

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL EM BOVINOS
NELORE**

Raphael Barbeta de Jesus

Zootecnista

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL EM BOVINOS
NELORE**

Raphael Barbeta de Jesus

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Co-orientadora: Dra. Juliana Duarte Messana

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia

2014

J58d Jesus, Raphael Barbeta de
Diversidade bacteriana ruminal em bovinos Nelore / Raphael
Barbeta de Jesus. -- Jaboticabal, 2014
ix, 33 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Telma Teresinha Berchielli
Banca examinadora: Izabelle Auxiliadora M. de Almeida Teixeira,
Roberta Carrilho Canesin
Bibliografia

1. Bactéria. 2. Firmicutes. 3. Illumina. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.08:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL EM BOVINOS NELORE

AUTOR: RAPHAEL BARBETTA DE JESUS

ORIENTADORA: Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. JULIANA DUARTE MESSANA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ZOOTECNIA , pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ZABELLE AUXILIADORA M. DE ALMEIDA TEIXEIRA

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ROBERTA CARRILHO CANESIN

Centro APTA Bovinos de Corte / Sertãozinho/SP

Data da realização: 01 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAPHAEL BARBETTA DE JESUS – Filho de Valdemar de Jesus Sobrinho e Rosana Celeste Barbeta de Jesus, nascido em 30 de março de 1987, no município de Jaboticabal, Estado de São Paulo. Ingressou no curso de Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, em fevereiro de 2007, recebendo o título de bacharel em Zootecnia em março de 2012. Durante a graduação foi componente do Programa de Educação Tutorial (PET - Zootecnia / Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação) e bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Iniciou o curso de mestrado em março de 2012 sob orientação da Prof^a Dra. Telma Teresinha Berchielli sendo bolsista do CNPq. Durante o curso de mestrado foi membro titular na Congregação desta unidade acadêmica e integrante da diretoria da Associação dos Pós-Graduandos (gestão 2012 / 2013).

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra ao meu pai Valdemar de
Jesus Sobrinho (*in memoriam*)

SUMÁRIO	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
REFERÊNCIAS.....	09
CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL EM BOVINOS NELORE..	16
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1 Animal e dieta.....	17
2.2 Amostragem e extração do DNA total.....	17
2.3 PCR.....	18
2.4 Construção da biblioteca e sequenciamento.....	19
2.5 Análise de dados.....	19
3. RESULTADOS.....	20
4. DISCUSSÃO.....	24
5. CONCLUSÃO.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 017621/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Caracterização molecular de bactérias ruminais, parâmetros ruminais e digestibilidade das dietas de novilhos alimentados com diferentes relações volumoso: concentrado na dieta**", sob a responsabilidade da Profª. Drª. Telma Teresinha Berchielli está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de Setembro de 2011.

Jaboticabal, 05 de Setembro de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL EM BOVINOS NELORE

RESUMO – O rúmen é um ecossistema aberto, no qual o alimento consumido pelos ruminantes é fermentado a ácidos graxos de cadeia curta e proteína microbiana, os quais servem respectivamente como fonte de energia e de proteína para o animal. Espécies de micro-organismos têm desenvolvido no rúmen uma série de interações complexas, o qual é um dos melhores exemplos de simbiose entre micro-organismos na natureza. Os métodos convencionais para a taxonomia baseada em técnicas de cultivo vêm sendo substituídas por técnicas moleculares, que são rápidas e mais precisas. O fundamento das técnicas moleculares está na sequência do 16S rRNA que fornece a classificação filogenética usadas na identificação e quantificação da comunidade bacteriana. Para avaliar a diversidade bacteriana ruminal neste estudo, foram utilizados 3 bovinos da raça Nelore, canulados no rúmen. As frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram processadas para extração de DNA metagenômico, após a extração foi verificado a quantidade e integridade das amostras. Em seguida, foi feita a PCR baseada nas regiões hipervariáveis V1 e V2 do 16S rRNA, e em sequência procedeu-se a construção da biblioteca e sequenciamento utilizando a plataforma Illumina. Os dados foram analisados pelos softwares MG-RAST e MOTHUR para filiações bacterianas. Aproximadamente 11.407.000 reads foram geradas com qualidade e 812 e 752 UTOs foram encontrados no nível de espécie e gênero respectivamente. Foram identificados 27 filos no conteúdo ruminal de bovinos Nelore através do sequenciamento do gene 16S rRNA pela plataforma Illumina. Os conhecimentos gerados a partir do presente estudo são informações primárias e primordiais para o entendimento da composição bacteriana ruminal. Assim, nos proporciona vislumbrar futuro promissor no desenvolvimento de novos métodos e tecnologias aplicáveis na nutrição animal.

Palavras-chave: bactéria, Firmicutes, Illumina, rúmen, 16S rRNA

RUMINAL BACTERIAL DIVERSITY ON NELORE BOVINES

ABSTRACT – The rumen is an open ecosystem in which the food consumed by ruminant is fermented to yield short-chain fatty acids and microbial protein, that in turn serve as a source of energy and protein for the animal, respectively. Species of microorganisms into rumen have developed a series of complex interactions that become one of the best examples of symbiosis between microorganisms in nature. Conventional methods for microbial taxonomy based on culture techniques have been replaced by molecular techniques which are quickly and more accurate. The majority of phylogenetic molecular tools for bacteria classification are based on ribosomal 16S rRNA gene that provides resources for identification and also quantification of bacterial communities. In order to evaluate the ruminal bacterial diversity present in three Nelore cannulated cattle, the rumen content was fractionated in liquid and solid samples after its collect. Both parts were processed for metagenomic DNA extraction which in turn was evaluated according quantity and integrity parameters. Next stage consisted in PCR technique based on V1 and V2 hypervariable 16S rRNA regions to generate amplicons used for DNA sequencing performed at Illumina platform. Data were processed by MG-RAST and MOTHUR softwares to deduce bacterial affiliations. Approximately 11,407,000 reads were generated showing quality for indication of 812 and 752 OTUs at the level of species and genus, respectively. Twenty-seven phyla were successfully identified in Nelore ruminal contents by 16S rRNA sequencing in the powerful Illumina platform. The knowledge generated from this study are primary and essential for the wide understanding of rumen bacterial composition information. Thus, it provides us resources to be explored in a promising future focusing the development of new methods and technologies applied to animal nutrition.

Keywords: bacteria, Firmicutes, Illumina, rumen, 16S rRNA

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

A maior eficiência na produção de ruminantes é limitada pelo escasso conhecimento aprofundado sobre a microbiota ruminal. Considerando que a relação simbiótica entre o hospedeiro e os micro-organismos é um dos fatores essenciais no aproveitamento da dieta com maior eficiência de utilização de energia e proteínas pelos animais, compreender a estrutura desta comunidade microbiana e os fatores que a afeta são fundamentais para o desenvolvimento de novas tecnologias de produção.

Os ruminantes durante sua evolução desenvolveram características anatômicas e relações simbióticas, que lhes permitiram utilizar compostos nitrogenados não proteicos como fonte de proteína e carboidratos estruturais como fonte de energia (VALADARES FILHO; PINA, 2011). A relação simbiótica se dá da seguinte forma, o animal fornece condições favoráveis para o crescimento e manutenção dos micro-organismos que por sua parte, suprem o animal com ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteína microbiana, vitaminas do complexo B e vitamina K, além de atuarem na detoxificação de algumas fitotoxinas (VAN SOEST, 1994; WRIGHT, et al., 2004; OLIVEIRA; ZANINE; SANTOS, 2007). Os AGCC podem ser considerados resíduos da fermentação para os micro-organismos, entretanto, para o ruminante, representam a principal fonte de energia. A energia proveniente dos AGCC representa em torno de 80% da energia originalmente presente nos carboidratos fermentados e, normalmente, contribuem em 50 a 70% da energia digestível do alimento (KOZLOSKI, 2002), desta maneira os ruminantes são altamente dependentes destes micro-organismos.

O animal não possui controle direto sobre o metabolismo dos micro-organismos, mas tem capacidade de manter condições que promovam a manutenção da microbiota ruminal, favorecendo a fermentação. Essas condições incluem: i) manutenção da temperatura relativamente constante (39°C), em parte devido ao calor gerado durante a fermentação realizada pelos micro-organismos, mas, principalmente, pelo metabolismo homeotérmico do animal; ii) pH em torno de 5,5 a 7,0, devido à absorção contínua dos ácidos produzidos pela fermentação

microbiana e que são neutralizados pela produção de grandes quantidades de saliva que contém bicarbonato e sais fosfato. Os micro-organismos necessitam de pH constante para seu desenvolvimento. Os protozoários e bactérias celulolíticas possuem um desenvolvimento ideal em pH em torno de 6,2 ou mais alto, enquanto as bactérias aminolíticas são favorecidas em condições mais ácidas com pH, aproximadamente, 5,8; iii) ausência de oxigênio, uma vez que a digestão fermentativa ocorre em ambiente redutivo anaeróbico. O oxigênio entra no rúmen através da ingestão de água, dos alimentos, ou por difusão através de vasos sanguíneos, sendo utilizado pelas bactérias anaeróbicas facultativas e eliminado pela eructação, assim as concentrações de oxigênio no rúmen são sempre baixas; iv) pressão osmótica relativamente constante (YOKOYAMA; JOHNSON, 1988; TEIXEIRA, 2001; FURLAN; MACARI; FILHO, 2011).

O ambiente ruminal é colonizado por milhares de espécies de micro-organismos, de acordo com a classificação apresentada por Woese et al. (1990), o rúmen é um ambiente colonizado por três domínios, sendo estes: bacteria (bactérias), archaea (arquéias) e eucarya (fungos e protozoários). Em termos quantitativos, 60 a 90% da proteína microbiana ruminal é composta por bactérias, 10 a 40% por protozoários ciliados e o restante 5 a 10% por fungos (VAN SOEST, 1994), uma vez estabelecida a flora e a fauna do rúmen esta se estabiliza e altera-se apenas quando os nutrientes da dieta são muito modificados (CHENG; COSTERTON, 1980).

Além das interações entre a microbiota ruminal e o hospedeiro, há também uma importante relação ecológica entre os próprios micro-organismos, alguns dependem dos outros para suprir o seu requerimento de nutrientes, enquanto outros antagonizam entre si pela liberação de componentes antimicrobianos (WRIGHT et al., 2004; KAMRA, 2005). Dessa forma, inúmeras interações são observadas entre os micro-organismos presentes no rúmen. As interações microbianas são positivas ou negativas, resultando em efeitos benéficos para o hospedeiro com incremento da digestibilidade e da utilização dos alimentos ingeridos (DEHORITY, 1998), deste modo, um equilíbrio muito sensível deve existir entre eles para uma eficiente fermentação ruminal. Estudos das vias metabólicas de algumas bactérias isoladas do rúmen demonstraram que várias espécies produzem produtos finais que não são

detectados no líquido ruminal, como o etanol e o ácido succínico. Estes intermediários são alvos de fermentações secundárias por outras espécies bacterianas (ATLAS; BARTHA, 1998; RUSSELL; RYCHLIK, 2001). Algumas bactérias que degradam celulose, como as *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, produzem uma proteína solúvel que inibe a degradação da celulose por fungos (STEWART; DUNCAN; RICHARDSON, 1992), enquanto outras estirpes de bactérias quitinolíticas inibem o crescimento de fungos (ODENYO et al., 1994). Observa-se também nas bactérias da espécie *Ruminococcus albus* a síntese de um tipo de bacteriocina que inibe o crescimento de *Ruminococcus flavefaciens*. Estas e outras diversas interações, entre micro-organismos ainda desconhecidas pelo pequeno conhecimento da grande população, são fundamentais para a manutenção de um equilíbrio estável do ecossistema ruminal (KANRA, 2005).

Do total de domínios presentes no rúmen, as bactérias são as mais abundantes e diversas, aproximadamente 95% da microbiota total (FLINT et al., 2008), a classificação destas bactérias é feita levando-se em conta o tipo de substrato utilizado e os produtos oriundos de sua fermentação, sendo classificadas em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, fermentadoras de carboidratos não estruturais, lipolíticas, proteolíticas e as lácticas (ARCURI et al., 2006).

As principais espécies de bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, que se associam às fibras dos alimentos e degradam particularmente celulose e hemicelulose, são *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, estas produzem como produto da fermentação, propionato, butirato, succinato, formato, CO₂, H₂O e, principalmente, acetato (DEHORITY, 2003).

Dentre as bactérias fermentadoras de carboidratos não estruturais encontram-se, principalmente, algumas espécies do gênero *Bacteroides*, que utilizam basicamente o amido como fonte de energia, a espécie *Bacteroides amylophilus* membro deste gênero utiliza o amido, porém, é incapaz de utilizar glicose ou outros monossacarídeos (CALDWELL et al., 1969; MIURA et al., 1980). As rotas metabólicas de fermentação podem ser alteradas de acordo com os substratos presentes, assim quando há uma grande disponibilidade de amido e carboidratos solúveis, espécies como *Selenomonas ruminantium* e *Streptococcus bovis*, produzem acetato como

produto da fermentação, porém quando a disponibilidade destes substratos decresce, o produto da fermentação muda para a produção de formato e etanol, ou acetato e propionato. Estas últimas vias metabólicas aumentam a produção de energia em um ambiente anaeróbico (RUSSEL, 1990).

A hidrólise de lipídios no rúmen é realizada por um grupo de micro-organismos com número e diversidade relativamente baixo, isso se deve ao fato do ambiente ruminal possuir um potencial de oxidação/redução muito baixo. A espécie *Anaerovibrio lipolytica* hidrolisam os triglicerídeos e utiliza ribose, frutose, glicerol e lactato como fonte de energia e carbono, esses substratos são fermentados a acetato, propionato e CO₂, enquanto o glicerol é fermentado a propionato e succinato, gerando em todos os substratos a produção de H₂ (STEWART et al., 1997).

A degradação da proteína é realizada pela maioria das espécies de bactérias presentes no rúmen. Porém, existem poucas espécies que utilizam principalmente aminoácidos como substrato e tem uma atividade proteolítica bem mais intensa que as demais, como as bactérias das espécies *Peptostreptococci* sp. e *Clostridium* sp. Já as bactérias lácticas utilizam, entre outros, o ácido láctico como substrato energético sendo as espécies lácticas predominantes *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* (KOZLOSKI, 2011).

Este diverso grupo de bactérias estão distribuídos no conteúdo ruminal em quatro principais micro-habitat: i) dispersas no líquido ruminal, ii) fracamente ou fortemente associadas com partículas da digesta, iii) aderidas ao epitélio do rúmen e iv) vivendo na superfície dos protozoários (YU; FORSTER, 2005).

Diversos trabalhos veem identificando como filos de maior prevalência no rúmen bovino os filos: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes (KHAFIPOUR et al., 2009; CHEN et al., 2011; KAV et al., 2012; LI et al., 2013), sendo também observados outros diversos filos em menores proporções. Os gêneros predominantes observados em sua maior parte são pertencentes aos *Bacteroidetes*, *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Succinomonas*, *Methanobacterium*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, entre outras (ATLAS; BARTHA, 1998). O número de espécies de micro-organismos encontrados no rúmen baseados em técnicas de cultivo e isolamento variam de 22

espécies (KRAUSE; RUSSELL, 1996), 48 espécies (KAMRA, 2005) e 200 espécies (KOZLOSKI, 2002) identificadas, porém, provavelmente, apenas 10-20% da população de micro-organismos do rúmen foram identificados (SYLVESTER et al., 2004).

O conhecimento dos micro-organismos ruminais, até pouco tempo, eram obtidos por técnicas clássicas de cultivo, tais como o isolamento, caracterização nutricional e enumeração celular o que permitia um acesso limitado à diversidade de micro-organismos, tais técnicas estão sendo complementadas por técnicas moleculares, que são mais acuradas e demandam menor tempo para análise (MCSWEENEY; MACKIE, 2012). O fundamento das técnicas moleculares para caracterização da comunidade de micro-organismos procariotos está na sequência do gene 16S rRNA que permite realizar uma estimativa de riqueza e classificação filogenética utilizada na identificação e quantificação da comunidade de organismos ainda não cultivados (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; KANG et al., 2009).

Os métodos de biologia molecular, baseados, principalmente, na análise de sequências do gene 16S rRNA (KONG et al., 2010) revelaram, nos últimos anos, um grande número de micro-organismos, desconhecidos ou ainda não cultivados (TASSE et al., 2010). Estimativas do número de espécies de micro-organismos do rúmen baseados em sequências de 16S rRNA variam de 300 - 400 com a metodologia Sanger (EDWARDS et al., 2004), 500 - 1.000 (PITTA et al., 2010; BRULC et al., 2009; HESS et al., 2011) e 12.000 com o pirosequenciador 454 (MENEZES et al., 2011). KIM, MORRISON e YU (2005) reunindo dados do Ribosomal Database Project (RDP) calcularam 5.271 unidades taxonômicas operacionais (UTOs) em nível de espécies para bactérias apud Fouts e colaboradores (2012). No entanto, com as novas tecnologias de sequenciamento e o incremento de sequências de procariotos ruminais nos bancos de dados provavelmente descubra-se que o número de espécies seja ainda maior.

As dificuldades e limitações encontradas nas técnicas de cultivo foram superadas com técnicas moleculares como a PCR (reação em cadeia da polimerase) (MULLIS, 1987) e o sequenciamento de DNA (SANGER, 1977), que tiveram forte impacto sendo extremamente importantes em diversas áreas da ciência, em particular na classificação de micro-organismos. Com o surgimento dos

estudos filogenéticos dos procariotos, tornou-se necessário a escolha de um cronômetro molecular ideal para as inferências sobre as relações evolutivas entre os micro-organismos. A análise dos genes ribossômicos é muito utilizada para essas inferências filogenéticas, especialmente de procariotos, aumentando assim o conhecimento sobre a diversidade procariótica em diversos ecossistemas (TOUROVA, 2003).

Os componentes ribossomais são tradicionalmente descritos em termos de sua taxa de sedimentação em ultracentrífuga, o que tem correlação aproximada com os seus tamanhos. Assim, o ribossomo de *E. coli* tem um coeficiente de sedimentação de 70S. Como descoberto por James Watson, o ribossomo é dissociado em duas subunidades não idênticas. A subunidade menor (30S) consiste em uma molécula de 16S rRNA e 21 proteínas diferentes, enquanto a subunidade maior (50S) contém um 5S rRNA e um 23S rRNA juntamente com 31 proteínas diferentes (VOET et al., 2008). Em meados da década de 1970, Carl Woese e seus colegas, na Universidade de Illinois começaram uma série de estudos em diferentes organismos, comparando a sequência de nucleotídeos da molécula de RNA que pertence à subunidade menor do ribossomo. Este RNA é chamado de 16S rRNA nos procariotos e 18S em eucariotos (KARP, 2002). O estudo das sequências do 16S rRNA tornou-se padrão na determinação de relações filogenéticas, avaliação da diversidade em amostras ambientais e detecção e quantificação de populações específicas (HEAD et al., 1998). A escolha da sequência de nucleotídeos do 16S rDNA decorre do fato de a mesma agrupar um conjunto de características necessárias a um bom marcador molecular, a qual inclui a sua distribuição universal, estrutura e função conservada entre os táxons, ausência de transferência lateral e tamanho grande o suficiente (aproximadamente 1.500 nucleotídeos) para estudos de filogenia (AMANN; LUDWING, 2000). O gene 16S rRNA em bactérias é constituído por sequências conservadas intercaladas com sequências variáveis que incluem 9 regiões hipervariáveis (V1-V9) (Figura 1). O comprimento destas regiões hipervariáveis variam de cerca de 50 bases a 100 bases (PETROSINO et al., 2009). Regiões variáveis podem ser usadas para estudar as relações evolutivas entre dois organismos muito próximos. Já as áreas conservadas podem ser usadas para revelar relações antigas entre duas moléculas (FAORO, 2006). O grande número de

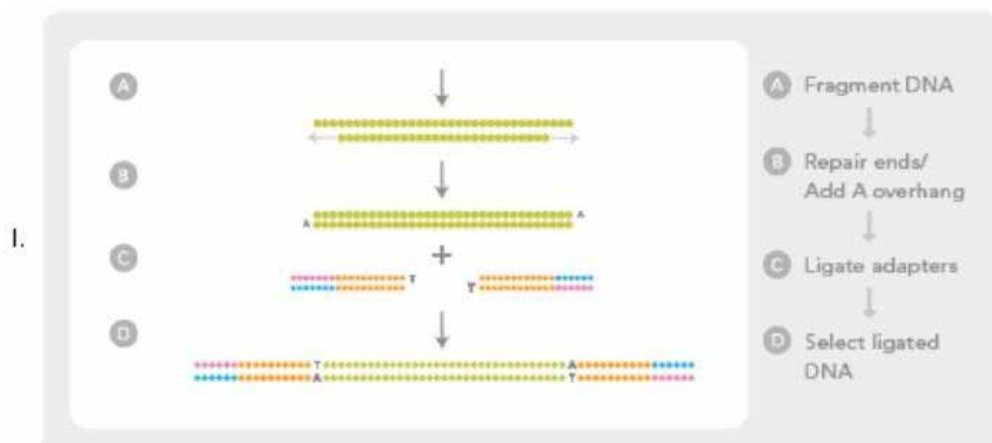
sequências do 16S rRNA, atualmente disponíveis em bancos de dados públicos, permite, ainda, maior uso deste gene como marcador filogenético (MACRAE, 2000).



Figura 1. Regiões conservadas e hipervariáveis do gene 16S rRNA. As regiões conservadas (C1 - C9) são mostradas em cinza, e as regiões hipervariáveis (V1 - V9) são representadas em cores diferentes.

As tecnologias de sequenciamento de nova geração começaram a ser comercializadas a partir de 2004 e vêm evoluindo rapidamente. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida.

A empresa Illumina disponibilizou no mercado seu primeiro sequenciador de segunda geração no ano de 2006, e, assim, como nos sequenciadores que utilizam a técnica de Sanger, os sequenciamentos na plataforma Illumina (Figura 2) são feitos por meio de PCR com DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados por diferentes fluoróforos (DELSENY et al., 2010).



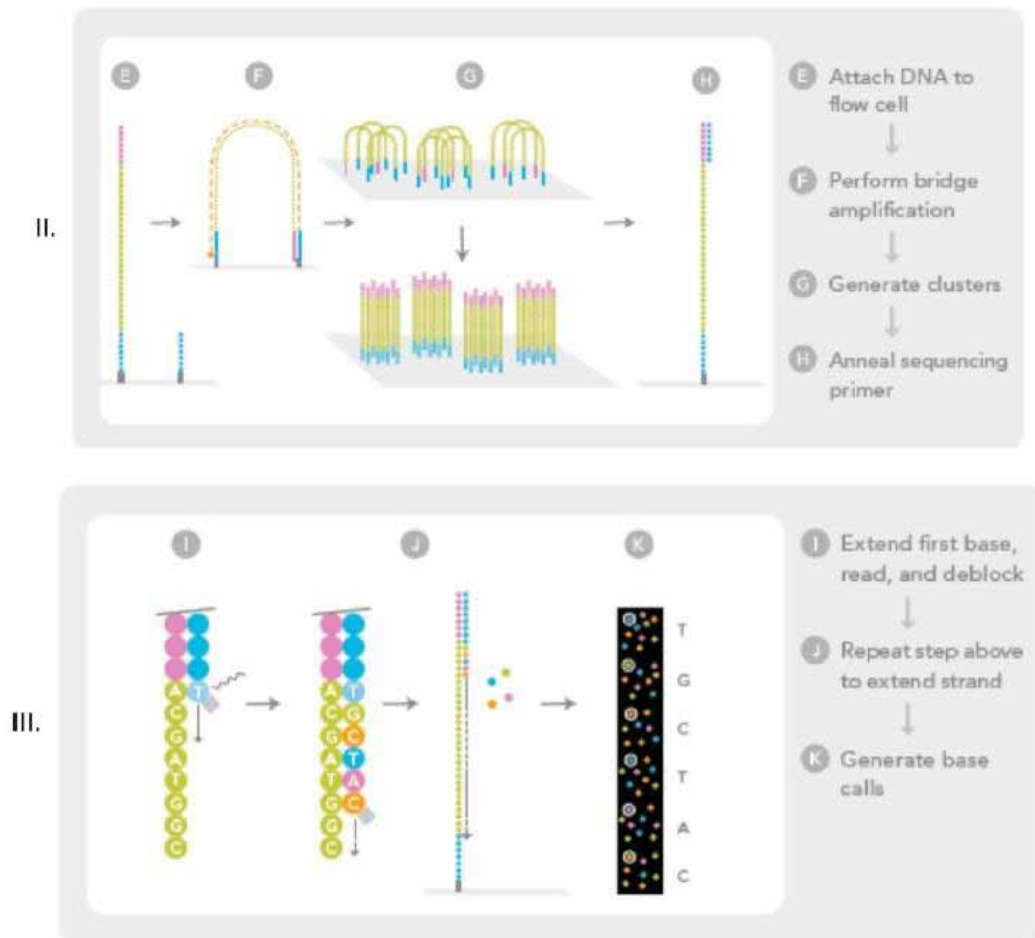


Figura 2: O Método de sequenciamento da plataforma Illumina se divide em 3 partes: I) adaptadores são ligados às extremidades dos fragmentos. II) estes adaptadores favorecem a ligação dos fragmentos à superfície de amplificação, o fragmento forma uma ponte e é amplificado com nucleotídeos comuns, formados os *clusters*, *primers* se pareiam ao fragmento. III) Nucleotídeos marcados são adicionados um por vez, e o aparelho registra o sinal luminoso emitido (ANSORGE, 2010).

O método consiste em clonagem *in vitro* dos fragmentos amplificados em uma plataforma de vidro, este procedimento também é conhecido como PCR de fase sólida (CARVALHO; SILVA, 2010). Adaptadores são acoplados às duas extremidades dos fragmentos, isto permite a adesão do fragmento à plataforma. O fragmento se liga em forma de ponte à superfície de sequenciamento, é feita a amplificação gerando uma fita complementar, este procedimento é repetido 35 vezes formando cerca de 1.000 fragmentos, este conglomerado de fragmentos é chamado de *cluster*, é nele que ocorre o sequenciamento. Após o término da amplificação, nucleotídeos marcados são adicionados ao fragmento, estas moléculas emitem um

sinal luminoso o qual é fotografado por uma câmera sensível a luz, e é desta maneira que o equipamento consegue montar a sequência de bases do fragmento (METZKER, 2010; CARVALHO; SILVA, 2010).

Uma das principais vantagens do sequenciamento de nova geração se encontra na rapidez de execução experimental destas plataformas. Como dispensa a construção de bibliotecas plasmidiais ou de outros vetores, excluindo clonagem, validação, coleta e seleção de clones, como antepasso ao sequenciamento, a velocidade da geração de dados é muito grande. Outro ponto importante é a grande quantidade de dados gerados por corrida em cada leitura (MOREIRA, 2013).

As novas plataformas de sequenciamento apresentam a grande vantagem de permitir um sequenciamento altamente representativo em um único passo, o que é extremamente relevante, em razão da grande redução de custo alcançada com essas metodologias. Seu emprego tem revolucionado a metagenômica com a geração de dados altamente reproduzíveis e informativos e com precisão.

O estudo e compreensão das comunidades microbianas complexas presentes no rúmen são ainda pouco conhecidas (JAMI; MIZRAHI, 2012), a falta de conhecimento da microbiota ruminal é uma das principais lacunas que dificultam a melhoria efetiva das funções do rúmen (YU; YU; MORRISON, 2006). O conhecimento sobre a diversidade da microbiota ruminal, permitirá o aumento da utilização dos alimentos, melhorando o processo de digestão fermentativa. Assim o conhecimento minucioso sobre os micro-organismos ruminais representa um potencial aumento da produtividade da pecuária.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K. H. Ribossomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 24, p. 555-565, 2000.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, v. 25, p. 387-402, 2009.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 111-151.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**: fundamentals and applications, Estados Unidos: Benjamin-Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA, 1998. p. 694.

BROWN, K. A.; SASSON, G.; JAMI, E.; DORON-FAIGENBOIM, A.; BENHAR, I.; MIZRAHI, I. Insights into the bovine rumen plasmidome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. 1-6, 2012.

BRULC, J. M.; ANTONOPOULOS, D. A.; MILLER, M. E. B.; WILSON, M. K.; YANNARELL, A. C.; DINSDALE, E. A.; EDWARDS, R. E.; FRANK, E. D.; EMERSON, J. B.; WACKLIN, J.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; NELSON, K. E.; WHITE, B. A. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 1948-1953, 2009.

CALDWELL D. R.; KEENEY, M.; VAN SOEST, P. J. Effects of carbon dioxide on growth and maltose fermentation by *Bacteroides amylophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 98, p. 668, 1969.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, p. 735-744, 2010.

CHEN, Y.; PENNER, G. B.; LI, M.; OBA, M.; GUAN, L. L. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 5770-5781, 2011.

CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: **Digestive Physiology Metabolism in Ruminants**. RUCKEBUSCH, Y.; THIVEND, P. (Eds.). Lycester: MTP Press, 1980. p. 227-250.

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

DEHORITY, B. A. Microbial interactions in the rumen. **Revista de La Facultad de Agronomía Luz**, v. 15, p. 69-86. 1998.

DELSENY, M.; HAN, B.; HSING, Y. I. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. **Plant Science**, v. 179, p. 407-422, 2010.

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

FAORO, H. Estrutura secundária do 16S rRNA. In: _____. **Determinação da biodiversidade de archaea e bactéria da mata atlântica paranaense**. 2006. f. 18. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FLINT, H. J.; BAYER, E. A.; RINCON, M. T.; LAMED, R.; WHITE, B. A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 121-31, 2008.

FOUTS, D. E.; SZPAKOWSKI, S.; PURUSHE, J.; TORRALBA, M.; WATERMAN, R. C.; MACNEIL, M. D.; ALEXANDER, L. J.; NELSON, K. E. Next Generation Sequencing to Define Prokaryotic and Fungal Diversity in the Bovine Rumen. **Plos One**, v. 7, p. e48289, 2012.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 1-24.

HEAD, I. M.; SAUDERS, J. R.; PICKUP, J. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal rRNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM3, T. W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R.; PENNACCHIO, L. A.; TRINGE, S. G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E. M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v. 331, p. 463-467, 2011.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **Plos One**, v. 7, p. e33306, 2012.

KAMRA, D. N. Rumen Microbial Ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. 124-135. 2005.

KANG, S.; DENMAN, S. E.; McSWEENEY, C. S. The use of molecular tools for the study of rumen ecology. In: **Simpósio internacional avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes**, 2. Pirassununga. Anais...p.179-194, 2009.

KARP, G. **Introdução ao estudo da biologia celular e molecular**. In: _____. **Biologia celular e molecular**. 3. ed. Barueri: Manole, 2002. cap. 1, p. 27.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7115-7124, 2009.

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

KONG, Y.; TEATHER, R.; FORSTER, R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 74, p. 612-622, 2010.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011. 216 p.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. p. 139.

LI, Y.; MA, S.; ZHANG, X.; HUANG, S.; YANG, H.; ZHAO, F.; YI, W.; YANG, X.; XIN, S.; YI, X.; YANG, B.; TU, B.; TIAN, Y.; LU, X. Evaluation of bacterial and archaeal diversity in the rumen of Xiangxi yellow cattle (*Bos taurus*) fed *Miscanthus sinensis* or common mixed feedstuff. **Annals of Microbiology**, p. 1-10, 2013.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 77-82, 2000.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.

McSWEENEY, C. S.; MACKIE, R. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Micro-organisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. **Background Study Paper (FAO)**, n. 61, p. 1-62, 2012.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation. **Nature reviews**, v. 11, p. 30-46, 2010.

MIURA, H.; Horiguchi, M.; MATSUMOTO, T. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii* and *Ruminococcus albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 294-300, 1980.

MOREIRA, W. M. Q. **Estudo da diversidade e atividade bacteriana em solos de floresta e sob cultivo de cana-de-açúcar**. 2013. 103 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

MULLIS K. B.; FALOONA F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

ODENYO, A. A.; MECKIE, R. I.; STAHL, D. A.; WHITE, B. A. The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3688-3696, 1994.

OLIVEIRA, S. O.; ZANINE, A. M.; SANTOS, M. S. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, p. 1-12. 2007.

PETROSINO, J. F.; HIGHLANDER, S.; LUNA, R. A.; GIBBS, R. A.; VERSALOVIC, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 856-866, 2009.

PITTA, D. W.; PINCHAK, W. E.; DOWD, S. E.; OSTERSTOCK, J.; GONTCHAROVA, V.; YOUN, E.; DORTON, K.; YOON, I.; MIN, B. R.; FULFORD, J. D.; WICKERSHAM, T. A.; MALINOWSKI. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. **Microbial ecology**, v. 59, p. 511-522, 2010.

RUSSEL, J. B. Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3304, 1990.

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

SANGER, F.; MICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

STEWART, C. S.; DUNCAN, S. H.; RICHARDSON, A. J. The inhibition of fungal cellulolysis by cell free preparations from ruminococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97, p. 83-88, 1992.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P.; The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Blackie Academic, v. 2, p. 10-72, 1997.

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

TASSE, L.; BERCOVICI, J.; PIZZUT-SERIN, S.; ROBE, P.; TAP J.; KLOPP, C.; CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; LECLERC, M.; DORE, J.; MONSAN, P.; REMAUD-SIMEON, M.; POTOCKI-VERONESE, G. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. **Genome Research**, v. 20, p. 1605-1612, 2010.

TEIXEIRA, J. C. **Nutrição de ruminantes**. 2001. 182. Especialização em produção de ruminantes - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

TOUROVA T. P. Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analyses. **Microbiology**, v. 72, p. 389-402, 2003.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 151-182.

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

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Tradução. In: _____. **Fundamentos de bioquímica: A vida em nível molecular**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2008. cap. 26, p. 983.

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

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1263-1270, 2004.

YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K. A. Microbiología del rumen e intestino. In: CHURCH, D. C. (Eds.). **El Ruminant Fisiología Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S. A. 1988. c. 7, p. 137-157.

YU Z.; YU M.; MORRISON M. Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. **Environmental microbiology**, v. 8, p. 603-611, 2006.

YU, Z.; FORSTER, R. J. Nucleic acid extraction, oligonucleotide probes and PCR methods. In: MARKKAR, H. P. S.; McSWEENEY, C. S. (Eds.). **Methods in gut microbial ecology for ruminants**. EUA: Springer, 2005. p. 81-104.

CAPÍTULO 2 - Diversidade bacteriana ruminal em bovinos Nelore

1. INTRODUÇÃO

A economia mundial vem apresentando padrão de crescimento elevado nos últimos anos, resultado do cenário econômico favorável, como o aumento do consumo interno e do volume de exportações. Nesse contexto, a pecuária possui papel de destaque e tem levado cada vez mais pesquisadores a desenvolver tecnologias para o aumento da eficiência dos animais, sobretudo nutricionalmente.

A ciência que estuda a nutrição dos ruminantes possui o grande desafio, compreender a composição da microbiota ruminal, que sem dúvidas ainda é extremamente complexa para ser totalmente compreendida. O número de espécies de bactérias conhecidas no conteúdo ruminal baseados em métodos clássicos de isolamento variam de 22 espécies (KRAUSE; RUSSELL, 1996) a 200 espécies (KOZLOSKI, 2002) identificadas, porém, provavelmente, apenas 10-20% da população de micro-organismos do rúmen foram identificados (SYLVESTER et al., 2004).

Mediante a grande diversidade microbiana representada pelos organismos ainda não cultivados, e às limitações de cultivo e manipulação de micro-organismos extremófilos em laboratórios, torna-se essencial a adoção de novas estratégias para exploração mais abrangente da biodiversidade microbiana (CANHOS; MANFIO, 1998).

O conhecimento da microbiota ruminal, até pouco tempo, eram adquiridos por métodos tradicionais de cultivo, que permitia acesso limitado à diversidade de micro-organismos, tais técnicas veem sendo complementadas por técnicas moleculares, que são mais precisas (MCSWEENEY; MACKIE, 2012). O embasamento das técnicas moleculares para caracterização de micro-organismos procariotos está no gene 16S rRNA que permite estimar a riqueza e classificação filogenética empregada na identificação da comunidade de organismos ainda não cultivados (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; KANG et al., 2009).

O estudo da diversidade dos micro-organismos presentes no rúmen é fundamental para o melhor conhecimento das relações ecológicas e futuro

desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao melhor desempenho dos ruminantes. Assim, o principal objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade bacteriana ruminal de bovinos Nelore, através do sequenciamento parcial do 16S rRNA total utilizando a plataforma Illumina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animal e dieta

Todas as etapas do experimento estavam de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV (protocolo nº 017621/11).

Foram utilizados três bovinos machos da raça Nelore, castrados, fistulados no rúmen, com idade aproximada de 24 meses e peso médio de 350 kg. A dieta, fornecida uma vez ao dia, foi composta de mistura de feno moído de Tifton 85 (*Cynodon spp*) (70%) e concentrado (30%) constituído por farelo de soja (13,1%), milho moído (15,7%), uréia e sulfato de amônia (1,2%). A ingestão média diária de matéria seca foi aproximadamente 1,7% do peso vivo do animal e a água oferecida *ad libitum*. O período de adaptação à dieta foi de 31 dias e as amostras do conteúdo ruminal foram colhidas 1 hora antes da alimentação dos animais (SARO, et al., 2014).

2.2 Amostragem e extração do DNA total

Duas amostras de DNA total foram extraídas de cada animal, uma da fração líquida e uma da fração sólida do conteúdo ruminal colhidas na região medial do rúmen. O conteúdo ruminal colhido foi filtrado em gase estéril, o filtrado resultante foi considerado a fração líquida e o material vegetal parcialmente digerido resultante da filtração foi considerado a fração sólida do conteúdo ruminal. Para a extração do DNA, de ambas as amostras, foi realizado processamento prévio do material colhido, segue abaixo:

Os micro-organismos aderidos à fração sólida foram separados da seguinte forma: em 10 g da fração sólida do conteúdo ruminal foi adicionado 30 mL de solução de NaCl 0,85%, contendo 0,2% de Tween[®] 20 (Polisorbato). A amostra foi

homogeneizada vigorosamente por 1 minuto e em seguida centrifugada por 10 minutos a 1.000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo reservado em gelo. O sedimento foi novamente ressuspensão em 30 mL de solução de NaCl 0,85% contendo 0,2% de Tween[®] 20 (Polisorbato) e centrifugado como descrito anteriormente. O sobrenadante adquirido foi transferido para o tubo reservado em gelo, enquanto o sedimento foi novamente ressuspensão com solução descrita anteriormente, acrescido em pérolas de vidro, homogeneizado vigorosamente e centrifugado nas condições anteriores. O sobrenadante foi recuperado e armazenado junto aos anteriormente transferidos. O tubo, reservado em gelo, contendo os sobrenadantes das três centrifugações anteriores, foi centrifugado a 27.000 x g por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante ressuspensão em 3 mL de NaCl 0,85%.

Os micro-organismos presentes na fração líquida foram obtidos da seguinte forma: 500 mL de líquido ruminal foram centrifugados a 27.000 x g por 30 minutos, a 4° C, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensão em 40 mL de NaCl 0,85%, centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente e o sobrenadante novamente descartado; por fim o sedimento foi ressuspensão em 40 mL de NaCl 0,85%.

A extração do DNA total foi realizada utilizando 250 mg de ambas as frações separadamente, utilizando o Kit de extração FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedical, LLC). A integridade e quantidade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (5 mg/mL) e seu tamanho estimado por comparação com marcador 1 kb *plus DNA ladder* (Invitrogen), complementarmente o DNA foi avaliado por espectrofotometria (Thermo Scientific, *NanoDrop™ 1000*) para avaliação de sua qualidade e quantidade.

2.3 PCR

O fragmento do gene 16S rRNA das duas amostras (sólida e líquida) foram amplificados separadamente por PCR com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: Y1 (5' TGG CTC AGA ACG AAC GCT GGC GGC 3') e Y2 (5' CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3') (YOUNG et al., 1991). A reação de PCR foi realizada utilizando-se 20 ng de DNA total em uma reação contendo: 1,25 mM de

MgCl₂; 200 µM de dNTP; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); solução tampão para reação de PCR [1x]; 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e H₂O para um volume final de 20 µl. A PCR foi conduzida nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento a 65°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação do fragmento as duas amostras foram unidas equimolarmente.

2.4 Construção da biblioteca e sequenciamento

A construção da biblioteca do fragmento 16S rDNA do conteúdo ruminal foi preparada de acordo com o protocolo TruseqTM DNA Sample Preparation Kit v2 de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma HiscanSQ (Illumina), para isso foram utilizados os kits Paired-End Cluster Generation Kit v3 e TruSeq SBS kit v3 = 200 ciclos. Ao final do sequenciamento, foi utilizado o *software* CASAVA 1.8.2 (Illumina) que separa os *barcodes* convertendo o arquivo gerado denominado .BCL em um arquivo .FASTQ.

2.5 Análise dos dados

Os arquivos de saída do *software* CASAVA foram utilizados como arquivos de entrada para as análises realizadas nos *softwares* MOTHUR e MG-RAST. No MOTHUR foram obtidos os estimadores de riqueza Chao1 (CHAO, 1987) e ACE (CHAO; LEE, 1992), e índices de diversidade Shannon-Weaver e Simpson (MAGURRAN, 1988) tendo como referência para a classificação filogenética das *reads* o banco de dados SILVA (PRUESSE et al., 2007). Através da plataforma MG-RAST (MEYER et al., 2008) foi calculada a análise de rarefação plotando o número de UTOs agrupados em 95% e 97% de similaridade em relação ao número de *reads*, e os níveis de classificação taxonômica das *reads* com base no banco de dados SILVA, pelo programa Krona (ONDOV et al., 2011).

3. RESULTADOS

O método de extração do DNA total do conteúdo ruminal foi considerado apropriado, pois apresentou DNA de qualidade e quantidade adequadas (Figura 1), o material obtido apresentou fragmentos com tamanho molecular sendo a maior parte acima de 10 kb para a fração sólida e acima de 7 kb para a fração líquida, com razão entre as leituras das absorvâncias 260/280 nm de 1,87 e 1,88 respectivamente, Lehninger e colaboradores (2004) recomendam que a razão entre as leituras de absorvâncias 260/280 nm estejam entre 1,8 e 2,0. As concentrações de DNA para a fração sólida e líquida foram de 192,2 ng/ μ l e 211,8 ng/ μ l respectivamente.

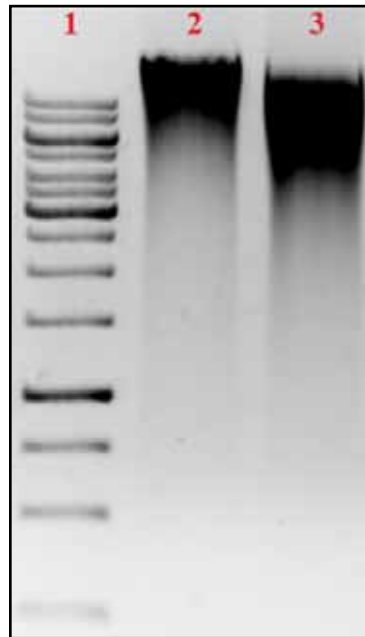


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA metagenômico. 1- Marcador 1 kb *plus DNA ladder*; 2- DNA metagenômico da fração sólida; 3- DNA metagenômico da fração líquida.

O DNA total foi utilizado em uma PCR para amplificação do fragmento 16S rRNA, os amplicons obtidos possuíam aproximadamente 300 pb (Figura 2) como esperado para região amplificada.

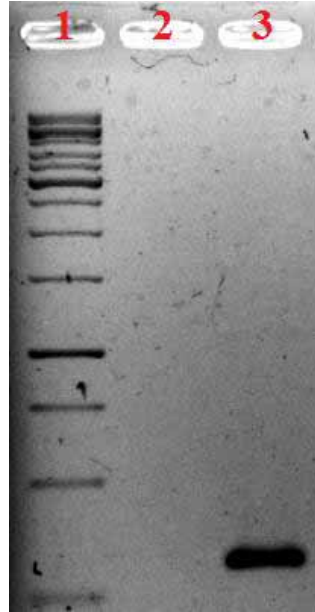


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR. 1- Marcador 1 kb *plus DNA ladder*; 2- Controle negativo; 3- Fragmento do 16S rRNA amplificado

Após o sequenciamento, foram obtidos aproximadamente 11.407.000 de sequências do fragmento amplificado com 100 pares de base (pb) cada foram obtidos. O *software* MOTHUR foi utilizado para a análise a fim de estimar a quantidade de sequências necessárias para se atingir a estabilidade em número de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). A diversidade bacteriana ruminal foi estimada através da curva de rarefação e índices de diversidade e riqueza. A análise de rarefação foi realizada plotando o número de UTOs agrupados em 95% e 97% de similaridade em relação ao número de *reads* para o nível taxonômico de gênero e espécie respectivamente (Figura 3). Esta observação foi confirmada pelos parâmetros de diversidade Shannon e Simpson e riqueza ACE, Chao 1 (Tabela 1).

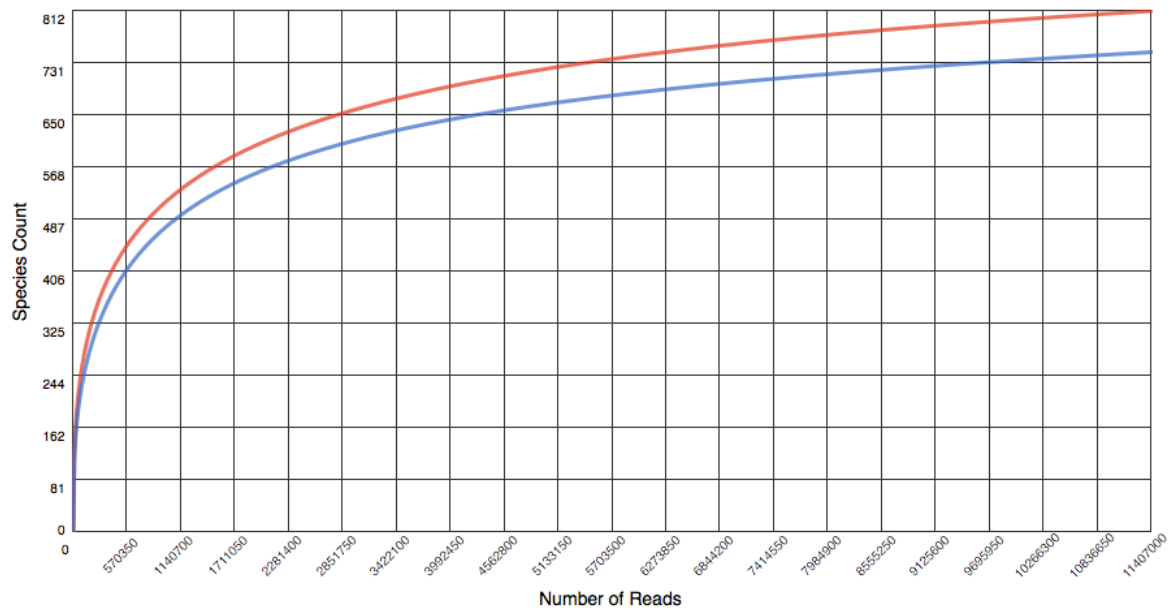


Figura 3. Curva de rarefação indicando o número de Unidades Taxonômicas Operacionais com distância evolutiva de 3% (linha vermelha) e 5% (linha azul) a partir das sequências obtidas através do sequenciamento do fragmento do gene 16S rRNA.

Tabela 1. Índices de riqueza (ACE e Chao1) e diversidade (Shannon e Simpson) para o conteúdo ruminal bovino com distância evolutiva de 3% e 5%.

Similaridade	ACE	Chao1	Shannon	Simpson
Único	16.648.025,99	5.106.763,32	6,715	0,027
97%	16.642.538,39	5.106.630,82	6,711	0,027
95%	10.574.731,56	3.658.795,70	6,328	0,029

Foram identificados 27 filos presentes no microbioma ruminal analisado, sendo que 29% das sequências foram identificadas como não classificáveis em nível de filo. Dentre os filos classificados há predominância dos Firmicutes (23%), Bacteroidetes (14%), Proteobacteria (10%), Spirochaetes (9%), Fibrobacteres (7%), Tenericutes (5%) e Actinobacteria (2%), os quais representam 70% dos filos identificados no rúmen bovino. Os outros 20 filos encontrados [Synergistetes (0,9%); Lentisphaerae (0,2%); Planctomycetes (0,2%); Chlorobi (0,1%); Fusobacteria (0,02%); Acidobacteria (0,02%); Cyanobacteria (0,01%); Chloroflexi (0,01%); Nitrospirae (0,009%); Verrucomicrobia (0,007%); Deferribacteres (0,004%); Gemmatimonadetes (0,003%); Elusimicrobia (0,002%), Thermodesulfobacteria (0,002%), Poribacteria (0,002%), Thermotogae (0,00007%); Aquificae (0,00007%);

Chlamydiae (0,00003%); Chrysiogenetes (0,00003%), Deinococcus-Thermus (0,00001%)] representam menor porcentagem.

A classificação taxonômica em nível de classe dos 7 principais filos bacterianos presentes no conteúdo ruminal bovino podem ser observadas na Figura 4. Foram identificadas 4 classes para cada um dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, para o filo Proteobacteria foram encontrados 6 classes e para os filos Spirochaetes, Fibrobacteres, Tenericutes e Actinobacteria apenas uma classe para cada.

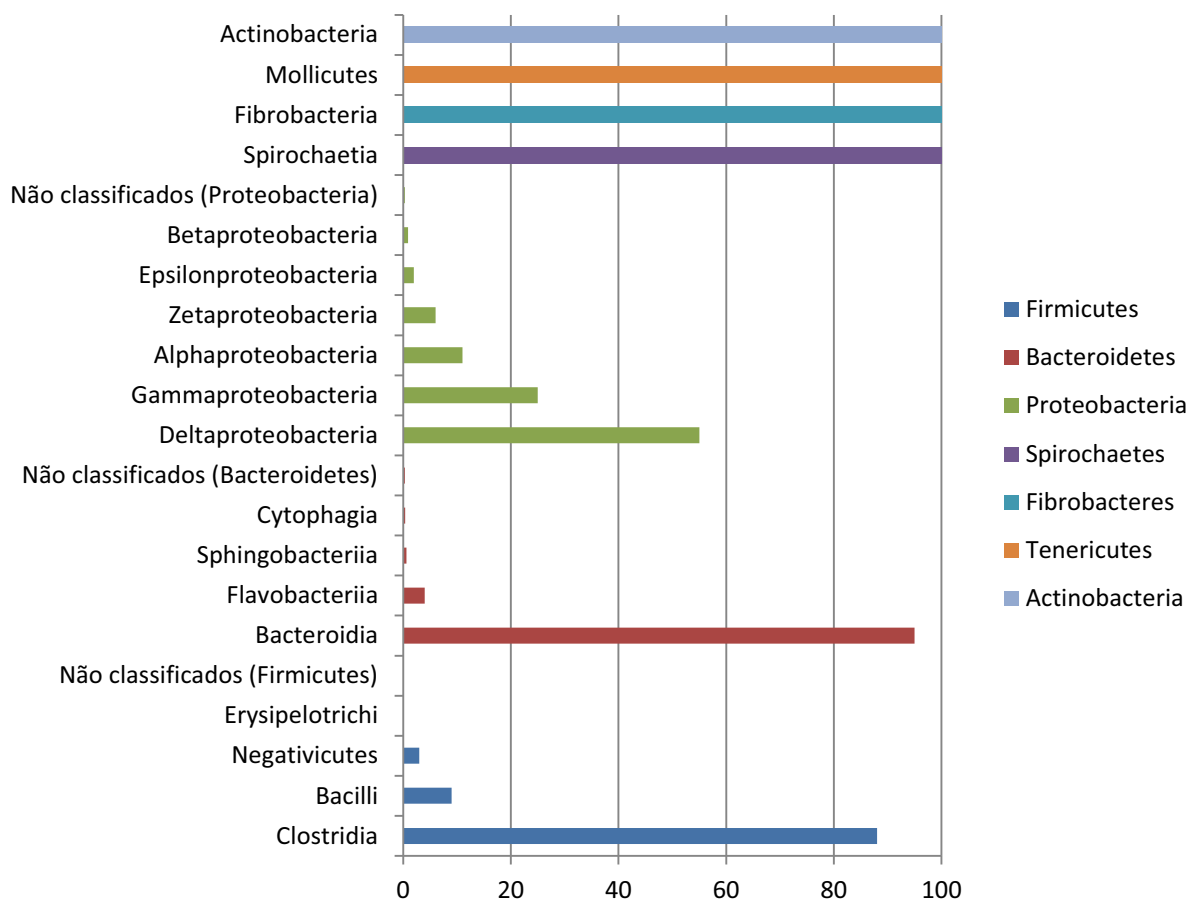


Figura 4. Afiliações taxonômicas em nível de classes para as *reads* geradas a partir de sequências do fragmento 16S rRNA do conteúdo ruminal bovino através da plataforma Illumina.

A classificação taxonômica em nível de gênero dos 5 principais filos bacterianos presentes no conteúdo ruminal bovino podem ser observadas na Figura 5. Foram identificados para o filo Firmicutes quatro gêneros principais, para os *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* 2 gêneros predominantes, para o filo Spirochaetes

um gênero principal e para o filo Fibrobacteres apenas um único gênero foi identificado.

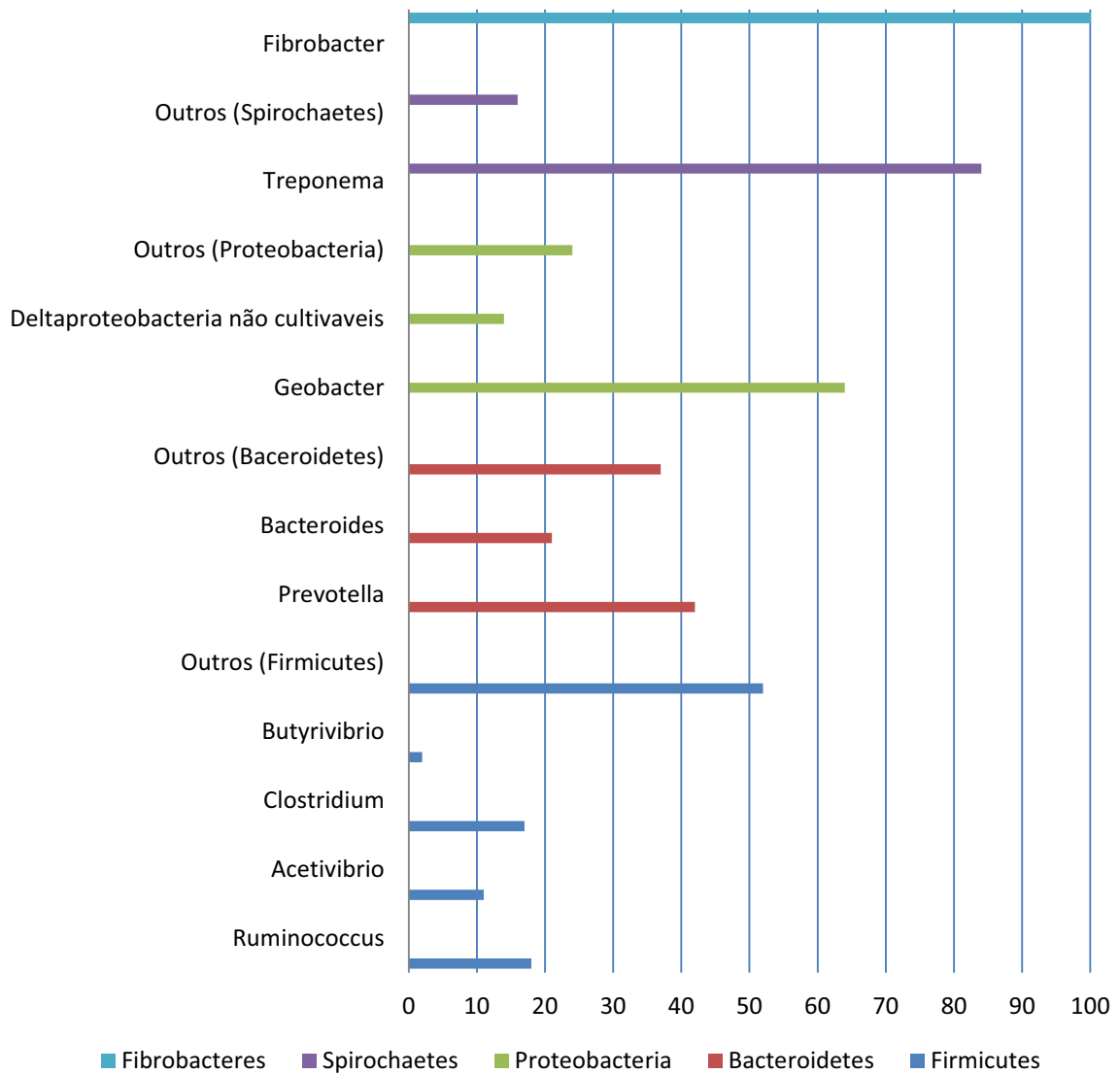


Figura 5. Afiliações taxonômicas em nível de gênero para as *reads* geradas a partir de sequências do fragmento 16S rRNA do conteúdo ruminal bovino através da plataforma Illumina

4. DISCUSSÃO

A análise de rarefação é um importante parâmetro para estimar a riqueza de espécies alcançadas na análise e adicionalmente indica o quanto a abrangência observada foi suficiente para revelar a diversidade total da comunidade amostrada.

Conforme observado na Figura 3, 812 UTOs distintas foram identificadas no conteúdo ruminal avaliado para a análise de 97% similaridade e 752 UTOs distintas para a análise de 95% de similaridade, considerando as condições aplicadas na análise MOTHUR. O perfil do gráfico de rarefação permite aferir que as 11.407.000 sequências estão muito próximas de atingir a compleição total da comunidade microbiana avaliada, ficando muito próximo de atingir o platô da curva, assim como pode ser confirmado pelos estimadores de riqueza ACE onde as sequências são agrupadas em raras e abundantes de acordo com sua frequência de observação e Chao1 por onde podemos analisar o número de espécies faltantes. Os índices Shannon-Weaver que consiste em um índice geral de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies, quanto maior o índice mais diverso o ambiente e Simpson que é baseado em valor que varia entre 0 e 1, de forma que quanto mais próximo de 0, maior a diversidade observada, tais índices reforçam o quanto diverso é o ambiente ruminal (Tabela 1). Os estimadores de riqueza e índices de diversidade demonstraram que a microbiota bacteriana ruminal é bastante rica e diversa, sendo a descrição da comunidade adequada, a partir do número de *reads* obtidas. Isto demonstra efetivamente o poder da técnica metagenômica associada ao sequenciamento Illumina em acessar grande parte da comunidade microbiana, a qual não seria revelada pelas técnicas tradicionais de microbiologia e biologia molecular.

A resolução taxonômica da técnica utilizada, sequenciamento do 16S rRNA, abrange de forma conclusiva os grupos classificados até táxons pertencentes a famílias e gêneros. Devido a diferentes opções de sequenciamento de regiões hipervariáveis do marcador utilizado, a classificação segura em nível de espécie requer uma exploração adicional dos dados obtidos (VANDAMME et al., 1996). Não são estabelecidas recomendações claras para a determinação de gêneros ou níveis taxonômicos superiores, especialmente quando a similaridade genética entre as linhagens representantes de um grupo de consenso e aqueles encontrados no banco de dados é inferior a 97%. Nestes casos a decisão se o grupo em particular pertence a um gênero novo ou já existente é subjetiva e indicada pela avaliação da estabilidade da posição filogenética do grupo em questão (GILLIS et al., 2001).

Através do sequenciamento pela plataforma Illumina foi possível identificar no conteúdo ruminal bovino 27 filós distintos, número maior do que o verificado por Kim, Morrison e Yu (2011), LI et al. (2012) e Wu et al. (2012) que encontraram 21, 19 e 8 filós respectivamente, aplicando outras técnicas de sequenciamento. Apesar das diferenças nas quantidades de filós encontradas por diversos autores os dois filós identificados em maior proporção em grande parte dos trabalhos se alternam entre Firmicutes e Bacteroidetes (OZUTSUMI et al., 2005; KIM, MORRISON; YU, 2011; WU et al., 2012), filós com grande atividade proteolítica e celulolítica. Estes dados não apenas são conclusivos e corroboram nossos dados, como atestam o potencial da metagenômica no escrutínio de novos táxons microbianos, assim como a futura intervenção na obtenção de novos recursos biotecnológicos, dentre os quais alguns poderão vir a ser empregados na nutrição animal. Foram identificados outros 20 filós com menor representatividade percentual, alguns destes filós ainda não haviam sido descritos para o ambiente ruminal e suas funções no rúmen podem ser tão importantes quanto os filós com maior percentual.

Dentre os filós mais abundantes encontrados no rúmen bovino se destacou os Firmicutes com 23% do total de *reads* analisadas. Resultados muito semelhantes foram encontrados por Wu e colaboradores (2012) onde para o mesmo filo foram identificados 23,3% das *reads* utilizando o pirosequenciamento. Dentre os gêneros com maior expressão neste filo encontra-se o *Ruminococcus* que foi descrito pela primeira vez em 1948 e isolado do conteúdo ruminal bovino (SIJPESTEIJN, 1949). Este gênero apresenta como espécie tipo a bactéria *Ruminococcus flavefaciens* que juntamente com o *Ruminococcus albus* é uma das principais degradadoras de carboidratos estruturais. Têm capacidade de se aderir rapidamente à superfície dos vegetais ingeridos pelo hospedeiro para digerir celulose (KOIKE et al., 2003).

Outro gênero identificado foi o *Acetivibrio* que foi descrito pela primeira vez em 1980 por Patel e seus colaboradores, através da espécie *Acetivibrio cellulolyticus* que possui importante papel na degradação de carboidratos estruturais. O gênero *Clostridium* presente no filo Firmicutes possui duas espécies principais, o *Clostridium proteoclasticum* que desempenha principalmente atividade proteolítica (ATTWOOD et al., 1996) e o *Clostridium lundense* que está relacionado com a atividade lipolítica (CIRNE et al., 2006). Outro importante gênero pertencente ao filo Firmicutes é o

Butyrivibrio que foi descrito pela primeira vez em 1956 por Bryant e Small (1956) tendo como espécie tipo a *Butyrivibrio fibrisolvens* isolada do rúmen bovino. Estes gêneros estão geralmente associados à fermentação de carboidratos solúveis e desempenham um papel muito importante na degradação do grão de amido (MCALLISTER, 1990), sendo que *Butyrivibrio fibrisolvens* adicionalmente apresenta significativa função proteolítica no rúmen (ATTWOOD; REILLY, 1995).

O segundo filo mais abundante identificado foi o Bacteroidetes com 14% das sequências analisadas. Os dois gêneros com maior expressão dentro deste filo são os *Bacteroides* e *Prevotella*. Os *Bacteroides* possuem duas principais espécies encontradas no rúmen bovino são os *B. ruminicola* e os *B. amylophilus*. O gênero *Prevotella* é um dos representantes mais numerosos das bactérias ruminais, sendo que este grupo representa cerca de 60% dos isolados de acordo com Van Gylswyk (1990). Dentre as espécies com maior predominância estão as *Prevotella bryantii*, *Prevotella ruminicola* e *Prevotella brevis*, cujas principais funções no rúmen são degradação e utilização do amido (COTA, 1992), degradação de polissacarídeos como xilanas e pectinas da parede celular de plantas, porém, não degradam celulose. Estas bactérias também estão altamente relacionadas à degradação de proteínas e fermentação dos peptídeos (PITTMAN; BRYANT, 1964; RUSSEL, 1983; WALLACE et al., 1993)

O filo Proteobacteria, terceiro maior filo identificado, possui 10% do total de *reads* analisadas, resultados semelhantes foram encontrados por Kim, Morrison e Yu (2011) onde reunindo dados do Ribosomal Database Project (RDP) encontraram também como terceiro filo mais abundante o filo Proteobacteria, com aproximadamente 7% das sequências.

O filo Spirochaetes foi o quarto filo mais abundante com 9% de todas as sequências, resultados que corroboram com Pandya et al. (2010) que encontrou 9,52% do filo Spirochaetes, sendo porém contrastante com aqueles encontrados por Tajima et al. (1999) e Wu et al. (2012) que encontraram para o mesmo filo 2,4 e 1%, respectivamente. O maior grupo observado em nível de gênero dentro do filo Spirochaetes foi o *Treponema*, no rúmen as espécies mais importantes deste gênero são as *Treponema bryantii* e *Treponema saccharophilum* que atuam principalmente na fermentação de carboidratos solúveis (STANTON; CANALE-PAROLA, 1980).

Outro filo identificado com menor expressão numérica, mas com papel funcional muito importante foi o *Fibrobacteres* o qual compreende a bactéria *Fibrobacter succinogenes* que foi descrita por Flint et al. (1990) e é uma das principais bactérias celulolíticas ruminal. Briesacher et al. (1992) identificaram que aproximadamente 5-6% do total de 16S rRNA no conteúdo ruminal bovino é proveniente das bactérias *Fibrobacter succinogenes*.

Como podemos observar no presente trabalho, há um grande potencial para o desenvolvimento do sistema produtivo de ruminantes fundamentados no conhecimento aprofundado dos micro-organismos presentes no conteúdo ruminal (ARCURI, LOPES; CARNEIRO, 2011). Os métodos moleculares permitiram a geração de conhecimento primário sobre a diversidade de micro-organismos presentes no rúmen (KOBAYASHI, 2006).

O poder da técnica frente à resolução de comunidades microbianas com potencial biotecnológico, associado à dieta do animal o futuro da nutrição animal e outros aspectos nos quais os micro-organismos identificados poderão ser aplicados.

Muitos destes micro-organismos não são facilmente isolados por técnicas tradicionais de cultivo, porém frente a sua revelação e proporção, novas ideias podem guiar estudos para entendimento de ações sinérgicas e antagônicas dos membros desta comunidade, além de dar indicações de possíveis meios de isolamento de recursos biológicos na forma de isolados bacterianos, enzimas ou genes.

5. CONCLUSÃO

Foram identificados 27 filios no conteúdo ruminal de bovinos Nelore através do sequenciamento do gene 16S rRNA pela plataforma Illumina, sendo os mais importantes Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactéria, Spirochaetes e Fibrobacteres.

6. REFERÊNCIAS

ATTWOOD, G. T.; REILLY, K. Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 22-29, 1995.

ATTWOOD, G. T.; REILLY, K.; PATEL, B. K. C. *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 753-758, 1996.

BRIESACHER, S. L.; MAY, T.; GRIGSBY, K. N.; KERLEY, M. S.; ANTHONY, R. V.; PATERSON, J. A. Use of DNA probes to monitor nutritional effects on ruminal prokaryotes and *Fibrobacter succinogenes* S85. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 289-295, 1992.

BRYANT, M. P.; SMALL, N. The anaerobic monotrichous butyric acid-producing curved rod-shaped bacteria of the rumen. **Journal of Bacteriology**, v. 72, p. 16, 1956.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos. Microbiológicos para biotecnologia, 1998. Disponível em: http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf. Acesso em: Nov. 2013.

CECAVA, M. J.; MERCHEN, N. R.; GAY, L. C; BERGER, L. L. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2480-2888, 1990.

CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, v. 43, p. 783-791, 1987.

CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, v. 87, p. 210-217, 1992.

CIRNE, D. G.; DELGADO, O. D.; MARICHAMY, S.; MATTIASSON, B. *Clostridium lundense* sp. nov., a novel anaerobic lipolytic bacterium isolated from bovine rumen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 625-628, 2006.

COTTA, M. A. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 48-54, 1992.

FLINT, H. J.; MCPHERSON, C. A.; AVGUSTIN, G.; STEWART, C. S. Use of a cellulase-encoding gene probe to reveal restriction fragment length polymorphisms

among ruminal strains of *Bacteroides succinogenes*. **Current Microbiology**, v. 20, p. 63-67, 1990.

GILLIS, M.; VANDAMME, P.; VOS, P. D.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Polyphasic taxonomy. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Eds.), GARRITY, G. M. (Ed.). **The archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria**. Springer-Verlag. 2001. p. 43-47.

KAMRA, D. N. Rumen Microbial Ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. 124-135. 2005.

KANG, S.; DENMAN, S. E.; McSWEENEY, C. S. The use of molecular tools for the study of rumen ecology. In: **Simpósio internacional avanços em técnicas de pesquisa em nutrição de ruminantes**, 2. Pirassununga. Anais...p.179-194, 2009.

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

KOIKE S.; PAN J.; KOBAYASHI Y.; TANAKA K. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1429-1435, 2003.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. p. 139.

LI, R. W.; WU, S.; VI, R. L. B.; LI, W.; LI, C. Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate. **PloS One**, v. 7, p. e29392, 2012.

MAGURRAN, A. E. **Ecological Diversity and Its Measurement**. Princeton: Princeton university press, 1988.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-34, 2002.

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

MCALLISTER, T. A.; CHENG, K. J.; RODE, L. M.; FORSBERG, C. W. Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3146-3153, 1990.

McSWEENEY, C. S.; MACKIE, R. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Micro-organisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. **Background Study Paper (FAO)**, n. 61, p. 1-62, 2012.

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

ONDOV, B. D.; BERGMAN, N. H.; PHILLIPPY, A. M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 385, 2011.

OZUTSUMI, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA.; ITABASHI, H. The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, p. 499-506, 2005.

PANDYA, P. R.; SINGH, K. M.; PARNERKAR, S.; TRIPATHI, A. K.; MEHTA, H. H.; RANK, D. N.; JOSHI, C. G. Bacterial diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (*Bubalus bubalis*), assessed by 16S rDNA analysis. **Journal of Applied Genetics**, v. 51, p. 395-402, 2010.

PATEL, G. B.; KHAN, A. W.; AGNEW, B. J.; COLVIN, J. R. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 179-185, 1980.

PRUESSE, E. et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 7188-7196, 2007.

RUSSELL, J. B. Fermentation of peptides by *Bacteroides ruminicola* B14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 1566-1574, 1983.

SARO, C.; RANILLA, M. J.; CIFUENTES, R.; ROSSELLÓ-MORA, CARRO, M. D. Technical note: Comparison of automated ribosomal intergenic spacer analysis and denaturing gradient gel electrophoresis to assess bacterial diversity in the rumen of sheep. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 1083-1088, 2014.

SIJPESTEJIN, A. K. Cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 15, p. 49-52, 1949.

STANTON, T. B.; CANALE-PAROLA, E. *Treponema bryantii* sp. nov., a rumen spirochete that interacts with cellulolytic bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 127, p. 145-156, 1980.

SYLVESTER, J. T.; KARNATI, S. K. R.; YU, T. Z.; FIRKINS, J. L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3378-3384, 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 rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 159-169, 1999.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P. D.; KERSTERS, K.; SWINGS J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

WALLACE, R. J.; MCKAIN, N.; BRODERICK, G. A. Breakdown of different peptides by *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* and mixed microorganisms from the sheep rumen. **Current Microbiology**, v. 26, p. 333-336, 1993.

WEIMER, P. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114-3122, 1998.

WU, S.; RANSOM, L.; BALDWIN, R. L.; LI, W.; LI, C.; CONNOR, E. E.; LI, R. W. The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. **Metagenomics**, v. 1, p. 1-11, 2012.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTail by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 2271-2277, 1991.

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

Os conhecimentos gerados a partir do presente estudo são informações primárias e primordiais para o entendimento da composição bacteriana ruminal. Assim, nos proporciona vislumbrar futuro promissor no desenvolvimento de novos métodos e tecnologias a partir de pesquisas inovadoras nas áreas da genômica, proteômica, metabolômica, transgenia, imunologia entre outras possibilidades de conhecimentos passíveis de serem extraído de um ambiente extremamente rico e ainda pouco explorado como o rúmen.

Aplicações futuras como a busca por novos genomas e genes de micro-organismos com metabólitos de interesse industrial como celulases, hemicelulases, proteases, enzimas de restrição, polissacarídeos, além de outras substâncias que já vem sendo aplicadas na indústria. Há ainda um potencial enorme de descobertas de novos produtos, como a produção de probióticos e o desenvolvimento de prebióticos específicos para determinados grupos bacterianos que proporcionem maior desempenho produtivo aos animais. Outra aplicação promissora do melhor conhecimento das relações ecológicas dos micro-organismos ruminais é a possibilidade da manipulação do rúmen através da utilização de antibióticos, extratos de alguns vegetais, bacteriocinas entre outros compostos que poderão ser utilizados com maior eficiência e ação dirigida a determinadas espécies.

Estas e outras inúmeras possibilidades podem vir a ser utilizadas para manipular o ambiente ruminal em um futuro próximo, desenvolvendo tecnologias e métodos que auxiliem a otimização do processo de digestão fermentativa, tornando o sistema pecuário de ruminantes mais rentável e sustentável.