008.

CHERNEY, D. J. R.; SICILIANO, J. J.; PELL, A. N. Technical note: forage "in vitro" dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 1335-1338, 1993.

CHILIBROSTE, P.; WILLIAMS, B.A.; TAMMINGA, S.; CALABRO, S. The use of cumulative gas production technique to characterize changes in the fermentation characteristics of rumen contents following variable periods of starvation and grazing in dairy cows. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 647-655, 1999.

CHRISTOPHERSEN, C.T.; WRIGHT, A.D.; VERCOE, P.E. In vitro methane emission and acetate:propionate ratio are decreased when artificial stimulation of the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. **Journal Animal Science**, Champaign, v.86, n.2, p. 384-389, 2008.

CHURCH, D.R.; POND, W.G. **Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977. 462 p.

CHURCH, D.C. **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición. Metabolismo de la proteína en lo ruminantes**. Zaragoza: ACRIBIA, 1993. p.255-258.

CHURCH, D. C. **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Ed. Acribia. Zaragoza, 1998. 630 p.

COLEMAN, G.S. Rumen entodiniomorph protozoa. In: TAYLOR, A.E.R.; BAKER, J.R. (Eds.) **The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion**. Armidale: Penambul Books, 1978. p. 13.

CZERKAWSKI, J.W.; HARFOOT, C.G.; BRECKENRIDGE, G. The relationship

between methane production and concentrations of hydrogen in the aqueous and gaseous phases during rumen fermentation "in vitro". **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 35, p. 537-551, 1972.

DEMEYER, D. I.; VAN NEVEL, C. J. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation, and its control. In: McDONALD, I. W.; WARNER, A. C. I. (Eds.) **Digestion and metabolism in the ruminant**. Armidale: The University of New England Publishing Unit, 1975. p. 366-382.

DER, G.; EVERITT, B.S. **A handbook of statistical analysis using SAS**. 2<sup>o</sup>ed.: Chapman&Hall/CRC, 2001, 376p.

DUNBAR, J.; BARNS, S.M.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.4, p. 1662-1669, 1999.

EMBLEY, T.M.; FINLAY, B.J.; THOMAS, R.H.; DYAL, P.L.: The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. **Journal of General Microbiology**, London, 1992, v. 138, p. 1479-1487.

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

EWING, B. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p. 186-194, 1998.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p. 175-185, 1998.

EZEQUIEL, J.M.B.; MELÍCIO, S.P.L.; SANCANARI, J.B.D.; FERREIRA, R.N.; FEITOSA, J.F. Quantificação das bactérias sólido-aderidas, bactérias e protozoários líquido-associados do rumen de bovinos jovens alimentados com amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 707-715, 2002.

FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, C. D. (Ed.). **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993. p. 305-337.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cernagen, 1998. p. 23-51.

FINLAY, B.J.; ESTEBAN, G.; CLARKE, K.J.; WILLIAMS, A.G.; EMBLEY, T.M; HIRT, R.P. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, Delft, v.117, p.157-161, 1994.

FORBES B.A. Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory – development, evaluation, and validation. **Archives of Pathology**, Chicago, v.127, p.1106-1111, 2003.

FORSTER, R.J.; GONG, J.; TEATHER, R.M. Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 63, p.1256-1260, 1997.

FRANCE, J.; SIDONS, R. C. Volatile fatty acid production. In: FORBES, J.M. J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Cambridge: Cambridge University Press, p.107- 121, 1993.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D.E. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. v.1, 583p.

GASTALDI, K.A. **Produção *in vitro* de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações**. 2003. 95f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. 2001 **Desenvolvendo bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia**. Campus, Rio de Janeiro, 440 pp.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p.66.

GORDON, D.; ABAJIAN,C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v. 8, p. 195-202, 1998.

GRIFFIN, D.W.; KELLOGG, C.A.; PEAK, K.K. &SHINN, E. A. A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v 34. 210-214, 2002.

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. et al. **Análise multivariada de dados**. 5a.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 593p.

HALES, B.A., EDWARDS, C., RITCHIE, D.A., HALL, G., PICKUP, R.W. AND SAUNDERS, J.R. (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 668–675.

HARPER, L.A.; DENMEAD, O.T.; FRENEY, J.R.; BYERS, F.M. Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77, p.1392-1401, 1999.

HEGARTY, R.S. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. Australian **Journal Agricultural Research**, Melbourne, v.50, p. 1299-1305, 1999.

HENDRICKSON, E.L.; KAUL, R.; ZHOU,Y.; BOVEE, D.; CHAPMAN, P.; CHUNG, J.; CONWAY DE MACARIO, E.; DODSWORTH,J.A.; GILLETT,W.; GRAHAM,D.E.; HACKETT, M.; HAYDOCK, A.K.; KANG, A.; LAND, M.L.; LEVY, R.; LIE, T.J.; MAJOR, T.A.; MOORE, B.C.; PORAT, I.A.; PALMEIRI, G.; ROUSE, C.; SAENPHIMMACHAK, D.; SÖLL, S.; VAN DIEN, T.; WANG, W.; WHITMAN, B.; XIA,Q.; ZHANG, Y.; LARIMER, F.W.; OLSON, M.V.; LEIGH, J.A. Complete Genome Sequence of the Genetically Tractable Hydrogenotrophic Methanogen *Methanococcus maripaludis*. **Jounal of Bacteriology**, Washington, v. 186, p. 6956–6969, 2004.

HENSIEK, R.; KRUPP, G.; STACKEBRANDT, E. Development of diagnostic

oligonucleotide probes for four lactobacillus species occurring in the intestinal tract. Syst. **Applied Microbiology**, Washington, v. 15, p. 123-128, 1992.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A.B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; BRADLEY, S.B.S. **Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans**. Washington, v.68, n.9, p. 4431 - 4440, 2002.

HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional. 1997, 719p.

HONGO, Y.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera, Rhinotermitidae). **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.44, p. 231–242, 2003.

HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.69, n.10, p. 2755-2766, 1986.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765-4774, 1998a.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 278-285, 1998.

ISHINO, Y.; KOMORI, K.; CANN, I.K.O.; KOGA, Y. A novel DNA polymerase family found in *Archaea*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.2232-2236, 1998.

ÍTAVO, L.C.V.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, F.F. Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente de feno de gramíneas do gênero *Cynodon* e rações concentradas utilizando indicadores internos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.2, p.1024-1032, 2002 (suplemento).

JARVIS, G.N.; STROMPL, C.; BURGESS, D.M.; SKILLMAN, L.C.; MOORE, E.R.; JOBLIN, K.N. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. **Current Microbiology**, 2000; v. 40, p. 327–332.

JOBLIN, K.N. Rumen acetogens and their potention to lower ruminant methane emissions. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.50, p. 1307-1313, 1999.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 2483-2492, 1995.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1992. 642p.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, Bangalore, v.89, p.124-134, 2005.

KENDALL, M.G. Discrimination and classification: *In*: Krishnaian (Ed.), Proc. Int. Symp. on **Multivariates Analysis**, New York, Academic Press, 165-185, 1969.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 211-236, 2002.

KÖSTER, H. H.; COCHRAN, R. C.; TITGEMEYER, E. C. Effect of increasing degradable intake protein on intake and digestion of low quality, tallgrass-praire forage by beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.74, n.10, p.2473-2481, 1996.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 1 ed. Santa Maria: UFSM. 2002, 140p.

LANA, R.P.; RUSSEL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 2190-2196, 1998.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, p.254-260, 2001.

LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005, 343p.

LASSEY, K.R.; ULYATT, M.J. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. **Atmospheric Environment**, v. 31, p. 2905-2914, 1997.

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

LUCCI, C. S. **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, 1997. p.298.

MA, J.; KALE, Y.; ELLIS, L.D. **C<sub>1</sub> Metabolic Cycle Pathway Map**. Disponível em: <[http://umbbd.msi.umn.edu/C1cyc/C1cyc\\_map.html](http://umbbd.msi.umn.edu/C1cyc/C1cyc_map.html)> Acesso em: 15/06/2008.

MACHMÜLLER, A. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.112, p.107-114, 2006.

MANFIO, G.P. 1998. **Biodiversity: Perspectives and Technological Opportunities**. Capítulo 9: Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicacoes/padctbio/cap9/>>. Acesso em 27 de maio de 2005.

MARTIN, C.; WILLIAMS, A.G.; MICHALET-DOREAU, B. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. **Journal Animal Science**, Champaign, v.72, p.2962-2968, 1994.

MASON, R. L.; CHOU, Y.M.; YOUNG, J. C. Applying Hotelling's  $T^2$  statistic to batch processes. In: **Journal of Quality Technology**, v. 33, p. 466-479, 2001.

MAURICIO, R.M.; ABDALLA, A.L.; VITTI, D.M.S.S.; OWEN, I.A.N. Uso de líquido do rúmen e fezes como fonte de inóculo para a técnica "in vitro" de produção de gás. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998. Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, v. 1, p. 314-316.

MCALLISTER, A.T.; OKINE, E.K.; MATHISON, G.W.; CHENG, K.J. **Dietary,**

**environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants.** Canadian Journal of Animal Science, Ottawa, v.76, p. 231-243, 1996.

MENKE, K. H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and "in vitro" gas production using rumen fluid. **Animal Research Development**, v. 28, p. 7-55, 1988.

MERRY, R.J.; MCALLAN, A.B. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvest from the liquid and solid fractions of rumen digesta. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 701-709, 1983.

MERTENS, D.R.; ELY, L.O. Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization a dynamic model evolution. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.54, n.04, p. 895-905, 1992.

MERTENS, D.R.; BRODERICK, G.A.; SIMONS, R. Efficacy of carbohydrate sources for improving utilization of N<sub>2</sub> in alfalfa silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77 (Suppl. 1), p.240, 1994.

MERTENS, D.R. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOS DE LEITE, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA-FAEPE, 2001. p.25-36.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse.** Fourth Edition, Mc Graw Hill, New York. 2003. 1819p.

MICKLOS, D.A.; FREYER, G.A.; CROTTY, D.A. **A Ciência do DNA.** New York: Artmed, 2005, 575p.

MILLER, T.L. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. In: ENGELHARDT, W. V., LEONHARD-MAREK, S., BREVES, G., GIESSECKE, D. (Ed). **Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction.** Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag. 1995. p. 317-332.

MOLINA, L.R.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M. Degradabilidade *in situ* das frações fibrosas de silagens de seis genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* L.

Moench) em diferentes estádios de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, p.169-179, 2002.

MOSS, A.R. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.

MURPHY, M. R.; BALDWIN, R. L.; KOONG, L. J. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.55, p.411, 1982.

NAGARAJA, T. G. **Response of the Gut and Microbial Populations to Feedstuffs: The ruminant story**. Pages 64-77 in Proc. 64th Minnesota Nutrition Conference. St. Paul, MN. 2003.

NOCEK, J.E. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Champaign, v.71, n.5, p.2051-2069, 1988.

NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; LIMA, M.L.M. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. v.1, 583p.

OHENE-ADJEI, S.; CHAVES, A.V.; MCALLISTER, T.A.; BENCHAAAR, C.; TEATHER, R.M.; FORSTER, R.J. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. **Microbial Ecology**, New York, v. 13, p. 1-9, 2007.

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

O'MARA, F. Greenhouse gas production from dairying: reduction methane production. **Advances in Dairy Technology**, v. 16, p. 295-309, 2004.

ØRSKOV, E. R.; FLATT, W. P; MOE, P. W. Fermentation balance approach to estimate extent of fermentation and efficiency of volatile fatty acid formation in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 51, p. 1429-1435, 1968.

ØRSKOV, E.R.; RYLE, M. **Energy nutrition in ruminants**. New York: Elsevier Applied Science, 1990. 149p.

OSCAR, T.P.; SPEARS, J.W.; SHIH, J.C.H. Performance, methanogenesis and nitrogen metabolism of finishing steers fed monensin and nickel. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, p. 887-896, 1987.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. **Ruminal fermentation**. In: CHURCH, D.C. (Ed). The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition. 1993. p. 145-171.

PEDREIRA, M.S. **Estimativa da produção de metano de origem ruminal por bovinos tendo como base a utilização de alimentos volumosos: utilização da metodologia do gás traçado hexafluoreto de enxofre (SF<sub>6</sub>)**. 2004. 136f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

PEI, C.; MAO, S.; ZHU, W. Molecular diversity of rumen *Archaea* from Jinnan cattle. **Acta Microbiológica Sinica**, Beijing, v. 48, p. 8-14, 2008.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion "in vitro". **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 1063-1073, 1992.

PEREIRA, M.R. **Diversidade bacteriana de uma latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**. 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R.; AZEVEDO, P.C.N.; CABRAL, G.C.; CORASSA, A. Análise Multivariada das Medidas Morfométricas de Potros da Raça Mangalarga Marchador: Análise de Componentes Principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n.2, p.589 - 599, 2005.

PIRES, E.S.; TEIXEIRA, K.R.S. Construção de bibliotecas de genes para 16s rRNA a partir de amostras ambientais. **Revista Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p.41-45, 2004.

PRADO, I.N.; ZEOULA, L.M.; VINICOR, K.; MEDRONI, S.; NASCIMENTO, W.G. Estudo da viabilidade da redução de análises bromatológicas em trabalhos realizados para determinação do consumo, conversão alimentar e digestibilidade aparente em novilhas confinadas. **Acta Scientiarum**, Vodickova, v. 23, n.4, p. 1069-1073, 2001.

RAISMAN, J.S.; A.M. GONZALEZ. 2006. **Hipertextos del área de la Biología**. Disponível em: <<http://www.biologia.edu.ar/bacterias/arqueobacterias.htm>>. Acesso em 29 de junho de 2008.

RIVERA, A.R. **Estudo da fermentação ruminal por bovinos consumindo feno de Tifton 85 e concentrado com aditivos**. 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

RODRIGUES, L.R.; REIS, R.A.; SOARES FILHO, C.V. Estabelecimento de pastagens de *Cynodon*. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. (Eds). Simpósio sobre manejo da pastagem, 15, 1998, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: FEALQ, 1998, p.115-128.

RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.17, p. 403-409, 1999b.

RUSSELL, J. B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production "in vitro". **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 3222-3230, 1998.

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

SAMBROOK, J; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning** - a laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

SARTI, L.L.; JOBIM, C.C.; BRANCO, A.F.; JACOB, F. Degradabilidade ruminal da matéria seca, da proteína bruta e da fração fibra de silagens de milho e capim

elefante. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 6, p. 1-10, 2005.

SATTER, L.D.; REIS, R.B. **Milk production under confinement conditions**. Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/anais1997/simp/palest10.pdf>> Acesso em: 15/4/2007.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501–1506, 2005.

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. Division of Applied Life Science, Research Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. **Anaerobe**, Los Angeles, v.10, n.6, p. 313-319, 2004.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 235 p.

SILVA, E.A.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A.; PIRES, A.V.; SATO, K.J.; PAES, J.M.V.; LOPES, A.D. Teores de proteína bruta para bovinos alimentados com feno de capim tifton 85: parâmetros ruminais, eficiência de síntese microbiana e degradabilidade *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.1, p.225-236, 2007.

SILVEIRA, E.L. **Identificação de comunidades bacterianas de solo Por seqüenciamento do gene 16S rRNA**. 2004. 62f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SKILLMAN, L.C.; EVANS, P.N.; NAYLOR, G.E.; MORVAN, B.; JARVIS, G.N.; JOBLIN, K.N. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. **Anaerobe**, Los Angeles, v. 10, p. 277–285, 2004.

SKILLMAN, L.C.; EVANS, P.N.; STRÖMPL, C.; JOBLIN, K.N. 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. **Letters Applied**

**Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 222-228, 2006.

SMACCHIA, A. M.; FIGALLO, R. M.; PIDELLO, A. Producción de metano en rumen “in vitro” de vacas lecheras en pastoreo de alfalfa: efectos tiempo de incubación y substrato. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15., 2000. **Anais...**, 2000. 1 CD-ROM.

SOUZA, N.H.; FRANZOLIN, R.; RODRIGUES, P.H.M. et al. Efeito de níveis crescentes de fibra em detergente neutro na dieta sobre a digestão ruminal em bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.5, p.1565-1577, 2000.

SOWERS, K.R. Methanogenic Archaea: an overview. In: Archaea – a laboratory manual. **Methanogens**. Sowers, K. R. & Schreier, H. J. (eds). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 3-13, 1995.

STACKEBRANDT, E. W.; FREDERIKSEN, G. M.; GARRITY, P. A.; GRIMONT, P.; KAMPFER, M. C.; MAIDEN, X.; NESME, R.; ROSSELLO-MORA, J.; SWINGS, H. G.; TRUPER, L.; VAUTERIN, A. C.; WARD & WHITMAN, W. B. 2002. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p.1043 -1047, 2002.

STATISTICA. **Data analysis software system**. Version 7. StatSoft, Inc., 2004. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; CAMARDELLI, M.M.L.; DETMANN, E.; EIFERT, E.C; NUNES, P.M.M.; OLIVEIRA, M.V. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n.4, 2004.

TAJIMA, K.; AMINOV, R.I.; NAGAMINE, T.; OGATA, K.; NAKAMURA, M.; MATSUI, H.; BENNO; Y. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rRNA libraries. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, n.29, p. 159-169, 1999.

TAJIMA, K.; ARAI, S.; OGATA, K.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; AMINOV, R.I.; BENNO, Y. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. **ANAEROBE**, Los Angeles, n.6, p. 273 -284, 2000.

TAJIMA, K.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; AMINOV, R.I. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. **FEMS Microbiology Letters**, Delft, n.12, v.1, p. 67-72, 2001.

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 1, p.345-357, Jan. 1992.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA)**: software version 4.0, 2007.

TEN KATE, K. & LAIRD, S. A. 1999. **The commercial use of biodiversity**. Earthscan Publications Ltd. London, U.K.

TEWATIA, B. S.; KHATTA, V. K.; VIRK, A. S.; GUPTA, P. C. Use of mulberry leaves (*Morus alba* L.) as natural protein protectant in ration of growing buffalo calves. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v.50, p.457, 1997.

THAUER, R.K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. **Microbiology**, v. 144, p. 2377–2406, 1998.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. **Animal Feed Science and technology**, Amsterdam, v.48, n.1, p. 185-197, 1994.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p. 4673-4680, 1994.

ULYATT, M.J.; LASSEY, K.R. Methane emissions from pastoral systems: the situation in New Zealand In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 15.,

2000. **Anais...** 2000. 1 CD-ROM.

URBANIAK, M.; PRZYBECKI, T. Effect of dehydrated alfafa on ruminal characteristics and amino acids flow trough lambs' duodenum. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.54, p.121, 1995.

U.S.EPA. **Evaluation ruminant livestock efficiency projects and programs: peer review draft**. Washington, DC. June, 2000.

USHIDA, K.; JOUANY, J.P. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v.23, p.129-132, 1996.

VAL, J.E.; FERRAUDO, A.S.; BEZERRA, L.A. F.; M.P. CORRADO, M.P.; R.B. LÔBO, R.B. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.3, p.705-712, 2008.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. v.1, 583p.

VAN KESSEL, J. A.; RUSSELL, J. B. The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 20, p. 205-210, 1996.

VAN SOEST, P.J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forages. **Journal Animal Science**, Champaign, v.26, v1, p. 119 -128, 1967.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B; LEWIS, B.A Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber , and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.10, p.3583 -3597, 1991.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VAZOLLER, R.F.; MANFIO, G.P., AND CANHOS, V.P. "Diversidade no Domínio Archaea." In Canhos, V.P. and Vazoller, R.F. (eds), **Microrganismos & Virus**, v. 1. Série Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do

século XX Org. by Joly, C.A. and Bicudo, C.E.M., Editora WinnerGraph & FAPESP, São Paulo, (1999) p. 118.

VELHO, J.P.; MÜHLBACH, P.R.F.; GENRO, T.C.M. Alterações bromatológicas nas silagens de milho submetidas a crescentes tempos de exposição ao ar após "desensilagem". **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.916-923, 2006.

VELHO, J.P.; MÜHLBACH P.R.F.; NÖRNBERG, J.L.; IONE MARIA PEREIRA HAYGERT VELHO I.M.P.H; GENRO T.C.M.; KESSLER, J.D. Composição bromatológica de silagens de milho produzidas com diferentes densidades de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36,n. 5, p.1532-1538, 2007.

VELOSO, C.M.; RODRIGUEZ, N.M.; SAMPAIO, I.B.M. et al.pH e amônia ruminais, relação folhas:hastes e degradabilidade ruminal da fibra de forrageiras tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.3, p.871-879, 2000.

VELOSO, I.F.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E.; MOREIRA, E.C. A comparison of three DNA extractive procedures with leptospira for polymerase chain reaction analysis. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , v. 95, n.3, p.339-343, 2000.

VITTORI, A; SILVA, J.F.C.; VASQUEZ, H.M.; MORENZ, M.J.F.; AROEIRA, L.J.M.; GAMA, R.V.F. Frações de carboidratos de gramíneas tropicais em diferentes idades de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2000, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2000, p. 569-571.

ZINDER, S. H. 1993. **Physiological ecology of methanogens**, p. 128-206. *In* J. G. Ferry (ed.), Methanogenesis. Chapman and Hall, London, United Kingdom.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, n. 61, 1999, **Proceedings...**, Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

WHITBY, E.J.; LANYON, C.; GRAY, S.; ROBINSON, J.; MEADOWS, J., EDWARDS, C. The molecular diversity of the methanogenic community in a hypereutrophic freshwater lake determined by PCR-RFLP. **Journal Applied Microbiology**, Oxford,

v.97, p. 973-984, 2004.

WHITFORD, M.F.; FORSTER, R.J.; BEARD, C.E.; GONG, J.; TEATHER, R.M. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. **Anaerobe** , Los Angeles, v. 4, p. 153–163,1998.

WHITFORD, M.F.; TEATHER, R.M.; FORSTER, R.J. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. **Microbiology**, Washington, 2001;v. 1, p. 5, 2001.

WOLIN, M. J.; MILLER, T.L.; STEWART, C.S.: Microbe-microbe interactions. **In: The Rumen Microbial Ecosystem**. Edited by HOBSON, P.N.; STEWART, C.S., 2.ed. p. 467-491. New York: Blackie Academic and Professional, p. 467-491, 1997.

WRIGHT, A.D.G.; WILLIAMS, A.J.; WINDER, B.; CHRISTOPHERSEN, C.T.; RODGERS, S.L.; SMITH, K.D. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1263–1270, 2004.

WRIGHT, A.D.G.; AUCKLAND, C.H.; LYNN, D.H. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 200, n.1, p. 67-72, 2007.

**Anexo 1.** Sequências correspondentes às ORFs Mmp 508, Mmp 1244 e Mmp 1249 obtidas do material genético de arqueias do rúmen de bovinos.

**Mmp 508**

CTCTGGGTCATTTGAAGAGTAGTTGATTCTGGATTCCCGACTGCGGGAGCGTTC  
ATTGGAATTCAGATGTATAATTTTTCAAAGAATTACTAAATTTTAGTAATGATGAT  
CGAATCTACGTTGTAAGCGGAGACTTACAATTGCTTACCCGACGCTTTTCAAATTT  
TAGGTAATGCTACCACAGGAAATAAGGGTTTAAGGATAGAAGACCATGGTAAAA  
TGGCTGCAGGGATCAACCCTTGGGCTCCTGCAGGAGATAATATAAAAGGAGTTC  
GTATAATTTTAGATCCTAAAAAACTGTGAATTATCCCTTACTTCATGCTGGGACAT  
GAATACTGCTAANGTTCTCATAAAGATGCGTATCTGACTTTTGAAAGCNGGAAAG  
GCGNTTTTCGNAGATTTTCGGGGGGTGAACAA

**Mmp 1244**

CATGAGAGTCTCTGTTTCCATTATATCACCCAAAGAACAACCTTCCTTCCATTAATTA  
CTTCGCTTGGTGACAACAAGCAGATTACTAAAAAGTTAATAGAACGGATATACAA  
TATAACAATAAGTATTGACATGGAAAAGTGTATCGCATGTGGCAAATGCCTTGAA  
TGCGAATACGGGGCAATTTCCGGTATATTCCGAAGACATCGGCATATCAATAGAC  
AGGGAAAAGTGTATTCTCTGTTGTAATGCGTTTCCGAATGTCCTGGTGGTGGCT  
AA

**Mmp 1249**

GATCGTAATGGTGATGCTGAAGCTGGGTCCTCAAACCTTAAAGGCGGAGAAAT  
CTTCATTAACGGAAACGCTGAAAACACTACGTAGGTTCTGCATACAGGGGCGACTG  
GAGAGGAATGAGCGGTGGA AAAAATTACTATTACGGGTAACGCTGGATCCGAAC  
TGGAGAGTACCTGAAAGGTGGAACAATTGTTATTAAGGTAACACAAAAATAATG  
CCTGGAATTCACCAAACGGCGGTATGATTATCATCGAAGGAGATATCGAAGGA  
AGAGCTGGTGGAGAAATGATGAAAGGTGCTATCGTAGTTTACGGTAAATCTTA  
GAACCGCTTCATCATTCAAATTCGAAGGAATAGTTGAAGATCCACTCGTTAAAT  
TATCTAAAAAGATGCTGGACTCAGTTGAAAGGACATTTATAAATTCAGCGGAGCT  
CCTAAC